

# COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative Test, version 2.0

URČENÉ NA DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV  
Qualitative Test, v2.0

HCVQLV2

72 Tests

P/N: 05480477 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®  
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

## Obsah

ÚČEL POUŽITIA .....	1
SÚHRNNÉ INFORMÁCIE A VYSVETLENIE TESTU .....	2
PRINCÍPY PROCEDÚRY .....	2
ČINIDLÁ .....	4
VÝSTRAHY A PROCEDURÁLNE PREVENTÍVNE OPATRENIA .....	6
POŽIADAVKY NA SKLADOVANIE A MANIPULÁCIU .....	7
DODÁVANÉ MATERIÁLY .....	7
POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY .....	8
ODBER, PREPRAVA A SKLADOVANIE VZORIEK .....	9
NÁVOD NA POUŽITIE .....	9
KONTROLA KVALITY .....	12
VÝSLEDKY .....	13
PROCEDURÁLNE OBMEDZENIA .....	14
RUŠIVÉ LÁTKY .....	15
HODNOTENIE NEKLINICKEJ ÚČINNOSTI .....	15
REFERENCIE .....	20

## ÚČEL POUŽITIA

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je kvalitatívny test amplifikácie kyseliny nukleovej *in vitro*, ktorý sa vykonáva na detekciu vírusu hepatitídy C (HCV) RNA genotypov 1 až 6 v ľudskej plazme EDTA alebo v sére pri použití zariadenia COBAS® AmpliPrep na automatizované spracovanie vzoriek a analyzátora COBAS® TaqMan® alebo analyzátora COBAS® TaqMan® 48 na automatizovanú amplifikáciu a detekciu. Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je indikovaný pre pacientov s klinicky alebo biochemicky preukázaným ochorením pečene a protilátkami preukázanou infekciou HCV a pre pacientov s podozrením na aktívnu infekciu HCV. Test môže byť použitý na potvrdenie vzoriek pozitívnych na protilátky. Detekcia HCV RNA ukazuje, že vírus sa množí, ide teda o dôkaz aktívnej infekcie.

**Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 nie je určený na skríning za účelom zistenia prítomnosti HCV v krvi alebo krvných produktoch.**

## SÚHRNNÉ INFORMÁCIE A VYSVETLENIE TESTU

Vírus hepatitídy C sa považuje za základného pôvodcu zodpovedného za 90 až 95 % prípadov post-transfúznej hepatitídy<sup>1,4</sup>. HCV je pozitívny RNA vírus s jednoduchým reťazcom s genómom približne 9500 nukleotidov s približne 3000 zakódovanými aminokyselinami. Ako každý krvou prenášaný vírus sa aj HCV môže prenášať krvou a krvnými produktmi. Rozsiahle prijatie opatrení HCV krvného skríningu rapídne znížilo riziko vzniku hepatitídy súvisiace s transfúziou. Najvyššie percento infekcie HCV vzniká v súvislosti s nesprávnou intravenóznou aplikáciou liečiv; v menšej miere k nemu dochádza v súvislosti s inými postupmi<sup>4</sup>. Rozšírenie infekcie HCV (podľa stanovenia imunoserológie) dosahuje 0,6 % v Kanade až po 1,5 % v Japonsku<sup>3</sup>. Úroveň spontánneho zníženia hladiny vírusu u vystavených jednotlivcov sa značne odlišujú: klinickými meraniami normalizácie pečeňových enzýmov a zníženia hladiny plazmy HCV RNA boli zistené úrovne v rozpätí od 10 do 60 %<sup>5</sup>.

Vírusové častice HCV nie je možné kultivovať z infikovaných vzoriek krvi, preto prítomnosť anti-HCV protilátok u pacientov s HCV viedla k vývoju imunoserologických testov, špecifických pre tieto protilátky. Prítomnosť anti-HCV protilátok je znamením predchádzajúcej HCV infekcie, túto skutočnosť však nemožno považovať za marker pre existujúcu infekciu. Meranie hladín alanin aminotransferázy (ALT) sa považuje za náhradný indikátor infekcie HCV, nejde však o priame meranie virémie.

Detekcia HCV RNA prostredníctvom kyseliny nukleovej môže však poskytnúť dôkaz o existencii infekcie. Pomocou testov kyseliny nukleovej je možné zistiť prítomnosť HCV vírusu v krvi ešte pred imunologickou sérokonverziou<sup>6,7</sup>. Keďže testy kyseliny nukleovej dokážu priamo zistiť HCV RNA (t.j. nezávisle od imunologického stavu pacienta), test kyseliny nukleovej je dôležitým nástrojom pri zisťovaní HCV RNA u imunologicky ohrozených pacientov<sup>8</sup>.

## PRINCÍPY PROCEDÚRY

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je amplifikačný test kyseliny nukleovej určený na detekciu RNA vírusu hepatitídy C (HCV) v ľudskom sére alebo EDTA plazme. Príprava vzorky je automatizovaná (používa sa zariadenie COBAS® AmpliPrep) a amplifikácia a detekcia je taktiež automatizovaná (používa sa analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48).

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je založený na troch najvýznamnejších postupoch: (1) príprava vzorky za účelom izolácie HCV RNA; (2) reverzná transkripcia cieľovej RNA za účelom generovania komplementárnej DNA (cDNA) a (3) súčasná PCR amplifikácia cieľovej cDNA a detekcia rozštiepenej duálne označenej oligonukleotidickej detekčnej sondy špecifickej z hľadiska cieľa.

### Príprava vzorky

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 využíva automatizovanú prípravu vzorky v zariadení COBAS® AmpliPrep záchytnou technikou založenou na oxide kremičitom. Vstupný objem vzorky je 650 µl, pričom sa procedúrou spracúva 500 µl EDTA plazmy alebo séra. Vírusové častice HCV sa rozkladajú inkubáciou pri zvýšenej teplote a obsahu proteázy a chaotropického dezintegrátneho/väzbového roztoku, ktorý uvoľňuje nukleové kyseliny a chráni uvoľnenú HCV RNA pred RNázou v sére alebo EDTA plazme. Do každej vzorky sa zaviede proteáza a známy počet molekúl HCV Vnútna kontrolná vzorka (IC) RNA spolu s dezintegrátnym činidlom a čistočkami z magnetického skla. Následne sa zmes inkubuje a HCV RNA a HCV IC RNA sa naviažu na povrch čistočiek z magnetického skla. Nena viazané látky, ako sú soli, proteíny a iné bunkové nečistoty sa odstránia premývaním čistočiek z magnetického skla. Po oddelení čistočiek a ukončení premývania dôjde k vylúhovaniu adsorbovaných nukleových kyselín pri zvýšenej teplote pomocou vodného roztoku. Spracovaná vzorka obsahujúca čistočky uvoľnenej HCV RNA a HCV IC RNA sa pridá do amplifikačnej zmesi a prenesie sa do analyzátora COBAS® TaqMan® alebo analyzátora COBAS® TaqMan® 48.

## Reverzná transkripcia a PCR amplifikácia

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 využíva reverznú transkripciu HCV RNA za účelom vytvorenia komplementárnej DNA (cDNA) a PCR amplifikácie cDNA pomocou primerov, ktoré definujú sekvenciu v rámci vysoko zachovaného 5'-UTR regiónu HCV genómu<sup>9</sup>. Nukleotická sekvencia primerov bola optimalizovaná za účelom dosiahnutia komparatívnej amplifikácie HCV genotypov 1 až 6. Reakcia reverznej transkripcie a PCR amplifikácie sa vykonáva s použitím optimalizovanej zmesi tepelne stabilných rekombinačných enzýmov: Z05 a Z05D DNA polymeráza. Za prítomnosti mangánu (Mn<sup>2+</sup>) a v rámci príslušných podmienok tlmenia vykazujú Z05 a Z05D aktivitu reverznej transkripcie a DNA polymerázy. Týmto je možné dosiahnuť reverznú transkripciu a PCR amplifikáciu spolu s detekciou amplikóna v reálnom čase.

Spracované vzorky sa vkladajú do amplifikačnej zmesi v amplifikačných skúmavkách (K-skúmavky), v ktorých dochádza k reverznej transkripcii a PCR amplifikácii. Reakčná zmes sa zahreje, aby sa antimediátorový primer uvoľnil do HCV cieľovej RNA a do HCV IC RNA. Za prítomnosti Mn<sup>2+</sup> a prebytku deoxynukleozid trifosfátov (dNTPs) vrátane deoxyadenozín, deoxyguanozín, deoxycytidín a deoxyuridín trifosfátov rozširí Z05 a Z05D polymerázy uvoľnené primery tak, že sa vytvorí reťazec DNA komplementárny s cieľovou RNA.

### Amplifikácia cieľa

Následne po uskutočnení reverznej transkripcie HCV cieľovej RNA a HCV IC RNA tepelný cyklovač v analyzátoch COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 zahreje reakčnú zmes za účelom denaturácie hybridu RNA:cDNA a expozície špecifických cieľových sekvencií primeru. Ako zmes chladne, primery sa pripájajú k cDNA cieľa. Tepelne stabilné DNA polymerázy (Z05 a Z05D) za prítomnosti Mn<sup>2+</sup> a prebytku deoxynukleotických trifosfátov (dNTP) rozširí uvoľnené primery v cieľovej šablóne, čím sa vytvorí DNA molekula s dvoma reťazcami, ktorá sa nazýva amplikón. Analyzátor COBAS® TaqMan® alebo analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky opakuje tento proces v určenom počte cyklov, pričom každý cyklus zdvojnásobuje počet amplikónov DNA. Požadovaný počet cyklov je v analyzátoch COBAS® TaqMan® alebo analyzátoch COBAS® TaqMan® 48 naprogramovaný. K amplifikácii dochádza len v rámci HCV genómu medzi primermi; celý genóm HCV nie je amplifikovaný.

### Selektívna amplifikácia

Selektívna amplifikácia cieľovej kyseliny nukleovej zo vzorky sa dosiahne v rámci kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 prostredníctvom použitia enzýmu AmpErase (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridín trifosfátu (dUTP). Enzým AmpErase rozpoznáva a katalyzuje rozpad reťazcov DNA obsahujúcich deoxyuridín<sup>10</sup>, nie však DNA, ktorá obsahuje deoxytimidín. Deoxyuridín sa bežne v DNA nevyskytuje, ale vždy je prítomný v amplikóne, kvôli použitiu deoxyuridín-trifosfátu ako jedného z dNTP v činidle Master Mix, preto len amplikón obsahuje deoxyuridín. Deoxyuridín spôsobuje, že kontaminovaný amplikón je citlivý voči rozpadu enzýmom AmpErase ešte pred amplifikáciou cieľovej DNA. Nešpecifický produkt, ktorý vznikne po pôvodnej aktivácii činidla Master Mix mangánom, preto bude enzýmom AmpErase zničený. Enzým AmpErase, ktorý je súčasťou činidla Hlavnéj zmesi, katalyzuje rozpad DNA obsahujúcich deoxyuridín v zvyškoch deoxyuridínu tým, že otvára reťazec deoxyribózy v polohe C1. Pri zahrievaní v prvom kroku termocyklovania sa reťazec amplikónovej DNA štiepi v mieste deoxyuridínu, čím sa DNA stáva neamplifikovateľnou. Po vystavení teplotám nad 55 °C ostáva enzým AmpErase dlhodobo neaktívny (t. j. počas krokov tepelného cyklu) a preto nedochádza k zničeniu amplikóna vytvoreného počas uskutočnenia PCR reakcie.

### Detekcia rozštiepených duálne označených sond a HCV RNA

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 využíva technológiu PCR v reálnom čase<sup>14,15</sup>. Použitie duálne označených fluorescenčných sond umožňuje detekciu akumulácie PCR produktov v reálnom čase prostredníctvom monitorovania intenzity emisie fluorescenčného signalizačného farbiva uvoľneného v priebehu amplifikačného procesu. Sondy pozostávajú z oligonukleotidov špecifických na HCV a HCV IC označených špecifickým signalizačným a tlmiacim farbivom. V kvalitatívnom teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 sú sondy HCV a HCV IC označené odlišnými fluorescenčnými signalizačnými farbivami. Ak sú tieto sondy nedotknuté, fluorescencia oznamovacieho farbiva je potlačená blízkosťou tlmiaceho farbiva účinkami prenosu energie Försterovho typu. Počas PCR sa sonda hybriduje na cieľovú sekvenciu a je rozštiepená 5' → 3' aktivitou nukleázy termostabilných Z05 a Z05D DNA polymeráz. Po uvoľnení oznamovacích a tlmiacich farbív a ich oddelení sa tlmenie už viac nevyskytuje a fluorescenčná aktivita oznamovacieho farbiva sa zvyšuje. Amplifikácia HCV RNA a HCV IC RNA sa meria nezávisle pri odlišných vinových dĺžkach. Tento proces sa opakuje pre určený počet cyklov, pričom každý cyklus efektívne zvyšuje emisnú intenzitu jednotlivého signalizačného farbiva, čo umožňuje nezávislú identifikáciu HCV RNA a HCV IC RNA.

V amplifikačnom postupe založenom na nukleovej kyseline môžu účinnosť znižovať inhibítory, ktoré môžu byť prítomné vo vzorke. HCV IC bola pridaná do kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 na umožnenie identifikácie spracovaných vzoriek obsahujúcich látky, ktoré môžu narušovať PCR amplifikáciu. HCV IC je neinfečný obrazec Armored RNA (aRNA), ktorý obsahuje fragmenty HCV sekvencií s identickým väzbovým primerom ako cieľová HCV RNA a unikátny sondový väzbový región, ktorý umožňuje rozpoznať amplicón HCV IC od cieľového amplicóna HCV. Služí ako extrakčná a amplifikačná kontrolná látka pre každú nezávisle spracovanú vzorku.

Počas fázy predĺženia PCR v analyzátore COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 sa vzorky osvetľujú a nabudujú filtrovaným svetlom a fluorescenčné údaje filtrovanej emisie sa zbierajú pre každú vzorku. Odčítané hodnoty pre každú vzorku sa potom korigujú na prístrojové odchýlky. Tieto odčítané hodnoty fluorescencie sa odosielať prístrojom do softvéru AMPLILINK a uchovávajú v databáze. Predbežné kontroly sa využívajú na stanovenie skutočnosti, či sú sady dát HCV RNA a HCV IC RNA platné, a v prípade, že údaje ležia mimo stanovený limit, dochádza ku generácii príznakov. Po vykonaní všetkých predbežných kontrol s kladným výsledkom sa spracujú fluorescenčné načítania, čím sa vytvorí Ct hodnoty pre HCV RNA a pre HCV IC RNA. Výsledky sú interpretované ako pozitívne alebo negatívne.

## ČINIDLÁ

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV  
Qualitative Test, v2.0**  
(P/N: 05480477 190)

**HCVQLV2**

**72 testov**

### **HCV QL v2.0 CS1**

(HCV kazeta s činidлами s čiastočkami z magnetického skla)

Magnetické sklené častice

Pufor Tris

0,09 % Azid sodný

0,1 % Metylparabén

1 x 72 testov

1 x 7,0 ml

### **HCV QL v2.0 CS2**

(HCV kazeta s dezintegračným činidlom)

Dihydrát citrónanu sodného

42,5 % Guanidín tiokyanát

< 6 % Polydokanol

0,9 % Ditiotreitol

1 x 72 testov

1 x 78,0 ml

### **HCV QL v2.0 CS3**

HCV kazeta s viacerými činidлами obsahujúca:

#### **Pase**

(Roztok proteinázy)

Pufor Tris

< 0,05 % EDTA

Chlorid vápenatý

Octan vápenatý

≤ 7,8 % Proteináza

Glycerol

1 x 3,8 ml

#### **EB**

(Lúhovací roztok)

Pufor Tris-base

0,09 % Azid sodný

1 x 8,1 ml

<b>HCV QL v2.0 CS4</b>	1 x 72 testov
HCV kazeta so špecifickými testovacími činidami obsahujúca:	
<b>IC</b>	1 x 3,6 ml
(HCV Vnútorná kontrolná vzorka)	
Pufor Tris	
EDTA	
< 0,002 % Poly rA RNA (syntetická)	
< 0,001 % obrazec Armored HCV RNA obsahujúci	
HCV väzbové sekvencie primeru a unikátny väzbový	
región sondy (neinfekčná RNA v MS2 bakteriofágu)	
0,05% Azid sodný	
<b>MMX</b>	1 x 3,5 ml
(HCV hlavná zmes)	
Pufor Tricine	
Octan draselný	
Hydroxid draselný	
< 20 % Dimetylsulfoxid	
Glycerol	
< 0,004 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP	
< 0,002 % antimediátorové a mediátorové HCV primery	
k 5' UTR regiónu HCV	
< 0,001 % fluorescenčne označené oligonukleotické sondy	
špecifické pre HCV a HCV vnútornej kontrolnej vzorky	
< 0,001 % Oligonukleotid aptamér	
< 0,05 % Polymeráza Z05 a Z05D DNA (mikrobiálna)	
< 0,1 % Enzým AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiálna)	
0,09 % Azid sodný	
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	1 x 19,8 ml
(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® mangánový roztok)	
< 0,5 % Octan manganatý	
Ladová kyselina octová	
0,09 % Azid sodný	
<b>HCV (+) C, v2.0</b>	6 x 0,85 ml
(HCV Pozitívna kontrolná vzorka)	
< 0,001 % obrazec Armored HCV RNA obsahujúci HCV	
sekvencie (neinfekčná RNA v MS2 bakteriofágu)	
Negatívna ľudská plazma, nereaktívna v testoch na protilátku voči HCV,	
protilátku voči HIV-1/2, antigén HIV p24 a HBsAg; RNA HIV-1,	
RNA HCV a DNA HBV sú metódami PCR nezistiteľné	
0,1 % konzervačná látka ProClin® 300	
<b>CTM (-) C</b>	6 x 1,0 ml
[COBAS® TaqMan® Negatívna kontrolná látka (ľudská plazma)]	
Negatívna ľudská plazma, nereaktívna v testoch na protilátku voči HCV,	
protilátku voči HIV-1/2, antigén HIV p24 a HBsAg; RNA HIV-1,	
RNA HCV a DNA HBV sú metódami PCR nezistiteľné	
0,1 % konzervačná látka ProClin® 300	
<b>HCV (+) C, v2.0 Clip</b>	1 x 6 svoriek
(HCV svorka na čiarový kód pre pozitívnu kontrolnú látku)	
<b>HCV (-) C, v2.0 Clip</b>	1 x 6 svoriek
(HCV svorka na čiarový kód pre negatívnu kontrolnú látku)	

**PG WR**

(Premývacie činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)  
Dihydrát citronanu sodného  
< 0,1 % N-Metylizotiazolon-HCl

**VÝSTRAHY A PROCEDURÁLNE PREVENTÍVNE OPATRENIA**

Tak, ako pri každej testovacej procedúre, aj v tomto prípade platí, že základom pre správne vykonanie tejto analýzy je správna laboratórna technika. Vzhľadom na vysokú citlivosť tohto testu je potrebné zachovať najvyššiu opatnosť pri uchovaní čistoty činidiel a amplifikačných zmesí.

- A. URČENÉ NA DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE *IN VITRO*.
- B. Tento test je určený na použitie s ľudským sérom alebo plazmou zhromaždenou v antikoagulate EDTA.
- C. Pipetu nenapĺňajte pomocou úst.
- D. V pracovných oblastiach laboratória nejedzte, nepite ani nefajčite. Pri práci so vzorkami a činidlami súpravy používajte ochranné jednorazové rukavice, laboratórne plášte a ochranné prostriedky na oči. Po práci so vzorkami a testovacími činidlami si dôkladne umyte ruky.
- E. Dbajte na to, aby ste pri vyberaní pomerných častí vzoriek z kontrolných nádob zabránili mikrobiálnej kontaminácii činidiel a ich kontaminácii ribonukleázou.
- F. Odporúčame používať sterilné jednorazové pipety a špičky pipiet bez RNázy.
- G. Nemiešajte kontrolné látky z rôznych dávok alebo z rôznych nádob v rámci jednej dávky.
- H. Nemiešajte kazety činidiel alebo kontrolné látky rôznych súprav.
- I. Neotvárajte kazety COBAS® AmpliPrep a nevymieňajte, nemiešajte, neodstraňujte ani nepridávajte flaše.
- J. Pri likvidácii nepoužitých činidiel, odpadu a vzoriek postupujte v súlade s platnými predpismi.
- K. Súpravu nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie.
- L. Karty bezpečnostných údajov (SDS) sú k dispozícii na požiadanie od miestneho zastúpenia spoločnosti Roche.
- M. So vzorkami a kontrolnými vzorkami by sa malo zaobchádzať ako s infekčným materiálom a vždy by sa mali dodržiavať bezpečné laboratórne postupy, uvedené napríklad v materiáli *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>11</sup> a v dokumente CLSI M29-A3<sup>12</sup>. Všetky pracovné povrchy dôkladne vyčistite a vydezinfikujte pomocou čerstvo pripraveného 0,5 % roztoku chlórnanu sodného v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- N. **CTM (-) C** a **HCV (+) C, v2.0** obsahujú ľudskú plazmu derivovanú z ľudskej krvi. Bol testovaný zdrojový materiál a zistilo sa, že je nereaktívny na prítomnosť povrchového antigénu hepatitídy B (HBsAg), protilátok voči HIV-1/2 a HCV a HIV p24 antigénu. Testovanie negatívnej ľudskej plazmy PCR metódami vykazovalo nezistiteľné hladiny RNA HIV-1, RNA HCV alebo DNA HBV. Žiadne známe testovacie metódy nemôžu poskytnúť úplné uistenie o tom, že produkty derivované z ľudskej krvi neprenášajú infekujúcich činiteľov. Preto však všetok ľudský zdrojový materiál vrátane **CTM (-) C** a **HCV (+) C, v2.0** považovať za potenciálne infekčný.
- O. **MGP, EB, IC, Mn<sup>2+</sup>** a **MMX** obsahujú azid sodíka. Azid sodný môže reagovať s olovenými a meďnými rozvodmi a môže dochádzať k tvorbe vysoko výbušných kovových azidov. Ak vylievate roztoky obsahujúce azid sodný do laboratórných drezov, vypláchnite odpadové potrubia veľkým množstvom vody, aby ste tak predišli usádzaniu azidov.

- P. Pri práci s každým činidlom noste ochranu očí, laboratórne plášte a jednorazové rukavice. Zabráňte kontaktu týchto materiálov s kožou, očami a sliznicami. Ak dôjde ku kontaktu, zasiahnuté miesto ihneď umyte veľkým množstvom vody. V prípade neošetrenia môžu vzniknúť popáleniny. Ak dôjde k rozliatiu týchto činidiel, pred ich vysušením rozliate činidlá zriedte vodou.
- Q. Dbajte na to, aby sa **HCV QL v2.0 CS2** a tekutý odpad vrátane použitých jednotiek na spracovanie vzoriek (SPU) COBAS® AmpliPrep zo zariadenia COBAS® AmpliPrep, ktoré obsahujú guanidín tiokyanát, nedostali do styku s (bieliacim) roztokom chlórnanu sodného. Tieto zmesi môžu vyprodukovať vysokotoxický plyn.

#### POŽIADAVKY NA SKLADOVANIE A MANIPULÁCIU

- A. Každú kazetu a liekovku s činidlom pred jeho použitím vizuálne skontrolujte, či nedochádza k úniku činidla. Ak činidlo uniká, tento materiál na testovanie nepoužívajte.
- B. **HCV QL v2.0 CS1**, **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** a **HCV QL v2.0 CS4** skladujte pri teplote 2–8 °C. Tieto činidlá sú stále až do uvedeného dátumu expirácie. Ak sa tieto činidlá už použijú, sú stabilné 70 dní pri teplote 2–8 °C alebo až do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr. Látky **HCV QL v2.0 CS1**, **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** a **HCV QL v2.0 CS4** sa môžu použiť max. 96 kumulatívnych hodín v zariadení COBAS® AmpliPrep. Medzi prístrojovými cyklami sa činidlá musia uchovávať pri teplote 2–8 °C.
- C. Látky **HCV (+) C, v2.0** a **CTM (-) C** skladujte pri teplote 2–8 °C. Kontrolné látky sú stabilné až do uvedeného dátumu expirácie. Po otvorení sa nepoužitá časť musí zlikvidovať.
- D. Svorky pre čiarové kódy [**HCV (+) C, v2.0 Clip** a **HCV (-) C, v2.0 Clip**] uchovávajte pri teplote 2–30 °C.
- E. **PG WR** uchovávajte pri teplote 2–30 °C. Nepoužitý **PG WR** je stabilný až do uvedeného dátumu expirácie. Po otvorení je toto činidlo stabilné 28 dní pri teplote 2–30 °C alebo až do dátumu expirácie, podľa toho, čo nastane skôr.

#### DODÁVANÉ MATERIÁLY

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Qualitative Test, v2.0**

**HCVQLV2**

**HCV QL v2.0 CS1**

(HCV kazeta s činidlami s čiastočkami z magnetického skla)

**HCV QL v2.0 CS2**

(HCV kazeta s dezintegračným činidlom)

**HCV QL v2.0 CS3**

(HCV kazeta s viacerými činidlami)

**HCV QL v2.0 CS4**

(HCV kazeta so špecifickými testovacími činidlami)

**HCV (+) C, v2.0**

(HCV Pozitívna kontrolná látka)

**CTM (-) C**

[COBAS® TaqMan® Negatívna kontrolná látka (ľudská plazma)]

**HCV (+) C, v2.0 Clip**

(HCV svorka na čiarový kód pre pozitívnu kontrolnú látku)

**HCV (-) C, v2.0 Clip**

(HCV svorka na čiarový kód pre negatívnu kontrolnú látku)

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**

Premývacie činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

**PG WR**

**PG WR**

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

## POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

### Zariadenia a softvér

- Zariadenie COBAS® AmpliPrep
- Analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48
- Dokovacia stanica (voliteľná)
- Prístroj **cobas p** 630 (voliteľná)
- Softvér AMPLILINK, verzia 3.3 alebo 3.4
- Ovládacia jednotka pre softvér AMPLILINK s tlačiarňou
- Príručky pre zariadenia a softvér:
  - Príručka pre zariadenie COBAS® AmpliPrep, ktoré sa používa so softvérom AMPLILINK, verzia 3.3 a 3.4
  - Príručka pre analyzátor COBAS® TaqMan®, ktorý sa používa so softvérom AMPLILINK, verzia 3.3 a 3.4
  - Príručka pre analyzátor COBAS® TaqMan® 48, ktorý sa používa so softvérom AMPLILINK, verzia 3.3 a 3.4
  - Aplikačná príručka pre softvér AMPLILINK, verzia 3.3, ktorý sa používa so zariadením COBAS® AmpliPrep, analyzátorom COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® 48, analyzátorom COBAS® AMPLICOR a prístrojom **cobas p** 630  
alebo
  - Aplikačná príručka k softvéru AMPLILINK, verzia 3.4
  - Voliteľné: Príručka operátora pre prístroj **cobas p** 630, verzia softvéru 2.2
- Testovací definičný súbor (TDF). Názov a aktuálna verzia TDF sa uvádza na Karte s informáciami o výrobku, dodávanej spolu so súpravou.

### Iné materiály

- Stojan na vzorky (stojan SK24)
- Stojan na činidlá
- Stojan na SPU
- K-nosič
- Transportér K-nosičov
- Stojan na K-nosiče
- Pipetory so špičkami bez RNázy s aerosólovou bariérou alebo pozitívnym posuvom (kapacita 1000 µl); presnosť pipetorov by nemala presahovať 3 % stanoveného objemu. Musia sa použiť špičky bez RNázy s aerosólovou bariérou alebo pozitívnym posuvom, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii vzoriek a amplikónu.
- Jednorazové rukavice, bez prádru
- Vírivý mixér

### Jednorazový materiál

- Jednotka na spracovanie vzoriek (SPU)
- Vstupná skúmavka na vzorky (S-skúmavky) s klipmi s čiarovým kódom
- Stojan s K-špičkami
- Škatuľa s K-skúmavkami 12 x 96

## ODBER, PREPRAVA A SKLADOVANIE VZORIEK

**POZNÁMKA:** *So všetkými vzorkami a kontrolnými látkami pracujte ako s látkami, ktoré môžu prenášať infekciu.*

### Odber a skladovanie vzoriek

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 je určený na použitie so vzorkami séra alebo EDTA plazmy. Krv by sa mala zhromažďovať v separačných skúmavkách pre sérum SST®<sup>®</sup>, v skúmavkách BD Vacutainer® PPT™ na prípravu plazmy pre molekulárne diagnostické testovacie metódy alebo v sterilných skúmavkách za použitia EDTA (uzáver levandulovej farby) ako antikoagulantu. Pri manipulácii so zbernými skúmavkami postupujte podľa pokynov výrobcu. Čerstvo odobrané vzorky (plná krv) možno skladovať pri teplote 2–25 °C najviac 24 hodín pred odstredovaním. Po odstredení sérum alebo EDTA plazmu presuňte do sterilnej polypropylénovej skúmavky. Odporúčame skladovať vzorky v pomerných častiach v objeme približne 1000 µl v sterilných, 2,0 ml polypropylénových skúmavkách so skrutkovým uzáverom (napríklad v 2 ml Sarstedtovej mikroskúmavke so skrutkovým uzáverom). Sérové a EDTA plazmové vzorky možno skladovať:

- pri teplote 2 až 8 °C po dobu max. 72 hodín
- pri teplote -20 °C až -80 °C po dobu max. 6 týždňov

Sérové a EDTA plazmové vzorky možno zmraziť a rozmraziť päťkrát bez toho, aby došlo ku strate HCV RNA.

### Preprava vzoriek

Preprava krvi, séra alebo EDTA plazmy musí spĺňať štátne, federálne a miestne predpisy týkajúce sa prepravy etiologických látok<sup>13</sup>. Plná krv sa musí prepravovať pri teplote 2–25 °C a odstrediť do 24 hodín od odberu. EDTA plazma alebo sérum sa môžu prepravovať pri teplote 2 až 8 °C alebo zmrazené na teplotu -20 °C až -80 °C.

## NÁVOD NA POUŽITIE

Podrobný návod na použitie, opis možných konfigurácií, informácie o tlačí výsledkov, interpretácii príznakov, pripomienkach a chybových hláseniach nájdete v návodoch pre softvér AMPLILINK, verzia 3.3 alebo 3.4 v časti „Zariadenia a softvér“.

### Veľkosť dávky a pracovný postup

Každá súprava obsahuje činidlá postačujúce na 72 testov, ktoré sa môžu vykonať v dávkach 12 až 24 testov. V každej dávke sa musí použiť najmenej jedna z každej kontrolnej látky [CTM (–) C a HCV (+) C, v2.0] (pozri časť „Kontrola kvality“). Analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 sa musí spustiť najneskôr do 120 minút po ukončení prípravy vzoriek a kontrolných látok. Spracované vzorky a kontrolné látky NEZMRAZUJTE a ani ich NEUCHOVÁVAJTE PRI TEPLOTÁCH 2–8 °C.

### Príprava vzorky a kontrolnej látky

Ak používate zmrazené vzorky, pred použitím nechajte tieto vzorky pri izbovej teplote až dovtedy, kým sa úplne nerozmrazia a rozmiešajte ich vírivým mixérom po dobu 3–5 sekúnd. Kontrolné látky by mali byť pred použitím prenesené zo skladovacieho prostredia s teplotou 2–8 °C, ekvilibrované na okolitú teplotu a rozmiešané vírivým mixérom po dobu 3–5 sekúnd.

## Nastavenie zariadenia COBAS® AmpliPrep

### Časť A. Údržba a napĺňanie

- A1. Zariadenie COBAS® AmpliPrep je pripravené na prevádzku v pohotovostnom režime.
- A2. Zapnite ovládaciu jednotku pre softvér AMPLILINK (**ON**). Ovládaciu jednotku pripravte takto:
1. Prihláste sa do operačného systému Microsoft Windows.
  2. Dvakrát kliknite na ikonu softvéru AMPLILINK.
  3. Prihláste sa do softvéru AMPLILINK tak, že zadáte priradené ID používateľa a heslo.
- A3. Na obrazovke **Status** skontrolujte **PG WR** dodávky a v prípade potreby ho zmeňte.
- A4. Vykonaajte celkovú údržbu, ktorá je uvedená pod názvom **Due**. Zariadenie COBAS® AmpliPrep systém automaticky naplní.

### Časť B. Napĺňanie kaziet s číidlami

**POZNÁMKA:** *Všetky kazety s číidlami by sa mali preniesť zo skladovacieho priestoru s teplotou 2–8 °C, okamžite naplniť do zariadenia COBAS® AmpliPrep a nechať ekvilibrovať na okolitú teplotu v zariadení minimálne 30 minút pred spracovaním prvej vzorky. Kazety s číidlami nenechávajúte temperovať na teplotu okolia mimo zariadenia, lebo na štítkoch s čiarovým kódom môže vzniknúť kondenzácia. Ak sa kondenzácia na štítkoch s čiarovými kódmi objaví, neutierajte ju.*

- B1. Na každý stojan pre číidlá umiestnite **HCV QL v2.0 CS1**. Umiestnite **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** a **HCV QL v2.0 CS4** na separátny stojan na číidlá.
- B2. Stojan na číidlá obsahujúci **HCV QL v2.0 CS1** vložte do polohy **A** stojana zariadenia COBAS® AmpliPrep.
- B3. Stojan na číidlá obsahujúci **HCV QL v2.0 CS2**, **HCV QL v2.0 CS3** a **HCV QL v2.0 CS4** vložte do polohy **B**, **C**, **D** alebo **E** stojana zariadenia COBAS® AmpliPrep (podrobnejšie informácie nájdete v návodoch k príslušnému zariadeniu).

### Časť C. Založenie jednorazových položiek

**POZNÁMKA:** *Určte potrebný počet kaziet s číidlami COBAS® AmpliPrep, jednotiek na spracovanie vzoriek (SPU), vstupných skúmaviek na vzorky (S-skúmavky), K-špičiek a K-skúmaviek. Pre každú vzorku alebo kontrolnú vzorku sa vyžaduje jedna SPU, jedna vstupná S-skúmavka, jedna K-špička a jedna K-skúmavka.*

So zariadením COBAS® AmpliPrep s analyzátorom COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 je možné použiť viacero konfigurácií. V závislosti od použitej konfigurácie založte vhodný počet stojanov s kazetami s číidlami, stojanov na vzorky so vstupnými S-skúmavkami, stojanov na SPU, stojanov pre K-špičky, stojanov pre K-skúmavky a K-nosičov v stojanoch pre K-nosiče do príslušných polôh stojanov zariadenia COBAS® AmpliPrep.

- C1. SPU vložte do stojanu(ov) na SPU a vložte stojan(y) so polohy **J**, **K** alebo **L** zariadenia COBAS® AmpliPrep.
- C2. V závislosti od použitej konfigurácie založte plný(é) stojan(y) s K-skúmavkami do polohy **M**, **N**, **O** alebo **P** zariadenia COBAS® AmpliPrep.
- C3. Založte plný(é) stojan(y) s K-špičkami do polohy **M**, **N**, **O** alebo **P** zariadenia COBAS® AmpliPrep.
- C4. V závislosti od použitej konfigurácie založte K-nosiče na stojan(y) pre K-nosiče do polohy **M**, **N**, **O** alebo **P** zariadenia COBAS® AmpliPrep.

## Časť D. Žiadanky a zakladanie vzoriek

- D1. Stojany na vzorky pripravte takto: svorku so štítkom s čiarovým kódom pripevnite ku každej polohe stojanu na vzorky, kde sa má uložiť vzorka (S-skúmavka). Ku každej pozícii stojana pre vzorky, do ktorej sa majú umiestniť kontrolné látky (S-skúmavka), pripevnite jednu zo špecifických svoriek pre čiarové kódy pre kontrolné látky **[CTM (-) C a HCV (+) C, v2.0]**. Svorky s čiarovým kódom pre kontrolné látky majú mať rovnaké číslo dávky kontrolnej látky ako je číslo dávky na nádobke s kontrolnou látkou v súprave. Pri priradovaní správnej kontrolnej látky k polohe s náležitou svorkou s čiarovým kódom kontrolnej látky dávajte pozor. Jednu vstupnú S-skúmavku vložte do každej polohy obsahujúcej svorku so štítkom s čiarovým kódom.
- D2. Pomocou softvéru AMPLILINK, vytvorte žiadanky pre každú vzorku a kontrolnú látku v okne **Orders** na karte **Sample**. Vyberte príslušný testovací súbor a ukončíte ho uložením.
- D3. Žiadanky vzoriek a kontrolných látok priradíte k polohám stojanov na vzorky v okne **Orders** na karte **Sample Rack**. Číslo stojana na vzorky musí byť pre stojan pripravený v kroku D1.
- D4. Správu **Sample Rack Order** vytlačte ako pracovný list.
- D5. Stojany na vzorky a kontrolné látky pripravte do určenej plochy pre pridanie vzoriek a kontrolných látok takto: Každú vzorku a kontrolnú látku **[CTM (-) C a HCV (+) C, v2.0]** miešajte vo vírovom mixéri po dobu 3 až 5 sekúnd. Pri práci so vzorkami a kontrolnými látkami sa vyhnite kontaminácii rukavic.
- D6. Pomocou mikropipetora s aerosólovou prepážkou alebo mechanickou špičkou bez RNázy preneste 650 µl každej vzorky a kontrolnej látky **[CTM (-) C a HCV (+) C, v2.0]** do vstupnej S-skúmavky označenej príslušným čiarovým kódom. **Vyhňte sa presunu častíc a/alebo zrazenín fibrínu z pôvodnej vzorky do vstupnej S-skúmavky.** Vzorky a kontrolné látky by sa mali prenášať do príslušne označených polôh skúmaviek, zaznačených v pracovnej tabuľke v kroku D4. Svorky s čiarovým kódom pre kontrolné látky majú mať rovnaké číslo dávky kontrolnej látky ako je číslo dávky na nádobke s kontrolnou látkou v súprave. Priradte správnu kontrolnú látku k polohe s príslušnou svorkou s čiarovým kódom kontrolnej látky. **Vyhňte sa kontaminácii hornej časti S-skúmaviek vzorkami alebo kontrolami.**
- D7. Ak na prípravu vzoriek používate zariadenie **cobas p 630**, pozrite si príručku operátora pre zariadenie **cobas p 630**.
- D8. V závislosti od použitej konfigurácie založte stojan(y) na vzorky naplnený(é) vstupnými S-skúmavkami do polôh **F, G** alebo **H** zariadenia COBAS® AmpliPrep.
- D9. V závislosti od použitej konfigurácie založte stojan(y) na vzorky so vstupnými S-skúmavkami a K-skúmavkami (jedna pre každú vstupnú S-skúmavku, do pravej polohy vedľa vstupných S-skúmaviek) do polohy **F, G** alebo **H** zariadenia COBAS® AmpliPrep.

## Časť E. Spustenie chodu zariadenia COBAS® AmpliPrep

- E1. Zariadenie COBAS® AmpliPrep spustíte pomocou softvéru AMPLILINK.

## Časť F. Koniec chodu zariadenia COBAS® AmpliPrep a presun do analyzátoru COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 (len pre manuálny prenos)

- F1. Skontrolujte, či nie sú obsahnuté príznaky alebo chybové správy.
- F2. Spracované vzorky a kontrolné látky vyberte zo zariadenia COBAS® AmpliPrep buď na stojany na vzorky (pre analyzátor COBAS® TaqMan® bez dokovacej stanice) alebo na stojany K-nosičov (pre analyzátor COBAS® TaqMan® 48), v závislosti od konfigurácie.
- F3. Zo zariadenia COBAS® AmpliPrep vyberte odpad.

**POZNÁMKA:** *Po ukončení prípravy vzoriek a kontrolných látok nesmú byť žiadne spracované vzorky a kontrolné látky vystavené svetlu.*

## Amplifikácia a detekcia

### Nastavenie analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48

Analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 sa musí spustiť najneskôr do 120 minút po ukončení prípravy vzoriek a kontrolných látok. Spracované vzorky a kontrolné látky NEZMRAZUJTE a ani ich NEUCHOVÁVAJTE PRI TEPLOTÁCH 2 – 8 °C.

### Časť G. Zakladanie spracovaných vzoriek

G1. V závislosti od konfigurácie zariadenia vykonajte vhodné kroky na presun K-skúmaviek do analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48.

### Časť H. Spustenie chodu analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48

H1. V závislosti od použitej konfigurácie spustíte analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48.

### Časť I. Ukončenie chodu analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48

11. Po ukončení chodu analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 vytlačte správu o výsledkoch. Skontrolujte, či v správe o výsledkoch nie sú príznaky alebo chybové správy. Vzorky s príznakmi a poznámkami sa interpretujú tak, ako je popísané v časti „Výsledky“. Po prijatí údaje uložte do archívu.
12. Použité K-skúmavky vyberte z analyzátora COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48.

## KONTROLA KVALITY

Každá testovacia dávka musí obsahovať jednu negatívnu kontrolnú látku COBAS® TaqMan® a jednu HCV pozitívnu kontrolnú látku. Dávka je platná v prípade, ak kontrolným látkam [HCV (+) C, v2.0 a CTM (-) C] nie sú priradené žiadne príznaky.

Na polohu kontrolných látok stojane so vzorkami sa nevzťahujú žiadne špecifické požiadavky.

Skontrolujte aj vytlačené výsledky z hľadiska možných značiek a poznámok, aby bolo isté, či je dávka platná.

### Negatívna kontrolná látka

Látka **CTM (-) C** musí vykázať výsledok „Negative“. Ak je látka **CTM (-) C** označená príznakom neplatnosti, celá dávka je neplatná. Celý postup (prípravu vzoriek a kontrolných látok, amplifikáciu a detekciu) zopakujte. Ak je látka **CTM (-) C** trvalo neplatná v rámci viacerých dávok, obráťte sa na miestne zastúpenie Roche, kde vám poskytnú technickú pomoc.

### Pozitívna kontrola

Látka **CTM (-) C** musí vykázať výsledok „Positive“. Ak je látka **HCV (+) C, v2.0** označená príznakom neplatnosti, celá dávka je neplatná. Celý postup (prípravu vzoriek a kontrolných látok, amplifikáciu a detekciu) zopakujte. Ak je **HCV (+) C, v2.0** systematicky neplatná vo viacerých dávkach, obráťte sa na svoje miestne zastúpenie firmy Roche, aby vám poskytlo technickú pomoc.

## VÝSLEDKY

Analyzátor COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje prítomnosť HCV RNA vo vzorkách a kontrolných látkach.

### Softvér AMPLILINK:

- Stanovuje Ct pre HCV RNA a HCV IC RNA.
- Stanovuje prítomnosť HCV RNA a HCV IC RNA na základe hodnôt Ct pre HCV RNA a HCV IC RNA.

### Schválenie dávky:

Skontrolujte výsledkové okno softvéru AMPLILINK alebo výtlačok z hľadiska výskytu príznakov a komentárov, čím sa ubezpečíte, že dávka je platná.

Pokiaľ ide o poradie kontrolných látok, vykonáva sa kontrola za účelom stanovenia, či sa hodnota Ct kontrolnej látky nachádza v stanovenom pásme. Ak hodnota Ct kontrolnej látky leží mimo stanoveného pásma, vytvorí sa PRÍZNAK, ktorý znamená, že kontrolná látka je neplatná.

Dávka je platná v prípade, ak kontrolným látkam [HCV (+) C, v2.0 a CTM (-) C] nie sú priradené žiadne príznaky.

Dávka nie je platná, ak sa v súvislosti s kontrolnými látkami HCV zobrazí ktorýkoľvek z nasledujúcich príznakov:

### Negatívna kontrolná látka:

Príznak	Výsledok	Interpretácia
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledok alebo výsledok pre negatívnu kontrolnú látku nie je negatívny.

### HCV Pozitívna kontrolná látka:

Príznak	Výsledok	Interpretácia
PC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledok alebo výsledok pre pozitívnu kontrolnú látku nie je pozitívny.

Ak je dávka neplatná, opakujte celú dávku (príprava vzoriek a kontrolných látok, reverzná transkripcia, amplifikácia a detekcia).

### Interpretácia výsledkov:

U platnej dávky skontrolujte vytlačené výsledky, či neobsahujú príznaky ani komentáre.

⇒ Platná dávka môže obsahovať aj platné aj neplatné výsledky vzoriek, v závislosti od objavenia sa príznakov alebo komentárov pre jednotlivé vzorky.

### Výsledky vzoriek sa interpretujú nasledovne:

Výsledok	Interpretácia
Negative	Ct hodnota pre HCV sa nachádza nad analytickým limitom alebo nebola zistená žiadna Ct hodnota pre HCV. Výsledky interpretujte ako „HCV RNA nezistená“.
Positive	Výsledky interpretujte ako „HCV RNA zistená“.

Ak je zobrazený prvok výsledku vzorky „Failed“, „Invalid“ alebo „Aborted“, pozrite si časť „Potrebné materiály, ktoré nie sú súčasťou dodávky“ v aplikačnej príručke k softvéru AMPLILINK, verzia 3.3. alebo 3.4.

## PROCEDURÁLNE OBMEDZENIA

1. Tento test bol schválený len na použitie s ľudským sérom alebo plazmou zhromaždenou v antikoagulate EDTA. Testovanie iných typov vzoriek môže spôsobiť nepresné výsledky.
2. Aj keď je to veľmi zriedkavé, mutácie v rámci veľmi zachovaných regiónov vírusového genómu, pokrytých testovacími prímerni alebo sondou, môžu viesť k nemožnosti detekcie vírusu.
3. Detekcia HCV RNA závisí od počtu vírusových častíc prítomných vo vzorke a môže byť ovplyvnená spôsobom odberu vzoriek, faktormi pacienta (napr. vek, výskyt príznakov) a/alebo fázou infekcie.
4. Spofahlivé výsledky závisia od adekvátneho množstva vzoriek, prepravy, skladovania a postupov pri spracovaní.
5. Prítomnosť enzýmu AmpErase v hlavnej zmesi COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV znižuje riziko kontaminácie amplikónu. Kontaminácii pochádzajúcej z HCV pozitívnych kontrolných vzoriek a klinických vzoriek však možno predísť osvedčenými laboratórnymi postupmi a dôsledným postupovaním v súlade s procedúrami, uvedenými v tomto materiáli.
6. Používanie tohto produktu by malo byť obmedzené iba na personál vyškolený na ovládanie zariadenia **cobas p 630** (voliteľné), zariadenia COBAS® AmpliPrep a analyzátoru COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48. Operátor by mal mať dôkladnú znalosť o aplikáciách uskutočňovaných na týchto zariadeniach a mal by dodržiavať osvedčené laboratórne postupy.
7. Tento produkt možno používať len so zariadením **cobas p 630** (voliteľné), zariadením COBAS® AmpliPrep a analyzátorom COBAS® TaqMan® alebo COBAS® TaqMan® 48.
8. V dôsledku podstatných odlišností medzi technológiami sa odporúča, aby používateľ pred zmenou technológie v laboratóriu vykonal štúdie korelácie metód a vyhodnotil technologické rozdiely.

## RUŠIVÉ LÁTKY

Zvýšené hladiny triglyceridov (3300 mg/dl), konjugovaného bilirubínu (25 mg/dl) a nekonjugovaného bilirubínu (20 mg/dl), albumínu (6000 mg/dl), hemoglobínu (200 mg/dl) a ľudskej DNA (40 mg/dl) vo vzorkách, ani prítomnosť autoimunitných chorôb, napríklad systémového lupus erythematosus (SLE), reumatoidná artritída (RA) a antinukleárných protilátok (ANA) nepreukázali rušivý účinok na detekciu HCV RNA kvalitatívnym testom COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Nasledujúce liečivé zmesi testované pri špičkovej úrovni plazmy ( $C_{max}$ ) a pri úrovni  $3x C_{max}$  nepreukázali interferenciu pri detekcii HCV RNA prostredníctvom kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0:

<b>Inhibítory nukleotidovej reverznej transkriptázy a DNA polymerázy</b> Tenofovir Adefovir dipivoxil	<b>Inhibítory nenukleozidovej reverznej transkriptázy</b> Efavirenz Nevirapín
<b>Inhibítory HIV proteázy</b> Atazanavir Sakvinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir Darunavir Tipranavir Fosamprenavir	<b>Inhibítory nukleotidovej reverznej transkriptázy</b> Lamivudín Zidovudín Stavudín Abakavir Didanozín Emtricitabín Entekavir Telbivudín
<b>Inhibítor fúzie HIV</b> Enfuvirtid	<b>Inhibítor vstupu HIV</b> Maravirok
<b>Zmesi na liečbu herpesových vírusov</b> Ganciklovir Valganciklovir Acyklovir	<b>Imunitný modulátor</b> Peginterferón alfa-2b Ribavirín Peginterferón alfa-2a
<b>Inhibítor HIV integrázy</b> Raltegravir	

## HODNOTENIE NEKLINICKEJ ÚČINNOSTI

### A. Detekčný limit

Detekčný limit kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 bol stanovený prostredníctvom analýzy sériových roztokov Prvého medzinárodného štandardu WHO pre RNA vírusu hepatitídy C pre analytické technológie amplifikácie kyseliny nukleovej genotyp 1a, získaných z NIBSC v HCV negatívnej ľudskej EDTA plazme alebo sére. V rámci každej matrice boli analyzované tri nezávislé roztokové série. V rámci každého typu matrice bolo celkom testovaných až 252 replikátov na koncentráciu. V rámci štúdie boli použité tri dávky činidla kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Výsledky pre EDTA plazmu a sérum sú uvedené v Tabuľke 1 a 2 a tieto výsledky dokazujú, že kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 dokázal zistiť HCV RNA pri koncentráciách 15 IU/ml alebo vyšších s mierou pomernej početnosti  $\geq 95$  %. Rozdiel medzi sérom a EDTA plazmou nebol štatisticky významný.

**Tabuľka 1**  
**Detekčný limit v EDTA plazme stanovený pomocou Prvého medzinárodného štandardu WHO**  
**pre RNA vírusu hepatitídy C pre analýzu amplifikačnej technológie kyseliny nukleovej**

Vstupná titrácia (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomeraná úspešnosť v %
50	314	314	100
25	314	313	100
15	314	308	98
10	315	291	92
5	315	228	72
2,5	314	157	50
0	313	0	0
<b>Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti</b>	<b>12 IU/ml</b> <b>95 % rozsah spoľahlivosti: 10 – 13 IU/ml</b>		
<b>Det. limit podľa pomernej úspešnosti</b>	<b>15 IU/ml</b>		

**Tabuľka 2**  
**Detekčný limit v sére stanovený pomocou Prvého medzinárodného štandardu WHO**  
**pre RNA vírusu hepatitídy C pre analýzu amplifikačnej technológie kyseliny nukleovej**

Vstupná titrácia (HCV RNA IU/ml)	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomeraná úspešnosť v %
50	251	251	100
25	251	250	100
15	252	248	98
10	252	232	92
5	252	185	73
2,5	252	116	46
0	251	0	0
<b>Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti</b>	<b>11 IU/ml</b> <b>95 % rozsah spoľahlivosti: 10 – 13 IU/ml</b>		
<b>Det. limit podľa pomernej úspešnosti</b>	<b>15 IU/ml</b>		

## B. Presnosť

Presnosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 bola stanovená analýzou sériových roztokov Prvého medzinárodného štandardu WHO pre RNA vírusu hepatitídy C na analytické technológie amplifikácie nukleovej kyseliny v HCV negatívnej ľudskej plazme EDTA alebo sére.

Uskutočnilo sa testovanie dvoch úrovni koncentrácie (5 IU/ml a 50 IU/ml) s až 168 replikátmi v 12 testovacích cykloch v 4 dňoch. Každá vzorka prešla všetkými fázami kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 (príprava vzorky, amplifikácia a detekcia). V rámci štúdie boli použité tri dávky činidla kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Všetky platné údaje o presnosti boli hodnotené výpočtom pomernej úspešnosti v % pre každého člena panelu podľa dávky činidla (spoločne pre obidve matrice).

Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 vykazuje konzistentnú výkonnosť pri úrovniach koncentrácie 5 IU/ml a 50 IU/ml pre vzorky EDTA plazmy a sérové vzorky vo všetkých troch testovaných dávkach činidla (Tabuľka 3).

**Tabuľka 3**  
**Presnosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0**  
**(spoločne pre vzorky EDTA plazmy a séra)**

Menovitá koncentrácia [IU/ml]	Pomerčná úspešnosť v %		
	Dávka 1	Dávka 2	Dávka 3
5	74	70	74
50	100	100	100

### C. Inkluzívnosť

Účinnosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 na HCV genotypy bola určená overením detekčného limitu pre genotypy 1 až 6.

Klinické vzorky HCV RNA pre 8 rôznych genotypov/podtypov (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 a 6) boli zriadené na tri rôzne úrovne koncentrácie v EDTA plazme alebo sére a určenie pomernej úspešnosti bolo vykonané pre všetky úrovne až v 63 replikáciách. Štúdia sa vykonala s jednou dávkou činidla kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

Výsledky pre EDTA plazmu a sérum sú uvedené v Tabuľke 4 a 5 a tieto výsledky dokazujú, že kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 dokázal zistiť HCV RNA pre 8 rôznych genotypov/podtypov pri koncentráciách 15 IU/ml alebo vyšších s mierou pomernej úspešnosti  $\geq 95\%$ . Rozdiel medzi sérom a EDTA plazmou nebol štatisticky významný.

**Tabuľka 4**  
**Overenie genotypu HCV RNA detekčného limitu v EDTA plazme**

Genotyp	5 IU/ml			15 IU/ml			45 IU/ml		
	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerčná úspešnosť v %	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerčná úspešnosť v %	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerčná úspešnosť v %
1a	63	44	70	63	63	100	63	63	100
1b	63	47	75	63	62	98	63	63	100
2a	63	43	68	63	61	97	62	61	98
2b	62	57	92	62	62	100	62	62	100
3	62	58	94	63	63	100	62	62	100
4	63	43	68	63	62	98	63	63	100
5	63	46	73	62	62	100	62	62	100
6	63	54	86	62	62	100	63	63	100

**Tabuľka 5**  
**Overenie genotypu HCV RNA detekčného limitu v sére**

Genotyp	5 IU/ml			15 IU/ml			45 IU/ml		
	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %	Počet platných replikácií	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
1a	63	45	71	62	62	100	63	63	100
1b	62	50	81	63	63	100	63	63	100
2a	62	47	76	61	60	98	63	63	100
2b	63	42	67	63	62	98	63	63	100
3	63	58	92	63	63	100	63	63	100
4	63	40	64	63	62	98	63	63	100
5	62	46	74	61	60	98	62	62	100
6	63	51	81	63	63	100	63	63	100

#### D. Diagnostická citlivosť

Diagnostická citlivosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 bola určená analýzou jednotlivých HCV RNA pozitívnych vzoriek EDTA plazmy alebo séra (celkovo 337 výsledkov) s dvoma dávkami činidiel kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Testy všetkých vzoriek boli pozitívne na HCV RNA. V tomto paneli je diagnostická citlivosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 rovná 100 % (jednostranný spodný 95 % limit spoľahlivosti:  $\geq 99,1$  %).

Diagnostická citlivosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 bola okrem toho hodnotená pri sérokonverzii. Členovia 10 komerčne dostupných sérokonverzných panelov HCV, z ktorých každý bol odobratý od individuálneho darcu plazmy počas obdobia sérokonverzie protilátok na HCV, boli otestovaní s jednou dávkou činidiel kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detegoval HCV skôr v 10 z 10 sérokonverzných panelov v porovnaní so sérologickou referenciou Abbott HCV EIA (enzýmová imunoanalýza) 2.0. V porovnaní s ďalším testom NAT, test COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, kvalitatívny test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 detegoval RNA HCV skôr (2 z 10 panelov) alebo v ten istý deň po prvom odbere vzorky (8 z 10 panelov).

#### E. Špecifickosť

Špecifickosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 sa stanovila prostredníctvom analýzy HCV RNA-negatívnej a séronegatívnej EDTA plazmy alebo séra od darcov krvi. Jednotlivé vzorky EDTA plazmy a séra (celkovo 600 výsledkov) boli testované s dvoma dávkami činidiel kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0. Testy 499 vzoriek boli negatívne na HCV RNA. V rámci tohto panela je špecifickosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 99,8 % (jednostranný spodný 95 % limit spoľahlivosti:  $\geq 99,1$  %).

## F. Analytická špecificita

Analytická špecificita kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 bola hodnotená zriedením vysokej titrácie kmeňov rôznych patogénov (viď tabuľka 6) s HCV RNA pozitívnymi a HCV RNA negatívnymi klinickými vzorkami EDTA plazmy. Žiadny z non-HCV patogénov nevykazoval interferenciu s výkonom testu, ani nevykazoval žiadne falošne pozitívne výsledky v kvalitatívnom teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0.

**Tabuľka 6**  
**Vzorky pre analytickú špecificitu**

<b>Non-HCV flavivírusy</b> Západonílsky vírus Vírus encefalitídy St. Louis Vírus encefalitídy Murray Valley Vírus horúčky Dengue typu 1, 2, 3 a 4 Vírus žltej horúčky Vírus Zika Vírus FSME (kmeň HYPR)	<b>Vírusy</b> Adenovírus typ 5 Cytomegalovírus Epstein-Barrovej vírus Vírus hepatitídy B Vírus hepatitídy A HIV-1 Ľudské T-bunkové lymfotropné vírusy typu 1 a 2 Ľudský herpesvírus typu 6 Vírusy Herpes simplex typu 1 a 2 Chríпка typu A Ľudský papillomavírus Vírus Varicella-zoster
<b>Baktérie</b> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
<b>Kvasinky</b> <i>Candida albicans</i>	

## G. Výkonnosť v porovnaní s testom COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0

Výkonnosť kvalitatívneho testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 a testu COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0 bola porovnaná analýzou sérových vzoriek a vzoriek EDTA plazmy od pacientov infikovaných HCV. Dvojmo bola vykonaná analýza 463 vzoriek všetkých genotypov od 1 po 6 pre EDTA plazmu a všetkých genotypov od 1 po 4 pre sérum. Výsledky 436 vzoriek EDTA plazmy a séra boli pozitívne a v rámci rozsahu detekcie oboch testov, čo znamenalo 100 % pozitívnu zhodu medzi kvalitatívnym testom COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 a testom COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0. Z analýzy údajov bolo vylúčených 27 vzoriek; 3 vzorky mali nepostačujúci objem na testovanie pomocou testu COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0, 4 vzorky vykázali vo všetkých meraniach v oboch testoch výsledok „Target Not Detected“, 8 vzoriek vykázalo odlišné výsledky medzi 2 opakovaniami v každom teste, 12 vzoriek vykázalo odlišné výsledky medzi dvoma testami [dôvod na vylúčenie: všetky tieto vzorky majú koncentráciu HCV pod hodnotou LOD testu COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0 – LOD (95 % rozsahu detekcie) plazma: 50 IU/ml, LOD sérum: 60 IU/ml]. Všetky negatívne testované vzorky EDTA plazmy a séra (celkom 200 výsledkov) bolo platných a priniesli negatívny výsledok, čo viedlo k 100 % negatívnej zhode medzi kvalitatívnym testom COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 a testom COBAS® AMPLICOR HCV, v2.0.

## REFERENCIE

1. Choo Q-L., Kuo G, Weiner AJ, Overby LR., Bradley DW and Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis viral genome. *Science* **244**:359-362.
2. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP et al. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* **144**:705-714.
3. Rustgi VK. 2007. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol* **42**:513-521.
4. Lauer GM, Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**:41-52.
5. Caruntu FA, Benea L. 2006. Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis pathogenesis, treatment. *JGLD* **15**:249-256.
6. Gretch D, del la Rosa D, Corey L and Carithers R. 1996. Assessment of Hepatitis C viremia using molecular amplification technologies. *Viral Hepat Rev* **2**:85-96.
7. Young KKY, Resnick R and Myers TW. 1993. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* **31**:882-886.
8. NIH. 1997. Management of Hepatitis C. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement #105.
9. Bukh J, Purcell RH and Miller RH. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4942-4946.
10. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
11. U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5<sup>th</sup> Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112; December 2009.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline – 3<sup>rd</sup> Edition. CLSI Document M29-A3. CLSI: Wayne, PA 2005.
13. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 49th Edition. 2008.
14. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-Technology* **10**:413-417.
15. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.

<b>Informácie o revízií dokumentu</b>	
Doc. Rev. 3.0 (Mfg-US) 02/2019	Číslo informovaného úradu pod označením CE bolo aktualizované. V prípade akýchkoľvek otázok sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.
Doc. Rev. 4.0 (Mfg-US) 09/2019	Aktualizovaná časť <b>POŽIADAVKY NA SKLADOVANIE A MANIPULÁCIU</b> – pridaný pokyn pre používateľa, aby vizuálne skontroloval možný únik produktu pred samotným použitím produktu a aby v prípade úniku produkt nepoužíval. Pridaná webová adresa spoločnosti Roche – <a href="http://www.roche.com">www.roche.com</a> . Aktualizovaná strana so symbolom harmonizácie. V prípade akýchkoľvek otázok sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
[www.roche.com](http://www.roche.com)



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany

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

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

Roche Diagnostics  
2, Avenue du Vercors  
38240 Meylan, France

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

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

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

### Ochranné známky a patenty

Navštívte stránku <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

09/2019  
Doc Rev. 4.0 (Mfg-US)

07941706001-04



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim  
Germany



**Na označenie diagnostických produktov Roche PCR sa používajú nasledujúce symboly.**



Pridávny softvér



Číslo šarže



Autorizované zastúpenie  
v Európskom spoločenstve



Biologické riziká



Dátový list s čiarovým kódom



Katalógové číslo



Viď návod na použitie



Určené len na hodnotenie  
výkonnosti IVD



Obsah postačuje na <n> testov



Spodný limit stanoveného rozsahu



Obsah súpravy



Výrobca



Distribútor



Skladovať v tmavom prostredí



Diagnostické zdravotnícke  
zariadenie *in vitro*



Teplotné rozmedzie od do



Testovací definičný súbor



Dátum spotreby



Horný limit stanoveného rozsahu



Globálne číslo obchodnej jednotky



Dátum výroby

Rx Only

Len pre USA: Federálny zákon  
obmedzuje predaj tejto pomôcky  
lekárom alebo na základe jeho  
predpisu.



Tento produkt spĺňa požiadavky Európskej smernice 98/79/ES pre diagnostickú zdravotnícku pomôcku *in vitro*.