

cobas[®] HCV

**Kvantitativní test nukleových kyselin
pro použití se systémem cobas[®] 4800**

Pro použití k *in vitro* diagnostice

cobas[®] HCV	120 Tests	P/N: 06979602190
cobas[®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	10 Sets	P/N: 06979572190
cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit 2	240 Tests	P/N: 06979513190
	960 Tests	P/N: 06979521190
cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests	P/N: 05235863190
	960 Tests	P/N: 05235871190
cobas[®] 4800 System Specimen Diluent 2	240 Tests	P/N: 06979556190
cobas[®] 4800 System Lysis Kit 2	240 Tests	P/N: 06979530190
	960 Tests	P/N: 06979548190

OBSAH

Účel použití

Souhrn a výklad testu

Základní informace.....	4
Důvod pro testování HCV	4
Princip testu	5
Principy postupu.....	5

Materiály a činidla

Činidla	6
Požadavky na uchovávání činidel a manipulaci s nimi	12
Další potřebný materiál	12
Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky	13
Použitelné zkušební vzorky.....	13

Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

Varování a bezpečnostní opatření	14
Správná laboratorní praxe	15
Manipulace s činidly	15
Kontaminace	15
Integrita	16
Likvidace	16
Rozlití a čištění	16
Odběr, přeprava a uchovávání vzorků	16
Odběr vzorků	16
Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků	17

Návod k použití

Spuštění testu	17
Objem pro zpracování vzorku	17
Velikost cyklu	18
Pracovní postup	18

Výsledky

Kontrola kvality a platnost výsledků	21
Interpretace výsledků kontrol	21
Vyhodnocení výsledků	22
Seznam značek výsledků	23
Procedurální omezení	24

Hodnocení neklinických funkčních parametrů

Klíčové funkční charakteristiky.....	25
Mezinárodní standard WHO	25
Lineární rozmezí	27
Přesnost – v rámci jedné laboratoře	29
Verifikace genotypů	31
Specifická.....	32
Korelace metody	34
Ekvivalence matrice – EDTA plazma ve srovnání se sérem	35
Selhání celého systému.....	36
Zkřížená kontaminace.....	36

Doplňující informace

Hlavní parametry testu	37
Symboly	38
Výrobce	39
Ochranné známky a patenty	39
Autorská práva	39
Literatura	40
Revize dokumentu	42

Účel použití

Test **cobas®** HCV slouží k amplifikaci virové nukleové kyseliny *in vitro* pro detekci i kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) v lidské EDTA plazmě nebo séru jedinců infikovaných virem HCV. Vzorky obsahující genotyp 1 až 6 viru HCV jsou validované k detekci a kvantifikaci pomocí této analýzy.

Test má sloužit jako pomůcka při stanovení diagnózy infekce HCV v následujících populacích: osoby s průkaznými protilátkami proti HCV a známkami onemocnění jater, osoby s podezřením na aktivní infekci s průkaznými protilátkami proti HCV a osoby, které podléhají riziku infekce HCV a mají protilátky proti HCV. Detekce RNA viru HCV naznačuje, že probíhá replikace viru, a je tedy důkazem aktivní infekce.

Test má být používán jako pomůcka při péči o pacienty infikované virem HCV, u nichž probíhá antivirová terapie. Tento test měří vstupní hladiny RNA viru HCV a hladiny během léčby; lze jej použít k předpovídání trvalé a netrvalé virologické odpovědi na terapii HCV. Výsledky je třeba interpretovat v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Souhrn a výklad testu

Základní informace

Virus HCV je pokládán za hlavní etiologické agens odpovědné za 90 % až 95 % případů hepatitidy v důsledku transfuze.¹⁻⁴ HCV je virus s pozitivní jednořetězcovou RNA a genomem o velikosti přibližně 9500 nukleotidů, který kóduje 3000 aminokyselin. HCV se vyskytuje v krvi, a tedy může být přenášen prostřednictvím krve a krevních produktů. Rozšířené používání skriningových opatření pro detekci HCV v krvi znatelně snížilo riziko hepatitidy související s transfuzí. Incidence infekce virem HCV je nejvyšší v souvislosti s nitrožilním zneužíváním drog a v menší míře i s ostatními perkutánními aplikacemi.⁴

Kvantifikace HCV RNA za účelem zjištění vstupní virové zátěže a monitorování během léčby byla úspěšně zavedena při demonstraci účinnosti kombinované terapie pegylovaným interferonem s ribavirinem (pegIFN/RBV).⁵⁻⁹ Pokyny pro péči o pacienty s HCV a jejich léčbu^{10,11} doporučují kvantitativní testy HCV RNA před začátkem antivirové terapie, v určených intervalech během léčby (response-guided therapy, RGT) a ve 12 týdnech nebo později po ukončení léčby.

Absence detekovatelné HCV RNA pomocí citlivého testu 12 týdnů po ukončení léčby je cílem léčby a ukazuje na trvalou virologickou odezvu.¹⁰

Zjištění virové kinetiky během terapie bylo použito k dalšímu rozvoji personalizované terapie inhibitory proteázy, přípravky telaprevir a boceprevir, které byly v poslední době schváleny jako antivirové přípravky s přímým účinkem.¹²⁻¹⁵

Důvod pro testování HCV

Přítomnost protilátek proti HCV naznačuje, že dotyčná osoba byla infikována virem HCV. Pozitivní stav na protilátky proti HCV (Anti-HCV) však nerozlišuje mezi akutní, chronickou a vyléčenou infekcí. Detekce RNA viru HCV v séru nebo plazmě znamená pokračující virovou replikaci, a je tedy používána k identifikaci pacientů s perzistentní infekcí HCV.

S rostoucí dostupností velmi účinných přípravků s přímým účinkem specifických pro HCV, včetně proteázových inhibitorů druhé generace, polymerázových inhibitorů a inhibitorů NS5A a dynamického vývoje terapií HCV zůstává monitorování virové zátěže hlavním laboratorním testem pro potvrzení, že léčba založená na přípravcích s přímým účinkem vedla k dosažení trvalé virologické odezvy.¹⁶⁻²¹

Souhrnem, test **cobas**® HCV je kvantitativní test pro detekci RNA viru HCV, diagnózu aktivní infekce a určení virové kinetiky k použití v laboratořích, které podporují klinická hodnocení, jakož i v klinické praxi při péči o nemocné s HCV.

Princip testu

Test **cobas**® HCV slouží ke kvantitativnímu stanovení nukleových kyselin pomocí systému **cobas**® 4800. **cobas**® HCV umožňuje detekci a kvantifikaci RNA viru HCV v EDTA plazmě nebo séru infikovaných pacientů. Dvojitě sondy se používají k detekci a kvantifikaci, ale nerozlišují mezi genotypy 1–6 viru HCV. Virová zátěž je kvantifikována pomocí kvantifikačního standardu armored RNA (RNA QS) jiného původu, než je HCV, který je do každého vzorku přidán během přípravy. Standard RNA QS funguje také jako vnitřní kontrola k monitorování celého procesu přípravy vzorku a PCR amplifikace. Test navíc využívá tři externí kontroly: pozitivní kontrolu s vysokým titrem, pozitivní kontrolu s nízkým titrem a negativní kontrolu.

Principy postupu

Test **cobas**® HCV se zakládá na plně automatizované přípravě vzorků (extrakce a purifikace nukleové kyseliny) s následnou PCR amplifikací a detekcí. Systém **cobas**® 4800 sestává z přístroje **cobas**® x 480 a analyzátoru **cobas**® z 480. Software systému **cobas**® 4800 provádí automatizované zpracování dat, při kterém přiřazuje kategorii výsledku „Target not detected“ (cílová sekvence nedetekována), < LLoQ lower limit of quantitation (dolní mez kvantifikace), > ULQ upper limit of quantitation (horní mez kvantifikace); anebo kategorii „HCV RNA detected“ (detekována RNA viru HCV) s hodnotou v lineárním rozmezí $LloQ \leq x \leq ULQ$. Výsledky lze prohlížet přímo na obrazovce systému, exportovat nebo vytisknout jako zprávu.

Extrakce nukleových kyselin ze vzorků pacientů, externích kontrol a přidáných molekul armored RNA QS probíhá současně. Souhrnem, dochází k uvolnění virových nukleových kyselin přidáním proteinázy a lytických činidel ke vzorku. Uvolněné nukleové kyseliny se vážají na křemičitanový povrch přidáných magnetických skleněných částic. Nenavázané látky a nečistoty, jako například denaturované proteiny, buněčný odpad a případné inhibitory PCR jsou odstraněny během následujících kroků promývacím puřem; purifikované nukleové kyseliny jsou eluovány z magnetických skleněných částic elučním puřem při zvýšené teplotě.

K selektivní amplifikaci cílových nukleových kyselin ze vzorku pacienta dochází pomocí dopředných a zpětných primerů specifických pro cílové virové sekvence vybrané z vysoce konzervativních oblastí HCV. K selektivní amplifikaci standardu RNA QS dochází pomocí sekvence specifických dopředných a zpětných primerů vybraných tak, že nejsou homologické s genomem HCV. Tepelně stabilní DNA polymeráza se používá jak pro reverzní transkripci, tak pro PCR amplifikaci. Činidla Master Mix obsahují místo deoxythymidin trifosfátu (dTTP) deoxyuridin trifosfát (dUTP), který je zabudováván do nově syntetizované DNA (amplikonu).²²⁻²⁴ Jakékoli kontaminující amplikony z předcházejících cyklů PCR jsou jako PCR templáty inaktivovány enzymem AmpErase přítomným v činidlech Master Mix ještě před prvním denaturačním krokem PCR. AmpErase katalyzuje odštěpení uracilu z DNA, ale nevykazuje žádnou aktivitu vůči RNA nebo přírodní DNA, která neobsahuje uracil. Amplikony vytvořené během následujících cyklů PCR nejsou inaktivovány, protože enzym AmpErase je při anelačních a denaturačních teplotách PCR inaktivní.

Činidlo Master Mix pro test **cobas**® HCV obsahuje dvojitě detekční sondy specifické pro cílové sekvence HCV a jednu detekční sondu pro standard RNA QS. Sondy jsou označeny cílově specifickými fluorescenčními oznamovacími barvami, která umožňují současnou detekci cílových sekvencí HCV a standardu RNA QS pomocí dvou různých detekčních kanálů.^{25,26} Fluorescenční signály intaktních sond, které nejsou navázány na

cílové sekvence, jsou potlačeny tlumícím barvivem. Během kroku PCR amplifikace dochází kvůli hybridizaci sond se specifickým templátem jednořetězcové DNA k štěpení sondy 5'-3' nukleázovou aktivitou DNA polymerázy, která způsobí oddělení oznamovacího a tlumícího barviva a vznik fluorescenčního signálu. Každý cyklus PCR vytváří větší množství rozštěpených sond a kumulativní signál oznamovacího barviva se současně zvyšuje. Detekce a rozlišení PCR produktů v reálném čase se provádí měřením fluorescence uvolněných oznamovacích barviv pro virové cíle a standard RNA QS.

Materiály a činidla

Činidla

Veškerá neotevřená činidla a kontroly budou uchovávány podle doporučení v tabulce Požadavky na uchovávání činidel a manipulaci s nimi.

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® HCV 120 testů (P/N: 06979602190)	MMX R1 (Činidlo Master Mix 1 pro systém cobas®) Octan hořečnatý, hydroxid draselný, < 0,1% azid sodný	10 × 1,75 ml	N/A
	HCV MMX R2 (Činidlo HCV Master Mix 2 pro systém cobas®) Tricinový pufr, octan draselný, 18% dimethylsulfoxid, glycerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% HCV primery, < 0,01% dopředné a zpětné primery kvantifikačního standardu, < 0,01% fluorescenčně značené oligo- nukleotidové sondy specifické pro virus HCV a kvantifikační standard, < 0,01% oligo- nukleotidový aptamer, < 0,01% Z05D DNA polymeráza (mikrobiální), < 0,01% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální), < 0,1% azid sodný	10 × 0,5 ml	N/A
	RNA QS (Kvantifikační standard RNA pro systém cobas®) Tris pufr, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstrukt armored RNA nepřibuzný viru HCV obsahující oblasti sekvencí specifické pro primer a sondu (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2), < 0,1% azid sodný	10 × 1,75 ml	N/A

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit (Kontrolní souprava HBV/HCV/HIV-1 pro systém cobas®) 10 souprav (P/N: 06979572190)	HBV/HCV/HIV-1 L(+)C (Nízce pozitivní kontrola HBV/HCV/HIV-1 pro systém cobas®) < 0,001% syntetická (armored) RNA viru HIV-1 skupiny M enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu MS2, < 0,001% syntetická (plazmidová) DNA viru HBV enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu Lambda, < 0,001% syntetická (armored) RNA viru HCV enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu MS2, normální lidská plazma nereagující na protilátky proti HIV 1/2 podle licenčních testů, protilátka proti viru HCV, HBsAg, protilátka proti HBc; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami. 0,1% konzervantu ProClin® 300 ^b	10 × 0,75 ml	  VAROVÁNÍ H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci. P261 Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. P272 Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště. P280 Používejte ochranné rukavice. P333 + P313 Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362 + P364 Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. P501 Odstraňte obsah/obal předáním zařízení schválenému pro likvidaci odpadů. 55965-84-9 směs látek: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EC č. 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EC č. 220-239-6] (3:1)
	HBV/HCV/HIV-1 H(+)C (Vysoce pozitivní kontrola HBV/HCV/HIV-1 pro systém cobas®) < 0,001% syntetická (armored) RNA viru HIV-1 skupiny M enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu MS2, < 0,001% syntetická (plazmidová) DNA viru HBV enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu Lambda, < 0,001% syntetická (armored) RNA viru HCV enkapsulovaná v obalovém proteinu bakteriofágu MS2, normální lidská plazma nereagující na protilátky proti HIV 1/2 podle licenčních testů, protilátka proti viru HCV, HBsAg, protilátka proti HBc; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami. 0,1% konzervantu ProClin® 300 ^b	10 × 0,75 ml	
	(-) C (Negativní kontrola pro systém cobas®) Normální lidská plazma, nereaktivní podle licenčních testů na protilátky proti HIV-1/2, protilátky proti HCV, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami. < 0,1% konzervantu ProClin® 300 ^b	10 × 0,75 ml	

^a Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.^b Nebezpečná látka.

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 (Souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém cobas® 4800) 240 testů (P/N: 06979513190)	MGP 2 (MGP činidlo 2 pro systém cobas® 4800) Magnetické skleněné částice, Tris pufr, 0,1% methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1% azid sodný	10 × 8 ml	N/A
	EB 2 (Eluční pufr 2 pro systém cobas® 4800) Tris pufr, 0,2% methyl-4-hydroxybenzoát	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 (Souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém cobas® 4800) 960 testů (P/N: 06979521190)	MGP 2 (MGP činidlo 2 pro systém cobas® 4800) Magnetické skleněné částice, Tris pufr, 0,1% methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1% azid sodný	10 × 16 ml	N/A
	EB 2 (Eluční pufr 2 pro systém cobas® 4800) Tris pufr, 0,2% methyl-4-hydroxybenzoát	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Souprava promývacího pufru pro systém cobas® 4800) 240 testů (P/N: 05235863190)	WB Dihydrát citrátu sodného, 0,05% N-methylizothiazolon HCl ^b	10 × 55 ml	 VAROVÁNÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P272: Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště. P280: Používejte ochranné rukavice. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření. P362 + P364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. P501: Odstraňte obsah/obal předáním zařízení schválenému pro likvidaci odpadů. 26172-54-3 2-methyl-2H-isothiazol-3-on hydrochlorid

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit (Souprava promývacího pufru pro systém cobas® 4800) 960 testů (P/N: 05235871190)	WB Dihydrát citrátu sodného, 0,05% N-methylizothiazolon HCl ^b	10 × 200 ml	 VAROVÁNÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P272: Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště. P280: Používejte ochranné rukavice. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření. P362 + P364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. P501: Odstraňte obsah/obal předáním zařízení schválenému pro likvidaci odpadů. 26172-54-3 2-methyl-2H-isothiazol-3-on hydrochlorid
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2 (Roztok 2 pro ředění vzorků pro systém cobas® 4800) 240 Testů (P/N: 06979556190)	SD 2 Tris pufr, 0,1% methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1% azid sodný	10 × 8 ml	N/A

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 240 testů (P/N: 06979530190)	P 2 (Proteáza 2 pro systém cobas® 4800) Tris pufr, < 0,05 % EDTA, chlorid vápenatý, octan vápenatý, 8 % (w/v) proteináza ^b	10 × 1,0 ml	 NEBEZPEČÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H334: Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P280: Používejte ochranné rukavice. P284: Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest. P304 + P340: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P342 + P311: Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. 39450-01-6 Proteináza, serinová proteináza izolovaná z <i>Tritirachium album</i>
	LYS 2 (Lytický pufr 2 pro systém cobas® 4800) 43 % (w/w) guanidin thiokyanát ^b , 5 % (w/v) polidokanol ^b , 2 % (w/v) dithiothreitol ^b , dihydrát citrátu sodného	10 × 27 ml	 NEBEZPEČÍ H302: Zdraví škodlivý při požití. H314: Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. EUH032: Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami. EUH071: Způsobuje poleptání dýchacích cest. P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/chrániče sluchu. P303 + P361 + P353: PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou. P304 + P340 + P310: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P305 + P351 + P338 + P310: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P391: Uniklý produkt seberte. 593-84-0 Guanidin thiokyanát 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol

Souprava	Součásti a složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 960 testů (P/N: 06979548190)	P 2 (Proteáza 2 pro systém cobas® 4800) Tris pufr, < 0,05 % EDTA, chlorid vápenatý, octan vápenatý, 8 % (w/v) proteináza ^b	10 × 1,0 ml	 NEBEZPEČÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H334: Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P280: Používejte ochranné rukavice. P284: Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest. P304 + P340: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P342 + P311: Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. 39450-01-6 Proteináza, serinová proteináza izolovaná z <i>Tritirachium album</i>
	LYS 2 (Lytický pufr 2 pro systém cobas® 4800) 43 % (w/w) guanidin thiokyanát ^b , 5 % (w/v) polidokanol ^b , 2 % (w/v) dithiothreitol ^b , dihydrát citrátu sodného	10 × 84 ml	 NEBEZPEČÍ H302: Zdraví škodlivý při požití. H314: Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. EUH032: Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami. EUH071: Způsobuje poleptání dýchacích cest. P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/chrániče sluchu. P303 + P361 + P353: PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou. P304 + P340 + P310: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P305 + P351 + P338 + P310: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P391: Uniklý produkt seberte. 593-84-0 Guanidin thiokyanát 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol

^a Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.^b Nebezpečná látka.

Požadavky na uchovávání činidel a manipulaci s nimi

Činidlo	Teplota uchovávání	Doba uchovávání
cobas® HCV	2–8 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti
Kontrolní souprava HBV/HCV/HIV-1 pro systém cobas®	2–8 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti
Souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém cobas® 4800	2–8 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti
Souprava promývacího pufru pro systém cobas® 4800	15–25 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti
Roztok 2 pro ředění vzorků pro systém cobas® 4800	2–8 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti
Lytická souprava 2 pro systém cobas® 4800	2–8 °C	Stabilní do uvedeného data použitelnosti

Činidla nezmrazujte.

Další potřebný materiál

Materiál	P/N
Extrakční destička (s hlubokými jamkami) 2,0 ml pro systém cobas® 4800	06884008001
Mikrotitrační destička AD 0,3 ml pro systém cobas® 4800	05232724001
Aplikátor zalepovací fólie	04900383001
Špičky CORE, 1000 µl, stojan s 96 ks	04639642001
Zásobník na činidla 200 ml	05232759001
Zásobník na činidla 50 ml	05232732001
Nosič s 24 pozicemi	04639502001
Nosič s 32 pozicemi	04639529001
Pytel na pevný odpad	05530873001 (malý) nebo 04691989001 (velký)
Plastová skluzavka na odpad Hamilton STAR	04639669001
Laboratorní rukavice bez pudru	Jakékoliv rukavice na jedno použití bez pudru.
Vortex mixer (pro jednu zkumavku)	Jakýkoliv vířivý mixér.
Centrifuga s kyvnou nádobou rotoru s min. otáčkami 1500	Jakákoliv vhodná centrifuga.

Více informací ohledně samostatně prodávaných materiálů získáte u svého místního zástupce společnosti Roche.

Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky

Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky
Systém cobas® 4800 Přístroj cobas® x 480 Analyzátor cobas® z 480 Řídicí jednotka
Aplikační software pro systém cobas® 4800 (základní) verze 2.2.0 nebo vyšší
Systém cobas® 4800 cobas® HCV AP verze 1.1.0 nebo vyšší

Pozn.: Kontaktujte místního zástupce společnosti Roche ohledně podrobných seznamů pro objednávky stojanů na vzorky, stojanů na špičky, stojanů na činidla a nosiče destiček, které se vejdou do přístrojů.

Použitelné zkumavky na vzorky

Pro test jsou vhodné běžně používané primární a sekundární zkumavky.

Jsou použitelné následující zkumavky na vzorky:

Primární zkumavky

Nominální průměr (mm)	Vstupní objem vzorku – zpracovaná (odstředěná) plná krev		Přidavná látka	
	Objem zpracování 400 µl	Objem zpracování 200 µl	EDTA plazma	Sérum
11-14	1800 µl nebo více	1000 µl nebo více	S gelem nebo bez	S gelem
14,5-16	Více než 4000 µl	Více než 4000 µl	S gelem nebo bez	S gelem

Kontaktujte místního zástupce společnosti Roche ohledně informací pro objednávání konkrétních zkumavek na vzorky a minimálních vstupních objemech vzorku pro konkrétní primární zkumavky.

Sekundární zkumavky

Nominální průměr (mm)	Vstupní objem vzorku	
	Objem zpracování 400 µl	Objem zpracování 200 µl
11-16	1000 µl nebo více (některé sekundární zkumavky mají minimální vstupní objem menší než 1000 µl)	750 µl nebo více (některé sekundární zkumavky mají minimální vstupní objem menší než 750 µl)

Kontaktujte místního zástupce společnosti Roche ohledně informací pro objednávání konkrétních zkumavek na vzorky a minimálních vstupních objemech vzorku pro konkrétní sekundární zkumavky.

Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

Varování a bezpečnostní opatření

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi činidly, vzorky a amplifikačními směsmi nedošlo ke kontaminaci.

- Pouze pro účely diagnostiky *in vitro*.
- Systém **cobas®** HCV nebyl vyhodnocen k použití jako skrínigový test pro přítomnost HCV v krvi nebo krevních produktech.
- Se všemi vzorky pacientů je nutno zacházet, jako by byly infekční, za použití správných laboratorních postupů, tak jak jsou popsány v publikaci Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories a v dokumentu CLSI číslo M29-A4.^{27,28} Tento postup smí provádět pouze personál zkušený v zacházení s nebezpečným biologickým materiálem a s používáním testu **cobas®** HCV a systému **cobas®** 4800.
- Veškeré materiály pocházející z lidských zdrojů by měly být považovány za potenciálně infekční a musí se s nimi zacházet dle všeobecných bezpečnostních opatření.
- Kontrolní souprava **cobas®** HBV/HCV/HIV-1 obsahuje plazmu z lidské krve. Zdrojový materiál byl analyzován pomocí licenčních testů na protilátky a byl shledán nereaktivním vůči protilátce proti HCV, protilátce proti HIV-1/2, HBsAg a protilátce proti HBc. Testování metodami PCR neprokázala žádné detekovatelné nukleové kyseliny HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA, a HBV DNA. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaká infekční agens.
- Zamezte expozici MGP vůči zdrojům magnetického pole.
- **Nezmrazujte plnou krev ani žádné vzorky v primárních zkumavkách.**
- Pro zajištění optimální účinnosti testu používejte pouze spotřební materiál, který je součástí dodávky, nebo specifikovaný požadovaný materiál.
- Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Váš místní zástupce společnosti Roche.
- Pečlivě dodržujte uvedené postupy a předpisy, aby se zajistilo správné provedení testů. Jakákoliv odchylka od postupů a předpisů může negativně ovlivnit optimální účinnost testu.
- Pokud nebude během manipulace a zpracování vzorků patřičně kontrolována kontaminace přenosem, mohou vzniknout falešně pozitivní výsledky.
- Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace zařízení **cobas®** x 480 nebo analyzátoru **cobas®** z 480 najdete v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800. Pokud existuje podezření na kontaminaci, proveďte čištění a týdenní údržbu dle popisu v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.

Pozn.: Konkrétní pokyny viz „Odběr, přeprava a uchovávání vzorků“.

Správná laboratorní praxe

- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- Po manipulaci se vzorky a činidly soupravy si důkladně umyjte ruce, jakož i po svléknutí laboratorních rukavic.
- Při práci s jakýmkoliv činidly používejte laboratorní rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozlití, zředte je před vytřením dosucha vodou.
- Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě (zředěný bělicí prostředek pro domácnosti 1:10). Dále povrch otřete 70% etanolem.
- V laboratoři udržujte stálou teplotu, která splňuje specifikace systému ohledně pracovního prostředí, uvedené v uživatelské nápovědě systému **cobas® 4800**.

Manipulace s činidly

- Aby nedošlo u vzorků nebo kontrol ke kontaminaci přenosem, zacházejte se všemi činidly, kontrolami a vzorky podle zásad správné laboratorní praxe.
- Před použitím vizuálně zkontrolujte každou láhev a lahvičku s činidly, zda nejeví žádné známky netěsnosti. Pokud známky netěsnosti vykazuje, nepoužívejte tento materiál k testování.
- Lytický pufr 2 pro systém **cobas® 4800** obsahuje potenciálně nebezpečnou látku guanidinthiokyanát. Vyhněte se kontaktu činidel s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám.
- Test **cobas® HCV**, souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém **cobas® 4800** a roztok 2 pro ředění vzorků pro systém **cobas® 4800** obsahují azid sodný jako konzervační látku. Vyhněte se kontaktu činidel s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám. Pokud se činidlo rozlije, zředte ho před vytřením dosucha vodou.
- Lytický pufr 2 pro systém **cobas® 4800**, jenž obsahuje guanidinthiokyanát, se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělicím prostředkem). Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.

Kontaminace

- Je nutné nosit laboratorní rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměňovat mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly **cobas® HCV**. Zabraňte kontaminaci rukavic při manipulaci se vzorky a kontrolami. Při práci se vzorky a soupravami činidel používejte laboratorní rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- Zamezte mikrobiální a ribonukleázové kontaminaci činidel.
- Pokud se během zacházení se vzorkem nezabrání kontaminaci vzorků, mohou být získány falešně pozitivní výsledky.

Integrita

- Nepoužívejte soupravy po uplynutí data použitelnosti.
- Činidla nemíchejte.
- Položky k jednorázovému použití nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Pufr znovu nepoužívejte.
- Veškeré vybavení je nutné řádně udržovat podle pokynů výrobce.

Likvidace

- Test **cobas®** HCV, souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém **cobas®** 4800 a roztok 2 pro ředění vzorků pro systém **cobas®** 4800 obsahují azid sodný (viz „**Varování a bezpečnostní opatření**“). Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.

Pozn.: Likvidace kapalného odpadu viz uživatelská nápověda systému cobas® 4800.

Rozlití a čištění

- Lytický pufr 2 pro systém **cobas®** 4800 obsahuje guanidinthiokyanát. Pokud se kapalina obsahující guanidinthiokyanát rozlije, postižené místo vyčistěte vodou s vhodným laboratorním detergentem. Jestliže rozlitá kapalina obsahuje potenciálně infekční látky, vyčistěte místo NEJPRVE vodou s vhodným laboratorním detergentem a potom 0,5% chlornanem sodným.
- Pokud dojde k rozlití kapaliny na přístroj **cobas®** x 480, řiďte se při čištění pokyny v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.
- K čištění přístroje **cobas®** x 480 nebo analyzátoru **cobas®** z 480 nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Vyčistěte přístroj **cobas®** x 480 nebo analyzátor **cobas®** z 480 podle pokynů v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.

Odběr, přeprava a uchovávání vzorků

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

Všechny vzorky uchovávejte při stanovených teplotách.

Zvýšené teploty ovlivňují stabilitu vzorků.

Pokud používáte vzorky zmrazené v sekundárních zkumavkách, ponechte je při pokojové teplotě (15–30 °C) do úplného roztátí a pak krátce promíchejte (např. na vortexu 3–5 sekund) a odstředěním shromážděte veškerý objem na dně zkumavky.

Odběr vzorků

Krev se odebírá do zkumavek SST™ (sérové separační zkumavky), do zkumavek pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™ pro molekulární diagnostické testovací metody nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu.

Pozn.: Uživatel musí dodržovat pokyny výrobce zkumavky pro přípravu séra/plazmy.

Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků

- Krev odebranou do zkumavek SST™ (sérové separační zkumavky), do zkumavek pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™ pro molekulární diagnostické testovací metody nebo do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu lze uchovávat nebo přepravovat po dobu do 24 hodin při 2 °C až 25 °C před přípravou plazmy/séra a následným testováním.
- Vzorky plazmy/séra lze uchovávat v sekundárních zkumavkách po dobu do 24 hodin při teplotě 2 °C až 25 °C, do 72 hodin při 2 °C až 8 °C nebo do 6 týdnů při ≤ -18 °C. Separované vzorky plazmy/séra v sekundárních zkumavkách jsou stabilní až do tří cyklů zmrazení a rozmrazení, pokud jsou uchovávány zmrazené při teplotě ≤ -18 °C.
- Pokud mají být vzorky přepravovány, musí být zabaleny a označeny dle platných státních anebo mezinárodních předpisů o přepravě vzorků a etiologických agens.

Návod k použití

Spuštění testu

Objem pro zpracování vzorku

Výchozí objem pro zpracování vzorku systémem **cobas® HCV** je 400 µl. U vzorků s malým objemem lze zvolit objem pro zpracování vzorku 200 µl. Pouze v tomto případě je třeba do systému nadávkovat roztok 2 pro ředění vzorků pro systém **cobas® 4800** jako dodatečné činidlo. Uživatele k tomu pobídne softwarový průvodce, pokud byl při přípravě objednávky zvolen typ vzorku „Diluted serum or plasma“.

Obrázek 1: Pracovní postup **cobas® HCV**

1	Spustíte systém.
2	Provedte údržbu přístroje.
3	Vyjměte vzorky a činidla z místa uchovávání.
4	Spustíte cyklus.
5	Naskenujte karty parametrů
6	Zaveďte vzorky
7	S LIS: potvrďte objednávku. Bez LIS: vytvořte objednávku.
8	Zaveďte spotřební materiál (destičku s hlubokými jamkami, mikrotitrační destičku, stojany na špičky).
9	Zaveďte činidla
10	Spustíte cyklus přípravy vzorku
11	Vyjměte a zalepte mikrotitrační destičku
12	Zaveďte mikrotitrační destičku do analyzátoru
13	Vyjměte vzorky, použitá činidla a destičku s hlubokými jamkami.
14	Zkontrolujte výsledky
15	S LIS: odešlete výsledky do LIS
16	Vyprázdněte analyzátor

Pozn.: Podrobné provozní pokyny viz Asistent uživatele systému **cobas® 4800**.

Velikost cyklu

Generická činidla pro přípravu vzorků (souprava 2 pro přípravu vzorků pro systém **cobas**® 4800, lytická souprava 2 pro systém **cobas**® 4800 a souprava promývacího pufru pro systém **cobas**® 4800) jsou k dispozici v soupravách dvou velikostí; každá obsahuje množství činidel dostatečné pro 10 cyklů po 24 nebo 96 vzorcích, které zahrnují kontroly a vzorky pro analýzu. Souprava **cobas**® HCV se dodává v jedné velikosti, která stačí na testování 120 (10×12) vzorků včetně kontrol. Kontrolní souprava **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 se dodává v jedné velikosti a podporuje všechny konfigurace cyklu. Pro každou dávku testu je nutno použít jednu níže pozitivní kontrolu HBV/HCV/HIV-1, jednu vysoce pozitivní kontrolu HBV/HCV/HIV-1 a jednu negativní kontrolu. Pro jeden cyklus testu je povolen maximální počet 93 vzorků a 3 kontroly.

Obrázek 1 uvádí souhrn postupu.

Pozn.: *Za účelem optimálního využití činidel lze generická činidla pro přípravu vzorků použít pro cyklus obsahující celkem 1–21 vzorků (velikost testovací soupravy 10 ×24) nebo celkem 1–93 vzorků (velikost testovací soupravy 10×96). Soupravy promývacího pufru pro systém **cobas**® 4800, soupravy 2 pro přípravu vzorků pro systém **cobas**® 4800 a lytické soupravy 2 pro systém **cobas**® 4800 různých velikostí však nelze vzájemně kombinovat. Pokud je například na začátku cyklu nasnímána láhev s promývacím pufrem pro 96 testů, musí být použita také činidla z dalších dvou souprav o velikosti pro 96 testů.*

Pracovní postup

Test **cobas**® HCV se provádí s použitím úplného pracovního postupu v softwaru **cobas**® 4800. Skládá se z přípravy vzorku na přístroji **cobas**® x 480 a poté následuje amplifikace a detekce na analyzátoru **cobas**® z 480. Test **cobas**® HCV může být prováděn samostatně nebo v režimu kombinovaných dávek s testy, které sdílejí stejný automatický proces extrakce a PCR profil amplifikace a detekce. Při kroku výběru testu software zobrazí testy kompatibilní s testem **cobas**® HCV v režimu kombinovaných dávek. Podrobnosti viz Asistent uživatele systému **cobas**® 4800.

1. Zapněte systém podle pokynů Asistenta uživatele systému **cobas**® 4800.
2. Proveďte údržbu podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800.
3. Nachystejte si všechna činidla a potřebný spotřební materiál. Všechna činidla kromě HCV MMX R2 a MMX R1 musí mít před zavedením do přístroje **cobas**® x 480 okolní teplotu laboratoře. Činidla HCV MMX R2 a MMX R1 je možné vzít přímo z místa uchovávání o teplotě 2–8 °C, protože se vytemperují na okolní teplotu laboratoře v přístroji **cobas**® x 480 předtím, než budou použity v procesu.

Pozn.: *Veškerá činidla a zásobníky na činidla jsou označena čárovým kódem a jsou určena pro jedno použití. Software přístroje **cobas**® 4800 sleduje použití činidel a zásobníků na činidla a zamítne již dříve použitá činidla nebo zásobníky na činidla.*

4. Zahajte nový cyklus a zvolte typ pracovního postupu HCV. Chcete-li provést cyklus se smíšenou dávkou, zvolte kromě HCV další vhodné typy pracovního postupu (tj. HIV-1, CMV nebo HCV GT).
5. Postupujte podle softwarového průvodce a na kartách parametrů oskenujte čárové kódy kalibračních koeficientů a rozmezí kontrol.

Pozn.: *Oskenujte karty parametrů činidel, která nejsou prošlá. Software nehlídá datum expirace činidel na kartách parametrů. Před oskenováním čárového kódu zkontrolujte datum expirace vytištěné na příslušné kartě parametrů nebo v soupravě činidel.*

6. Vložte vzorky. Lze vložit primární nebo sekundární zkumavky na vzorky; minimální objem vzorku závisí na typu a velikosti zkumavky. Více podrobností viz část „Použitelné zkumavky na vzorky“.

7. Vytvořte objednávku. Existují tři způsoby, jak vytvářet objednávku:

- Pomocí editoru vzorků před vložením stojanu na vzorky do přístroje **cobas®** x 480 (tlačítko „Editor“ se nachází na pravé straně hlavní nabídky). Objednávky je možné v případě potřeby uložit, upravit a znovu nahrát. Při výběru požadovaných výsledků zvolte „HCV“.
- Pomocí softwarového průvodce pro nový cyklus vložením vzorků do přístroje **cobas®** x 480, jakmile je k tomu uživatel vyzván. Čárové kódy budou automaticky nasnímány a musí být definovány požadované výsledky pro každý vzorek. Při výběru požadovaných výsledků zvolte „HCV“.
- Pomocí systému LIS vašeho zdravotnického zařízení.

Další podrobnosti viz uživatelská nápověda systému **cobas®** 4800. Zaveďte vzorky a definujte/zvolte objednávku nebo použijte LIS dle potřeby.

8. Vložte vzorky podle pokynů softwarového průvodce. Nedoplňujte jednotlivé špičky do částečně použitého stojanu na špičky, ani je nevytahujte, protože software sleduje počet zbývajících špiček. Pokud zde není dostatek špiček pro uskutečnění cyklu, software vydá varování pro uživatele.

9. Vložte činidla.

Vložte činidla pro přípravu vzorků do zásobníků na činidla označených čárovým kódem. Zásobníky na činidla jsou k dispozici ve dvou velikostech: 200 ml a 50 ml. Při výběru správné velikosti zásobníku na činidla postupujte podle softwarového průvodce. Čárové kódy zásobníků na činidla musí směřovat na pravou stranu nosiče. Pro činidla pro přípravu vzorků použijte metodu „naskenovat-naskenovat-nalít-umístit“:

- Naskenujte čárový kód lahvičky s činidlem.
- Naskenujte čárový kód zásobníku na činidla.
- Nalijte činidlo do zásobníku na činidla.
- Umístěte naplněný zásobník na činidla na určenou pozici do nosiče na činidla.

Pozn.: Systém cobas® 4800 je vybaven vnitřními hodinami, které monitorují čas, po který jsou činidla umístěná v přístroji. Jakmile je LYS 2 nebo WB naskenován, zbývá 1 hodina na provedení dávkování vzorků a kliknutí na tlačítko Start. Na záložce „Workplace“ se zobrazí ubíhající čas. Jestliže vyprší čas, po který mohou být činidla umístěná v přístroji, systém nedovolí spuštění cyklu.

Pozn.: Aby přenos MGP proběhl správně, bezprostředně před dávkováním do zásobníku na činidla lahvičku s MGP protřepejte na třepačce nebo s ní silně zatřepejte.

10. Vložte lahvičky s činidly (HCV MMX R2, MMX R1 a RNA QS), lahvičky s kontrolami [HBV/HCV/HIV-1 L(+)/C, HBV/HCV/HIV-1 H(+)/C a (–) C] a lahvičky s generickými činidly (P2 a SD2 podle potřeby) přímo do nosiče činidel.

Pozn.: Aby nedocházelo ke zbytečnému přerušení cyklů a kontaminaci, je důležité sklepnout dolů obsah lahviček s činidly, aby nevznikaly bubliny / filmy tekutiny. Kontroly je třeba otevírat od těch, které jsou nejbližší (od pozice 24 do 1). Vyměňte si rukavice po zacházení s pozitivními kontrolami.

11. Spustíte cyklus přípravy vzorku. Po úspěšném cyklu přípravy vzorků budou k dispozici tlačítka „Sample Preparation results“ a tlačítko „Unload“. Pokud si přejete, zkontrolujte výsledky stisknutím tlačítka „Sample Preparation results“ a pak vyjměte nosiče destiček stisknutím tlačítka „Unload“. Tlačítkem „Unload“ můžete též vyjmout nosiče destiček bez prohlížení výsledků. Viz uživatelská nápověda systému **cobas®** 4800.

12. Podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800 mikrotitrační destičku po vyjmutí zalepte a přeneste do analyzátoru **cobas**® z 480.
13. Vložte mikrotitrační destičku do analyzátoru a spusťte cyklus amplifikace a detekce podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800.

Pozn.: Systém cobas® 4800 má vnitřní hodiny, které monitorují čas po přidání připravených vzorků do aktivní směsi Master Mix. Amplifikaci a detekci je nutné spustit co nejdříve, ale ne později než 40 minut po dokončení cyklu přístroje cobas® x 480. Na záložce „Workplace“ se zobrazí ubíhající čas. Jestliže vyprší čas, systém přeruší cyklus.

14. Vyjměte vzorky, použitá činidla a destičku s hlubokými jamkami podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800.
15. Po dokončení cyklu amplifikace a detekce si prohlédněte a přijměte výsledky podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800.
16. Pokud používáte LIS, odešlete výsledky do LIS.
17. Podle pokynů uživatelské nápovědy systému **cobas**® 4800 vyjměte mikrotitrační destičku z analyzátoru **cobas**® z 480.

Výsledky

Systém **cobas**® 4800 automaticky stanoví koncentraci HCV RNA ve vzorcích a kontrolách. Koncentrace HCV RNA je vyjádřena v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml).

Kontrola kvality a platnost výsledků

- S každou dávkou je zpracována jedna negativní kontrola (–) C a dvě pozitivní kontroly; nízké pozitivní kontrola HBV/HCV/HIV-1 L(+)C a vysoce pozitivní kontrola HBV/HCV/HIV-1 H(+)C.
- Zkontrolujte platnost dávky v softwaru **cobas**® 4800 anebo v příslušné zprávě.
- Software **cobas**® 4800 označuje neplatnost výsledků automaticky na základě selhání negativních a pozitivních kontrol.

Interpretace výsledků kontrol

Tabulka 1: Interpretace výsledků negativních a pozitivních kontrol

Negativní kontrola	Výsledek	Interpretace
(–) C	Target Not Detected	Kontrola je platná. HCV RNA nebyla detekována.
	Invalid	Neplatný výsledek nebo vypočtený výsledek titru negativní kontroly není negativní.
Pozitivní kontrola	Výsledek	Interpretace
HBV/HCV/HIV-1 L(+)C	Titř	Kontrola je platná. Vypočítaný titř je v rozmezí kontroly.
	Invalid	Neplatný výsledek nebo vypočtený výsledek titru nízké pozitivní kontroly není v přiřazeném rozmezí.
HBV/HCV/HIV-1 H(+)C	Titř	Kontrola je platná. Vypočítaný titř je v rozmezí kontroly.
	Invalid	Neplatný výsledek nebo vypočtený výsledek titru vysoce pozitivní kontroly není v přiřazeném rozmezí.

Vyhodnocení výsledků

Pozn.: Veškerou validaci testů a dávek provádí software cobas® 4800.

Pozn.: Platná dávka může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Interpretace výsledků vzorků platné dávky viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Cílové výsledky pro individuální interpretaci

cobas® HCV	Výsledkový protokol a interpretace
Target Not Detected	HCV RNA nedetekována. Výsledky nahlaste jako „HCV nedetekována“.
< Titer Min	Vypočtený titr je pod spodním limitem kvantifikace (LLoQ) analýzy. Výsledky nahlaste jako „HCV detekována, méně než (min. titr)“. Min. titr = 1,50E+01 IU/ml (400 µl) Min. titr = 2,50E+01 IU/ml (200 µl)
Titr	Vypočtený titr leží v lineárním rozmezí analýzy – větší nebo roven min. titru a menší nebo roven max. titru. Výsledky nahlaste jako „(Titr) HCV detekován“.
> Titer Max ^a	Vypočtený titr je nad horním limitem kvantifikace (ULoQ) analýzy. Výsledky nahlaste jako „HCV detekována, více než (max. titr)“. Max titr = 1,00E+08 IU/ml (400 µl a 200 µl)

^a Výsledek vzorku > „Titer Max“ představuje detekované HCV pozitivní vzorky s titrem nad horním limitem kvantifikace (ULoQ). Je-li požadován kvantitativní výsledek, měl by být originální vzorek rozředěn HCV-negativní EDTA plazmou nebo sérem podle typu původního vzorku; test by měl být zopakován. Vynásobte uváděný výsledek faktorem ředění.

Seznam značek výsledků

Následující tabulka uvádí všechny značky relevantní pro interpretaci výsledků.

Tabulka 3: Seznam značek

Kód značky	Popis	Doporučený úkon
R4800	Cíl je neplatný z důvodu selhání výpočtu.	Cíl je neplatný z důvodu selhání výpočtu. 1. Zopakujte analýzu vzorku. 2. Pokud problém přetrvává, kontaktujte servis společnosti Roche.
R4801	Kvantifikační standard je neplatný.	Kvantifikační standard je neplatný pro daný vzorek. 1. Zopakujte analýzu vzorku. 2. Pokud problém přetrvává, kontaktujte servis společnosti Roche.
R4802	Externí kontrola je neplatná.	Externí kontrola je neplatná. ^a 1. Zopakujte celý cyklus s čerstvými činidly. 2. Pokud problém přetrvává, kontaktujte servis společnosti Roche.
R4803	Kvantifikační standard je neplatný.	Kvantifikační standard je neplatný pro danou externí kontrolu. 1. Zopakujte celý cyklus s čerstvými činidly. 2. Pokud problém přetrvává, kontaktujte servis společnosti Roche.
R4804	Externí kontrola je mimo rozsah.	Externí kontrola je mimo rozsah. ^b 1. Zopakujte celý cyklus s čerstvými činidly. 2. Pokud problém přetrvává, kontaktujte servis společnosti Roche.
X3	Chyba: Byla detekována sraženina. Vzorek nebyl zpracován.	Ověřte, že zpracování vzorků proběhlo podle popisu v pracovním postupu. 1. Zkontrolujte, zda se ve vzorku nenacházejí sraženiny. 2. Zopakujte analýzu vzorku.
X4	Chyba: Došlo k chybě při pipetování. Vzorek nebyl zpracován.	Nejpravděpodobnějším důvodem je nedostatečný objem vzorku nebo mechanická chyba při pipetování. 1. Ověřte, že je k dispozici dostatečný objem vzorku. 2. Zkontrolujte, zda je správně umístěna destička vyhazovače pipetovacích špiček. 3. Zopakujte analýzu vzorku.

^a Toto je značka týkající se vzorku; objeví se, pokud je výsledek externí kontroly v cyklu označen „invalid“.

^b Tato značka se týká všech situací, v nichž je výsledek externí kontroly „invalid“ (označení cílového výsledku nebo titru).

Pozn.: Všechny značky systému jsou vysvětleny uživatelské nápovědě systému cobas® 4800.

Procedurální omezení

1. Test **cobas**® HCV byl vyhodnocen pouze pro použití v kombinaci s kontrolní soupravou HBV/HCV/HIV-1 pro systém **cobas**®, soupravou 2 pro přípravu vzorku pro systém **cobas**® 4800, lytickou soupravou 2 pro systém **cobas**® 4800, soupravou promývacího pufru pro systém **cobas**® 4800 a roztokem 2 pro ředění vzorků pro systém **cobas**® 4800.
2. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, uchovávání a zpracování vzorků. Řiďte se postupy v tomto návodu k použití (také je označován jako příbalová informace) a uživatelské nápovědě systému **cobas**® 4800.
3. Tento test je validován pouze pro vyšetřování EDTA plazmy a séra. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.
4. Kvantifikace HCV RNA závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku, faktory pacienta (tj. věk, příznaky) anebo stádium infekce.
5. I když se vyskytují vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté testem **cobas**® HCV mohou ovlivnit vázání primerů anebo sond, a tak vést k podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.
6. Prediktivní hodnota testu závisí na prevalenci onemocnění v určité populaci.
7. Přidání enzymu AmpErase k činidlu **cobas**® HCV Master Mix umožňuje selektivní amplifikaci cílové nukleové kyseliny. Aby se však předešlo kontaminaci činidel a amplifikačních směsí, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v tomto návodu k použití.
8. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas**® 4800.
9. Pouze přístroj **cobas**® x 480 a analyzátor **cobas**® z 480 byl validován pro použití s tímto produktem. S tímto produktem se nesmí používat žádný jiný přístroj na přípravu vzorků nebo jiný systém PCR.
10. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli ve své laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi. Uživatelé by měli dodržovat své vlastní zásady/postupy.
11. Křížová kontaminace může způsobit falešně pozitivní výsledky. V neklinické studii byla zjištěna křížová kontaminace mezi vzorky v testu **cobas**® HCV ve výši 0,0 %. Křížová kontaminace mezi cykly nebyla pozorována.
12. Test **cobas**® HCV není určen k použití jako skrínigový test pro přítomnost HCV v krvi nebo krevních produktech.

Hodnocení neklinických funkčních parametrů

Klíčové funkční charakteristiky

Mez detekce (Limit of Detection, LoD)

Mezinárodní standard WHO

Mez detekce testu **cobas**® HCV byla zjištěna analýzou sériových ředění mezinárodního standardu WHO HCV RNA genotypu 1a pro analýzy s použitím amplifikační technologie (4. mezinárodního standardu WHO) získaného od NIBSC v HCV-negativní EDTA plazmě nebo séru při objemu zpracování vzorků 400 µl a 200 µl. Panely šesti hladin koncentrace plus negativní vzorek byly testovány na třech šaržích činidel testu **cobas**® HCV při větším počtu cyklů v různých dnech s různou obsluhou a přístroji.

Výsledky pro EDTA plazmu a sérum při obou objemech zpracovávání vzorku viz Tabulka 4 až Tabulka 7. Studie ukazuje, že test **cobas**® HCV detekoval HCV RNA o koncentraci 9,2 IU/ml v EDTA plazmě a 7,6 IU/ml v séru s úspěšností ≥ 95% podle analýzy PROBIT při objemu zpracování vzorků 400 µl a o koncentraci 15,2 IU/ml v EDTA plazmě a 15,3 IU/ml v séru s úspěšností ≥ 95% podle analýzy PROBIT při objemu zpracování vzorků 200 µl.

Tabulka 4: Mez detekce v EDTA plazmě (400 µl)

Vstupní titr koncentrace (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikátů	Počet pozitivních výsledků	Míra detekce
42,0	125	125	100,0 %
21,0	124	124	100,0 %
15,0	125	123	98,4 %
9,0	124	117	94,4 %
5,0	126	103	81,8 %
3,0	125	80	64,0 %
0,0	36	0	0,0 %
LoD podle analýzy PROBIT při 95% úspěšnosti detekce	9,2 IU/ml 95% interval spolehlivosti: 7,8–11,5 IU/ml		

Tabulka 5: Mez detekce v séru (400 µl)

Vstupní titr koncentrace (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikátů	Počet pozitivních výsledků	Míra detekce
42,0	125	125	100,0 %
21,0	126	126	100,0 %
15,0	126	126	100,0 %
9,0	126	120	95,2 %
5,0	126	110	87,3 %
3,0	126	86	68,3 %
0,0	36	0	0,0 %
LoD podle analýzy PROBIT při 95% úspěšnosti detekce	7,6 IU/ml 95% interval spolehlivosti: 6,5–9,5 IU/ml		

Tabulka 6: Mez detekce v EDTA plazmě (200 µl)

Vstupní titr koncentrace (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikátů	Počet pozitivních výsledků	Míra detekce
60,0	126	126	100,0 %
45,0	125	125	100,0 %
25,0	125	125	100,0 %
18,0	124	119	96,0 %
10,0	126	106	84,1 %
5,0	124	69	55,7 %
0,0	36	0	0,0 %
LoD podle analýzy PROBIT při 95% úspěšnosti detekce	15,2 IU/ml 95% interval spolehlivosti: 13,1–18,5 IU/ml		

Tabulka 7: Mez detekce v séru (200 µl)

Vstupní titr koncentrace (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikátů	Počet pozitivních výsledků	Míra detekce
60,0	126	126	100,0 %
45,0	126	126	100,0 %
25,0	126	123	97,6 %
18,0	126	125	99,2 %
10,0	126	106	84,1 %
5,0	125	73	58,4 %
0,0	36	0	0,0 %
LoD podle analýzy PROBIT při 95% úspěšnosti detekce	15,3 IU/ml 95% interval spolehlivosti: 13,1–18,7 IU/ml		

Lineární rozmezí

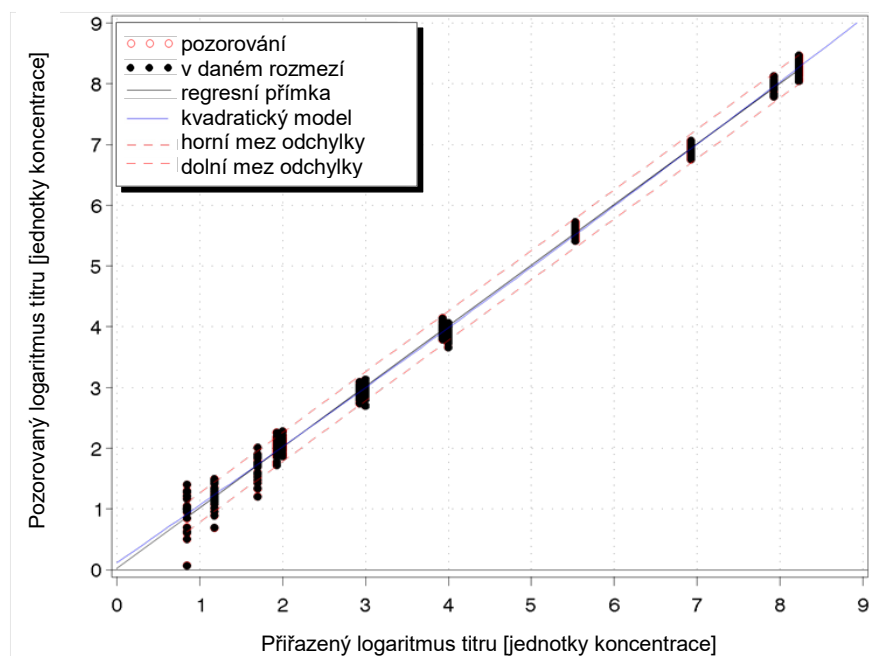
Linearita testu **cobas**® HCV byla zjištěna analýzou panelu se 13 položkami sériových ředění převládajícího genotypu HCV 1a, které pokrývají lineární rozmezí testu. Položky panelu s vysokým titrem byly připraveny ze zásobního roztoku armored RNA (arRNA) s vysokým titrem, zatímco položky panelu s nižším titrem byly připraveny z klinického vzorku (clinical sample, CS). Panel pro určení linearity byl vytvořen tak, aby mezi oběma zdroji materiálu byl překryv titru o velikosti přibližně $2 \log_{10}$.

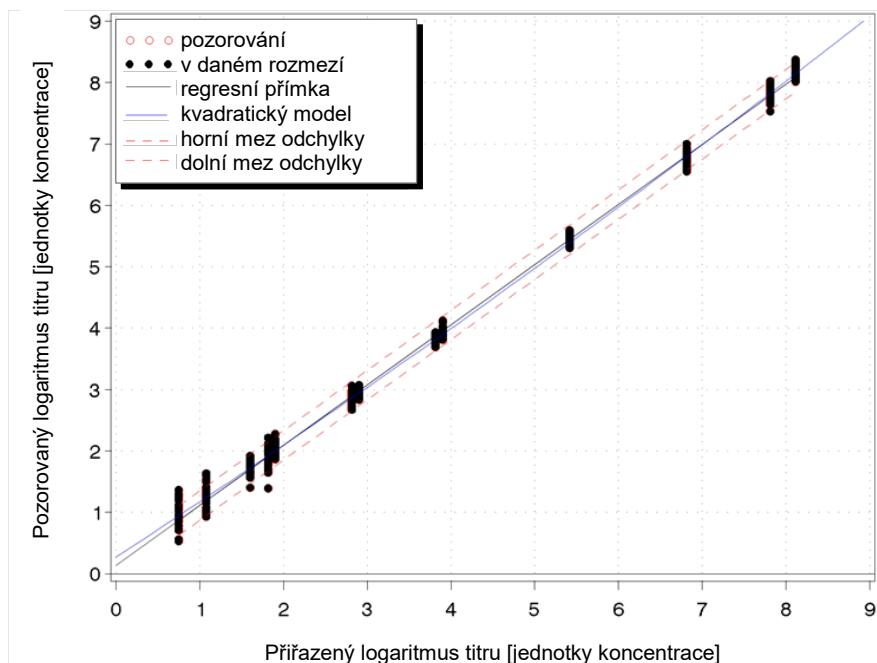
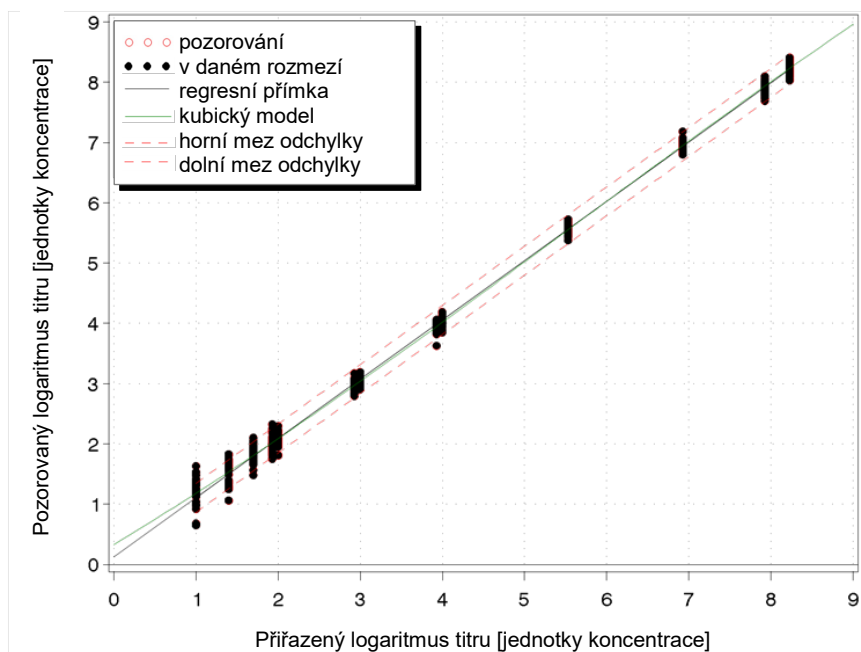
Při objemu zpracování vzorku 400 µl je test **cobas**® HCV lineární pro EDTA plazmu a sérum od 15,0 IU/ml do $1,0E+08$ IU/ml a vykazuje maximální odchylku od lépe se hodící nelineární regrese nižší než $\pm 0,08 \log_{10}$. V lineárním rozmezí byla přesnost testu do $\pm 0,20 \log_{10}$ pro EDTA plazmu a do $\pm 0,23 \log_{10}$ pro sérum.

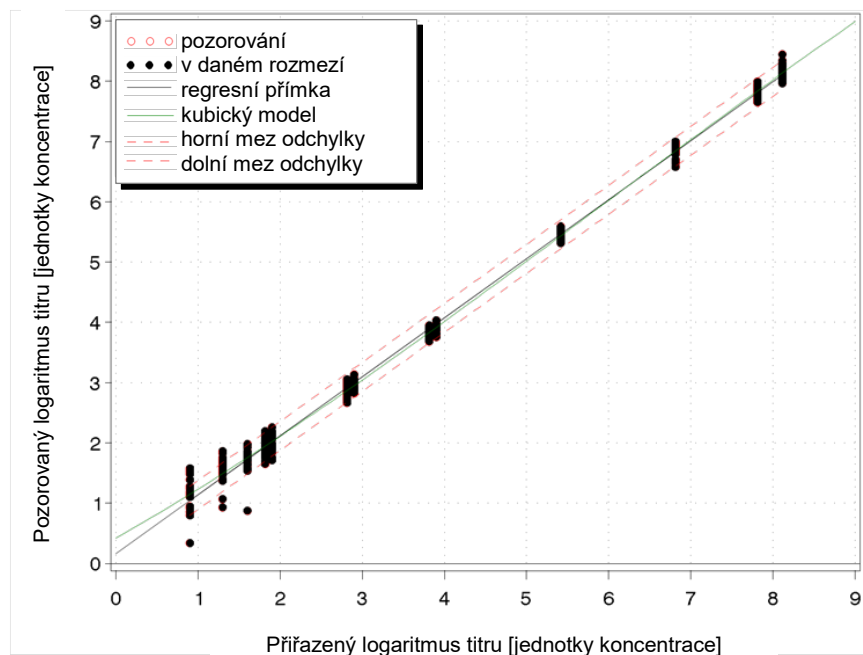
Při objemu zpracování vzorku 200 µl je test **cobas**® HCV lineární pro EDTA plazmu a sérum 25 IU/ml do $1,0E+08$ IU/ml a vykazuje maximální odchylku od lépe se hodící nelineární regrese nižší než $\pm 0,09 \log_{10}$. V lineárním rozmezí byla přesnost testu do $\pm 0,20 \log_{10}$ pro EDTA plazmu a do $\pm 0,25 \log_{10}$ pro sérum.

Reprezentativní výsledky viz Obrázek 2 až Obrázek 5.

Obrázek 2: Linearita v EDTA plazmě (400 µl)



Obrázek 3: Linearita v séru (400 µl)**Obrázek 4:** Linearita v EDTA plazmě (200 µl)

Obrázek 5: Linearita v séru (200 µl)

Přesnost – v rámci jedné laboratoře

Přesnost testu **cobas®** HCV byla zjištěna analýzou sériových ředění klinických vzorků (CS) HCV (genotyp 1a) a armored RNA HCV (arRNA) v HCV-negativní EDTA plazmě a séru. Bylo testováno pět hladin ředění v 72 replikátech pro každou hladinu, matrici a objem zpracování vzorku u tří šarží činidel testu **cobas®** HCV při použití dvou přístrojů a tří obsluh v intervalu 12 dní. Každý vzorek prošel úplnou procedurou **cobas®** HCV na systému **cobas®** 4800. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Výsledky viz Tabulka 8 až Tabulka 11.

Test **cobas®** HCV vykázal vysokou přesnost u tří šarží činidel testovaných v rozsahu koncentrace od 1,0E+03 IU/ml do 1,0E+08 IU/ml při objemu zpracování vzorku 200 µl i 400 µl.

Tabulka 8: Přesnost testu **cobas®** HCV v rámci jedné laboratoře (vzorky EDTA plazmy – objem zpracování vzorku 400 µl)*

Nominální koncentrace (IU/ml)	Přiřazená koncentrace (IU/ml)	Zdrojový materiál	EDTA plazma			
			Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Všechny šarže
			Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch. směsi
1,0E+08	8,5E+07	arRNA	0,05	0,06	0,05	0,06
1,0E+07	8,5E+06	arRNA	0,06	0,06	0,06	0,06
4,0E+05	3,4E+05	arRNA	0,06	0,05	0,06	0,06
1,0E+04	9,9E+03	CS	0,10	0,10	0,10	0,10
1,0E+03	9,9E+02	CS	0,09	0,08	0,07	0,08

* Distribuce logaritmu titrů je pokládána za normální; data jsou analyzována po logaritmické ($\log_{10}$) transformaci. Sloupce směrodatné odchylky (SD) uvádějí souhrnný logaritmický titr pro každou ze tří šarží činidel.

Tabulka 9: Přesnost testu cobas® HCV v rámci jedné laboratoře (vzorky séra – objem zpracování vzorku 400 µl)*

Nominální koncentrace (IU/ml)	Přiřazená koncentrace (IU/ml)	Zdrojový materiál	Sérum			
			Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Všechny šarže
			Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch. směsi
1,0E+08	6,5E+07	arRNA	0,07	0,12	0,14	0,12
1,0E+07	6,5E+06	arRNA	0,07	0,07	0,09	0,08
4,0E+05	2,6E+05	arRNA	0,07	0,06	0,07	0,07
1,0E+04	7,9E+03	CS	0,07	0,05	0,08	0,07
1,0E+03	7,9E+02	CS	0,07	0,05	0,06	0,06

* Distribuce logaritmu titrů je pokládána za normální; data jsou analyzována po logaritmické ($\log_{10}$) transformaci. Sloupce směrodatné odchylky (SD) uvádějí souhrnný logaritmický titr pro každou ze tří šarží činidel.

Tabulka 10: Přesnost testu cobas® HCV v rámci jedné laboratoře (EDTA plazma – objem zpracování vzorku 200 µl)*

Nominální koncentrace (IU/ml)	Přiřazená koncentrace (IU/ml)	Zdrojový materiál	EDTA plazma			
			Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Všechny šarže
			Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch. směsi
1,0E+08	8,5E+07	arRNA	0,07	0,09	0,06	0,07
1,0E+07	8,5E+06	arRNA	0,05	0,05	0,05	0,05
4,0E+05	3,4E+05	arRNA	0,04	0,05	0,07	0,05
1,0E+04	9,9E+03	CS	0,06	0,06	0,07	0,06
1,0E+03	9,9E+02	CS	0,06	0,07	0,05	0,06

* Distribuce logaritmu titrů je pokládána za normální; data jsou analyzována po logaritmické ($\log_{10}$) transformaci. Sloupce směrodatné odchylky (SD) uvádějí souhrnný logaritmický titr pro každou ze tří šarží činidel.

Tabulka 11: Přesnost testu cobas® HCV v rámci jedné laboratoře (sérum – objem zpracování vzorku 200 µl)*

Nominální koncentrace (IU/ml)	Přiřazená koncentrace (IU/ml)	Zdrojový materiál	Sérum			
			Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Všechny šarže
			Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch.	Směrod. odch. směsi
1,0E+08	6,5E+07	arRNA	0,05	0,06	0,06	0,06
1,0E+07	6,5E+06	arRNA	0,07	0,07	0,05	0,06
4,0E+05	2,6E+05	arRNA	0,08	0,05	0,07	0,07
1,0E+04	7,9E+03	CS	0,04	0,04	0,04	0,04
1,0E+03	7,9E+02	CS	0,04	0,06	0,05	0,05

* Distribuce logaritmu titrů je pokládána za normální; data jsou analyzována po logaritmické ($\log_{10}$) transformaci. Sloupce směrodatné odchylky (SD) uvádějí souhrnný logaritmický titr pro každou ze tří šarží činidel.

Verifikace genotypů

Účinnost testu **cobas®** HCV u různých genotypů HCV byla vyhodnocena pomocí:

- Verifikace meze detekce u genotypů 1b až 6
- Verifikace linearity u genotypů 1b až 6
- Přiřazení titru bylo provedeno pomocí testu **cobas®** HCV.

Verifikace meze detekce u genotypů 1b až 6

Klinické vzorky HCV RNA šesti různých genotypů (1b, 2, 3, 4, 5, 6) byly zředěny EDTA plazmou a sérem do LoD koncentrace EDTA plazmy převažujícího genotypu (HCV GT 1a) na základě analýzy LoD při 95% úspěšnosti (15,0 IU/ml). Analýza úspěšnosti byla provedena se 42 replikáty pro každý genotyp a matici vzorku. Tyto výsledky potvrzují, že test **cobas®** HCV detekoval HCV u genotypů HCV 1b, 2, 3, 4, 5 a 6 při koncentraci 15 IU/ml s horním jednostranným 95% intervalem spolehlivosti větším než očekávaná 95% úspěšnost.

Tabulka 12: Verifikace LoD genotypů HCV 1b–6 ve 400 µl EDTA plazmy

Genotyp	Míra detekce	Horní jednostranný 95% interval spolehlivosti
GT 1b	95,2 %	99,1 %
GT 2	100,0 %	100,0 %
GT 3	100,0 %	100,0 %
GT 4	100,0 %	100,0 %
GT 5	100,0 %	100,0 %
GT 6	97,6 %	99,9 %

Tabulka 13: Verifikace LoD genotypů HCV 1b–6 ve 400 µl séra

Genotyp	Míra detekce	Horní jednostranný 95% interval spolehlivosti
GT 1b	100,0 %	100,0 %
GT 2	100,0 %	100,0 %
GT 3	100,0 %	100,0 %
GT 4	100,0 %	100,0 %
GT 5	100,0 %	100,0 %
GT 6	100,0 %	100,0 %

Verifikace lineárního rozmezí u genotypů 1b až 6

Sériové ředění použité ve studii verifikace linearity testu **cobas**® HCV pro různé genotypy sestává z devíti položek panelu pokrývajících předpokládaný rozsah linearity. Položky panelu s vysokým titrem byly připraveny ze zásobního roztoku arRNA s vysokým titrem, zatímco položky panelu s nižším titrem byly připraveny z klinického vzorku s vysokým titrem (CS). Panel pro určení linearity byl vytvořen tak, aby mezi oběma zdroji materiálu byl překryv titru o velikosti nejméně 2 log₁₀. Lineární rozmezí testu **cobas**® HCV sahá od LLoQ (15,0 IU/ml pro objem zpracování vzorku 400 µl) do ULoQ (1,0E+08 IU/ml) a zahrnuje nejméně dva body pro lékařská rozhodnutí. U EDTA plazmy bylo testováno dvanáct replikátů na každé hladině.

Lineární rozsah testu **cobas**® HCV byl ověřen pro všech šest genotypů (1b, 2, 3, 4, 5 a 6). Maximální odchylka mezi lineární regresí a lépe se hodící nelineární regresí byla menší nebo rovna 0,14 log₁₀.

Specifická

Specifická testu **cobas**® HCV byla zjištěna analýzou vzorků HCV-negativní EDTA plazmy a séra od individuálních dárců. 612 individuálních vzorků EDTA plazmy a 613 individuálních vzorků séra (celkem 1225 výsledků) bylo testováno se třemi šaržemi činidel **cobas**® HCV. 609 vzorků EDTA plazmy a 613 vzorků séra mělo negativní test pro HCV RNA. Specifická testu **cobas**® HCV v panelu byla 99,5 % u plazmy (95% mez spolehlivosti: ≥ 98,7 %) a 100,0% u séra (95% mez spolehlivosti: ≥ 99,5 %).

Analytická specifická

Analytická specifická testu **cobas**® HCV byla vyhodnocena zředěním panelu patogenů (Tabulka 14) EDTA plazmou pozitivní na HCV RNA a negativní na HCV RNA. Patogeny byly přidány do negativní EDTA plazmy a testovány s HCV RNA i bez ní. Test **cobas**® HCV poskytl negativní výsledky u všech vzorků patogenů bez cílové sekvence HCV a pozitivní výsledky u všech vzorků patogenů s cílovou sekvencí HCV. Navíc byl průměrný log₁₀ titr každého z HCV pozitivních vzorků obsahujících potenciálně zkříženě reagující organismy v rozmezí ± 0,09 log₁₀ průměrného log₁₀ titru odpovídající přidané pozitivní kontroly.

Tabulka 14: Patogeny testované pro zkříženou reaktivitu

Viry		Baktérie	Kvasinky
Adenovirus typ 5	Virus Herpes simplex typ 1 a 2	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>
Cytomegalovirus	Lidský papillomavirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Virus Dengue typ 1, 2, 3 a 4	Virus chřipky A		
Virus Epstein-Barrové	Virus encefalitidy Murray Valley		
Virus FSME (kmen HYPR)	Virus St. Louiské encefalitidy		
Virus hepatitidy A	Virus Varicella zoster		
Virus hepatitidy B	Virus Západního Nilu		
Virus lidského imunodeficitu-1	Virus žluté zimnice		
Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 1 a 2	Zika virus		
Lidský herpes virus typ 6			

Analytická specifická – interferenční látky

Zvýšené hladiny triglyceridů (27,9–29,0 g/l), konjugovaný bilirubin (0,18–0,22 g/l), nekonjugovaný bilirubin (0,19–0,2 g/l), albumin (57,8–60,6 g/l), hemoglobin (1,8–2,3 g/l) a lidská DNA (2 mg/l) ve vzorcích byly testovány v přítomnosti i nepřítomnosti HCV RNA. Ukázalo se, že u testovaných látek nedochází k interferenci s účinností testu **cobas®** HCV. Navíc byly provedeny testy na přítomnost markerů autoimunních onemocnění systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida a antinukleární protilátky.

Navíc byly testovány látky léčiv, které uvádí Tabulka 15, při hodnotách trojnásobku $C_{\max}$ v přítomnosti i nepřítomnosti HCV RNA.

Ukázalo se, že u žádné z potenciálně interferujících látek nedochází k interferenci s účinností testu. Test **cobas®** HCV poskytl negativní výsledky u všech vzorků bez cílové sekvence HCV a pozitivní výsledky u všech vzorků s cílovou sekvencí HCV. Navíc byl průměrný $\log_{10}$ titr každého z HCV pozitivních vzorků obsahujících potenciálně interferujících látky v rozmezí $\pm 0,04 \log_{10}$ průměrného $\log_{10}$ titru odpovídající přidané pozitivní kontroly.

Tabulka 15: Látky léčivé testované na interferenci s kvantifikací HCV RNA pomocí testu **cobas® HCV**

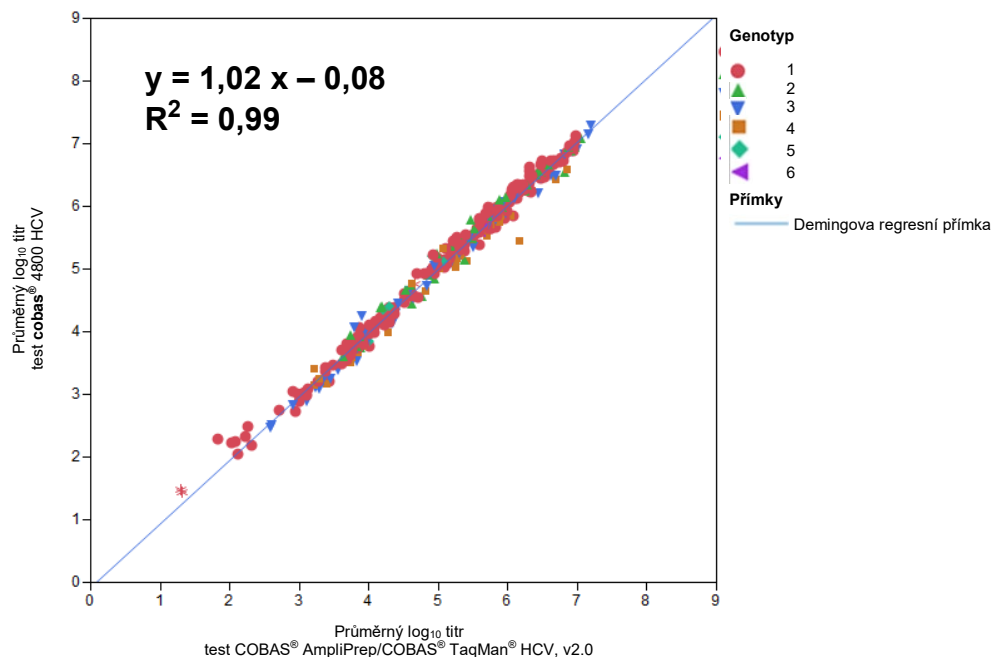
Třída léčiva	Generický název léčiva	
Imunomodulátory	Peginterferon α -2a	Ribavirin
	Peginterferon α -2b	
Inhibitory vstupu HIV	Maraviroc	
Inhibitory HIV integrázy	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Nenukleozidové inhibitory HIV reverzní transkriptázy	Efavirenz	Nevirapin
	Etravirin	Rilpivirin
Inhibitory HIV proteázy	Atazanavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
	Lopinavir	Tipranavir
Inhibitory HCV proteázy	Boceprevir Simeprevir	Telaprevir
Inhibitory reverzní transkriptázy nebo DNA polymerázy	Abacavir	Gancyklovir
	Acyklovir	Lamivudin
	Adefovir dipivoxil	Sofosbuvir
	Cidofovir	Telbivudin
	Emtricitabin	Tenofovir
	Entekavir	Valgancyklovir
	Foscarnet	Zidovudin
Látky pro léčbu oportunních infekcí	Azitromycin	Pyrazinamid
	Klaritromycin	Rifabutin
	Ethambutol	Rifampicin
	Fluconazole	Sulfamethoxazol
	Isoniazid	Trimethoprim

Korelace metody

Vyhodnocení účinnosti testu **cobas® HCV** ve srovnání s kvantitativním testem **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0**

Účinnost testu **cobas® HCV** a kvantitativního testu **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0** (TaqMan® HCV Test, v2.0) byla porovnána analýzou vzorků séra a EDTA plazmy od pacientů infikovaných HCV. Celkově bylo analyzováno v duplikátu 176 vzorků EDTA plazmy a 176 vzorků séra zahrnujících všechny genotypy HCV; všechny vzorky byly platné a nacházely se v kvantifikačním rozmezí obou testů. Byla provedena regresní analýza dle Deminga. Průměrná odchylka vzorků testovaných oběma testy byla 0,0 log₁₀ (95% interval spolehlivosti: -0,01; 0,01).

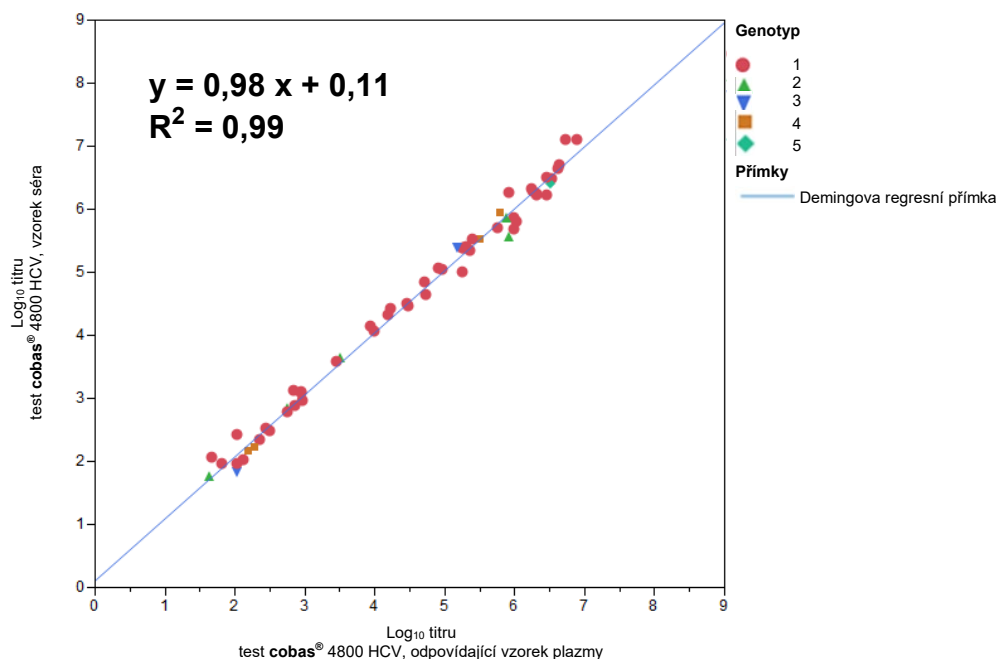
Výsledky regrese dle Deminga uvádí Obrázek 6. Symbol * v číslech znamená jedno stanovení. Barva označuje genotyp.

Obrázek 6: Regresní analýza testu cobas® HCV ve srovnání s testem TaqMan® HCV, v2.0 se vzorky EDTA plazmy a séra

Ekvivalence matrice – EDTA plazma ve srovnání se sérem

Ekvivalence matrice byla analyzována u 114 párů vzorků EDTA plazmy a séra. Z nich bylo 59 párů vzorků pozitivních na HCV. HCV pozitivní vzorky pokryly genotypy 1 až 5 v lineárním rozmezí.

Průměrná odchylka titrů změřených u párových vzorků EDTA plazmy a séra byla 0,04 log₁₀ (95% interval spolehlivosti: 0,00; 0,08) (Obrázek 7).

Obrázek 7: Výsledky ekvivalence matrice pro EDTA plazmu a sérum

Selhání celého systému

Míra selhání celého systému testu **cobas**® HCV byla zjištěna testováním 100 replikátů EDTA plazmy s přidanou cílovou sekvencí HCV. Tyto vzorky byly testovány při přibližné koncentraci $3 \times \text{LLoQ}$ (45,0 IU/ml).

Z této studie vyplynulo, že všechny replikáty byly platné a pozitivní na HCV, což znamená výslednou míru selhání celého systému ve výši 0,0 %. Dvoustranný 95% přesný interval spolehlivosti byl 0,0 % pro dolní mez a 3,6 % pro horní mez [0,0%: 3,6%].

Zkřížená kontaminace

Míra zkřížené kontaminace byla u testu **cobas**® HCV zjištěna analýzou 230 replikátů HCV-negativních vzorků EDTA plazmy a 235 replikátů vzorku s vysokým titrem HCV $1,8\text{E}+08$ IU/ml. Celkem bylo provedeno pět cyklů s pozitivními a negativními vzorky uspořádanými do šachovnice.

229 ze 230 replikátů negativních vzorků bylo platných a detekovaných jako negativní, s výslednou mírou zkřížené kontaminace 0,0 % s jednostranným 95% intervalem spolehlivosti 1,3 %.

Doplňující informace

Hlavní parametry testu

Typ vzorku	EDTA plazma, sérum
Objem pro zpracování vzorku	400 µl nebo 200 µl
Analytická citlivost	9,2 IU/ml (400 µl)
	15,3 IU/ml (200 µl)
Lineární rozmezí	400 µl: 15,0 IU/ml – 1,0E+08 IU/ml
	200 µl: 25,0 IU/ml – 1,0E+08 IU/ml
Specifická	99,5 % (jednostranný 95% interval spolehlivosti: 98,7 %)
Detekované genotypy	Genotypy HCV 1–6

Symbols

V označování diagnostických produktů společnosti Roche PCR se používají následující symboly.

Tabulka 16: Symboly použité při označování diagnostických produktů PCR společnosti Roche

Age/DOB Věk nebo datum narození	Prostředek není pro testování u lůžka pacienta	QS IU/PCR QS IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (UI) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.
Pomocný software	Prostředek není určen pro samotestování	SN Sériové číslo
Assigned Range [copies/mL] Přiřazené rozmezí (kopie/mL)	Distributor (Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.)	Site Pracoviště
Assigned Range [IU/mL] Přiřazené rozmezí (IU/mL)	Nepoužívat opakovaně	Procedure Standard Standardní postup
EC REP Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství	Žena	STERILE EO Sterilizováno ethylenoxidem
BARCODE Datový list s čárovými kódy	Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD	Uchovávejte v temnu
LOT Číslo šarže	GTIN Globální číslo obchodní položky	Omezení teploty
Biologická rizika	Dovozce	Definiční soubor testu
REF Katalogové číslo	IVD Zdravotnický prostředek pro <i>in vitro</i> diagnostiku	Neklopit
Značka shody CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro značku shody CE pro diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>	LLR Dolní mez přiřazeného rozmezí	Procedure UltraSensitive Ultracitlivý postup
Collect Date Datum odběru	Muž	UDI Jedinečná identifikace prostředku
Čtěte návod k použití	Výrobce	ULR Horní mez přiřazeného rozmezí
Obsah vystačí pro <n> testů	CONTROL - Negativní kontrola	Urine Fill Line Hladina pro naplnění moči
CONTENT Obsah soupravy	Nesterilní	Rx Only Pouze pro USA: podle federálního zákona smí být tento prostředek prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.
CONTROL Kontrola	Jméno pacienta	Datum expirace
Datum výroby	Číslo pacienta	
Prostředek pro testování u lůžka pacienta	Zde odloupnout	
Prostředek pro samotestování	CONTROL + Pozitivní kontrola	
	QS copies / PCR Kopie QS na reakci PCR, použijte kopie QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.	

Technická podpora

Pro technickou podporu (asistenci) kontaktujte místní zastoupení:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Výrobce

Tab. 17: Výrobce



Vyrobeno ve Spojených státech

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Vyrobeno v USA

Ochranné známky a patenty

Viz <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Autorská práva

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Literatura

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-362.
2. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):705-714.
3. Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol*. 2007;42(7):513-521.
4. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
5. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1485-1492.
6. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1493-1499.
7. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-965.
8. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-982.
9. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140(5):346-355.
10. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) Practice Guidelines. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update *Hepatology*. 2009;49(4):1335-1374.
11. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433-1444.
12. Poordad F, McCone J, Jr, Bacon BR, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1195-1206.
13. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2405-2416.
14. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1207-1217.
15. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2417-2428.
16. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, t al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1878-1887.
17. Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1867-1877.
18. Liang TJ, Ghany MG. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1907-1917.

19. Rutter K, Hofer H, Beinhardt S, et al. Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon-alpha2a/ribavirin in combination with a direct-acting anti-viral. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(2):118-123.
20. European Association for the Study of the Liver (EASL) Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2014. Available at: http://www.easl.eu/_newsroom/latest-news/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-c-2014.
21. Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis.* 2003; 7:127-137.
22. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-128.
23. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature.* 1995;373:487-493.
24. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell.* 1995;80:869-878.
25. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992;10:413-417.
26. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
27. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revize dokumentu

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 7.0 02/2024	Byly aktualizovány informace o rizicích lyzačních souprav 2. Aktualizovaná stránka s harmonizovanými symboly. Přidána část Technická podpora. Byl aktualizován oddíl Ochranné známky a patenty včetně odkazu. Aktualizace na současné hospodářské subjekty. Přidán výrok „Vyrobeno v“. Bylo aktualizováno označení značkou cobas®. Přidán symbol „Rx Only“. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.
Doc Rev. 8.0 08/2024	Z přední strany byl vypuštěn symbol „Rx Only“. Byly aktualizovány informace o rizicích týkající se souprav Wash Buffer Kit. Aktualizovaná stránka s harmonizovanými symboly. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.