IVD CE

bosphore®

# HCV

## Genotyping Kit v7

# Návod k použití

Pro diagnostické použití *in vitro*

MB403v1f
Leden 2020

Anatolia geneworks

# OBSAH


1. POPIS PRODUKTU ..... 4
2. OBSAH ..... 4
3. SKLADOVÁNÍ ..... 4
4. POTŘEBNÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ ..... 4
5. DŮLEŽITÉ POZNÁMKY A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY ..... 5
6. OMEZENÍ POUŽITÍ PRODUKTU ..... 5
7. PATOGEN ..... 5
   Původci ..... 5
   Epidemiologie ..... 6
   Přenos ..... 6
8. METODA ..... 6
9. PROCEDURA ..... 7
   9.1. Izolace RNA ..... 7
   9.2. Součásti sady ..... 7
   9.2.1. PCR Master Mix 1 ..... 7
   9.2.2. PCR Master Mix 2 ..... 8
   9.2.3. PCR Master Mix 3 ..... 8
   9.2.4. PCR Master Mix 4 ..... 8
   9.2.5. PCR Master Mix 5 ..... 8
   9.2.6. PCR Master Mix 6 ..... 8
   9.2.7. Vnitřní kontrola ..... 9
   9.2.8. Pozitivní kontrola ..... 9
   9.3. Příprava RT-PCR ..... 9
   PCR Master Mix Vnitřní kontrola* Vzorek RNA ..... 9
   9.4. Programování přístroje pro měření Real-Time PCR ..... 9
10. ANALÝZA ..... 10
11. SPECIFIKACE ..... 11
   11.1. Citlivost ..... 11
   11.2. Detekce genotypu ..... 11
   11.3. Křížová reaktivita ..... 12
12. ODKAZY ..... 12
13. SYMBOLY ..... 13
14. REFERENCE ..... 13
15. KONTAKTNÍ INFORMACE ..... 13

## 1. POPIS PRODUKTU

Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 detekuje a charakterizuje genotyp viru hepatitidy C v lidském séru nebo plazmě, zahrnující 6 hlavních a nejpřevládajících genotypů HCV (1,1a,1b,2,3,3a,3b,4,5,6). Analytická citlivost je 100 IU/ml. Oblast v NSSB je zesílena a fluorescenční detekce je provedena pomocí filtrů FAM a HEX.

Do soupravy byla integrována interní kontrola, která kontroluje extrakci nukleových kyselin, inhibici PCR a chyby aplikace. Zesílení dat vnitřní kontroly je detekováno filtrem CyS. Vnitřní kontrolu lze přidat buď během RNA extrakce nebo PCR.

## 2. OBSAH

Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 se skládá z reagencií RT PCR v reálném čase a pozitivních a negativních kontrol:

| Komponenta | Reagencie | 100 testů | 50 testů | 25 testů |
|---|---|---|---|---|
| 1 | dH2O | (1000 µl) | (1000 µl) | (500 µl) |
| 2 | PCR Master Mix 1 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 3 | PCR Master Mix 2 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 4 | PCR Master Mix 3 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 5 | PCR Master Mix 4 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 6 | PCR Master Mix 5 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 7 | PCR Master Mix 6 | (2860 µl) | (1430 µl) | (715 µl) |
| 8 | Vnitřní kontrola | (560 µl) | (280 µl) | (140 µl) |
| 9 | Pozitivní kontrola 1 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |
| 10 | Pozitivní kontrola 2 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |
| 11 | Pozitivní kontrola 3 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |
| 12 | Pozitivní kontrola 4 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |
| 13 | Pozitivní kontrola 5 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |
| 14 | Pozitivní kontrola 6 | (120 µl) | (60 µl) | (30 µl) |

## 3. SKLADOVÁNÍ

Reagencie Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 PCR by měly být skladovány při teplotě -20 °C. Je třeba se vyvarovat opakovaného rozmrazování a zmrazování (>3x), protože to může snížit citlivost. Pokud mají být složky použity v malých množstvích, měly by být zmrazeny v poměrných množstvích.

Při přípravě PCR; Součásti by neměly být vystaveny pokojové teplotě déle než 10 minut. A součásti by neměly být vystaveny světlu nebo vzduchu více, než je nutné, lahvičky musí být uzavřeny s výjimkou pipetování. Doporučujeme připravit PCR na chladicím bloku a komponenty uchovávat v uzavřeném kontejneru.

Složky si zachovávají svou stabilitu až do data spotřeby uvedeného na etiketách, pokud jsou skladovány za doporučených podmínek.

## 4. POTŘEBNÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

- Real-time PCR přístroj Montania® 483, Montania® 484 nebo Montania® 4896 (Anatolia Geneworks), nebo další Real-Time PCR systém s FAM, HEX a CyS filtry (Anatolia Geneworks), nebo jiný Real-Time PCR systém s FAM, HEX a CyS filtry (iCycler, iQS, CFX-BioRad, 7500 Real-Time PCR System,-ABI, LightCycler 480-Roche, Stratagene Mx3005P, Mx3000P-Agilent, LineGeneK, LineGene 9600-Bioer, Rotorgene 6000, Q-Qiagen)
- 0,2 ml tenkostěnné PCR zkumavky, PCR destičky nebo proužky
- Systém pro extrakci nukleových kyselin Magnesia® 16 / Sada pro extrakci virových nukleových kyselin Magnesia® / Sada pro extrakci virové DNA / RNA Magrev®24 a Magrev® / Souprava pro spin virové RNA Bosphore (Anatolia Geneworks) nebo jiné vysoce kvalitní soupravy a systémy pro extrakci virové RNA

- Mraznička (-20 °C)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml. mikrocentrifugační zkumavky
- Kalibrované nastavitelné mikropipety
- Mikropipetovací špičky bez DNAse, RNAse, pyrogenu s filtry
- DNAse, RNAse, bez pyrogenu 1,5 nebo 2 ml. mikrocentrifugační zkumavky
- Jednorázové laboratorní rukavice

## 5. DŮLEŽITÉ POZNÁMKY A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

**Důležité!:**

- Výrobek by měl být dodáván na suchém ledu. Po příjezdu zkontrolujte přítomnost suchého ledu.
- Po doručení si ověřte datum spotřeby na obalu a etiketách tuby. Nepoužívejte produkty nebo komponenty, jejichž platnost vypršela.
- Měly by být použity kalibrované nebo ověřené mikropipety, DNAse, RNAse, bezpyrogenní mikropipetovací špičky s filtry a mikrocentrifugační zkumavky DNAse, RNAse, bez pyrogenu.
- Před zahájením zkušebního postupu by měly být všechny součásti důkladně rozmrazeny. Po rozmrazení by měly být všechny složky krátce odstředěny (odstřeďování po dobu 3-5 sekund) a dobře promíchány, aby bylo zajištěno

  homogenita před použitím.
- Součásti soupravy by měly být uchovávány na ledu nebo chladicím bloku, dokud není reakce připravena, a měly by být rychle vráceny na -20 °C.
- Izolace PCR a nukleových kyselin musí být prováděna v různých oddílech. Vzorky by měly být skladovány odděleně, aby se zabránilo kontaktu se součástmi soupravy.
- Informace o patogenech by měly být přezkoumány, aby byly známy zdravotní rizika.
- S biologickými vzorky by se mělo zacházet s maximální opatrností, měla by být použita vhodná mikrobiologická bezpečnostní skříň : Je třeba se vyvarovat fyzického kontaktu s patogeny; nošením laboratorních plášťů a rukavic, zákazem jídla nebo pití na pracovišti, zamezením přístupu neoprávněných osob

  do pracovní oblasti.
- Všechny patogenní odpady produkované během kroku izolace nukleové kyseliny; biologické vzorky a materiály, které jsou s nimi v kontaktu, by měly být zlikvidovány do zdravotnického odpadu a bezpečně zlikvidovány.

## 6. OMEZENÍ POUŽITÍ PRODUKTU

- Všechny složky mohou být použity výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Tento výrobek by měl být používán v souladu s touto uživatelskou příručkou personálem speciálně vyškoleným k provádění diagnostických postupů in vitro.
- Bosphore HCV Genotyping Kit v7 není určen k použití pro detekci HCV nebo pro kvantifikaci HCV.

## 7. PATOGEN

### Původci

Virus hepatitidy C je hepacivirus z rodiny virů Flaviviridae, který způsobuje hepatitidu C u lidí. Jedná se o malý, obalený, 9,6 kb jednovláknový RNA virus, který je klasifikován do šesti hlavních genotypů (1-6) s více než stovkou různých podtypů. (1)

Genotyp 1 je nejčastější a je ten, který má nejmenší odpověď na terapii. Vzhledem k tomu, že HCV má vysokou tendenci mutovat a neiniciuje závažnou odpověď v lidských T-lymfocytech imunitního systému (typ bílých krvinek),

vede k vysokému výskytu chronické infekce. Genetická heterogenita tohoto viru, který nelze pěstovat v buněčné kultuře, ztěžuje diagnostiku, snižuje účinnost léčby a brání vývoji vakcíny proti této nemoci (4,5).

Bylo pozorováno, že různé genotypy HCV vykazují různé odpovědi na antivirovou terapii. Délka a úspěšnost léčby HCV (PEG-IFN a ribavirin) závisí především na genotypu viru. Míra odpovědi na léčbu u genotypu 2 a 3 je vyšší než u genotypu 1 a 4 (70-80 % oproti 40-50 % v dlouhodobém horizontu). Úspěšná léčba genotypu 2 a 3 navíc trvá přibližně 6 měsíců, zatímco u genotypu 1 a 4 je to 1 rok (6,7,8). Uvádí se, že odpověď na léčbu je 0-3 % a ukončení léčby by mělo být zváženo, pokud hladina HCV RNA u pacientů neodhalila alespoň 2 log pokles po 12 týdnech léčby (9, 10). Bylo pozorováno, že doba trvání léčby akutní infekce genotypu 1 je kratší a úspěšnost je vyšší než u chronické infekce genotypu 1 (11, 12, 13). Léčba HCV genotypu 6 je lepší s léčbou založenou na interferonu ve srovnání s HCV genotypem 1. Klinické charakteristiky a profily nežádoucích účinků pacienta jsou však u HCV genotypu 6 a ostatních genotypů HCV podobné (17).

Nukleotidové sekvence genotypů se od sebe liší přibližně o 31-34%, podtypy se liší kolem 20 až 23%. Ačkoli se genotypy nejprve objevily endemicky v geograficky odlišných oblastech, v současné době jsou rozšířeny po celém světě. Vzhledem k tomu, že genotypy 1, 2 a 3 jsou široce pozorovány po celém světě, genotypy 4 a 5 převládají v Africe a prevalence viru hepatitidy C (HCV) genotypu 6 může být v některých částech jihovýchodní Asie až 50 %. Například v USA je přibližně 75 % všech případů způsobeno genotypem 1, 15 % genotypem 2, 5 % genotypem 3 a 1 % genotypem 4. Genotyp 6 je typický pro jihovýchodní Asii, genotyp 1 převládá v západní Evropě a USA, genotyp 3 je velmi běžný ve Velké Británii. (14, 15, 16, 17)

**Epidemiologie**

Odhaduje se, že HCV má celosvětovou prevalenci 3 % a postihuje přibližně 180 milionů lidí s 3 až 4 miliony nových infekcí ročně. U naprosté většiny infikovaných lidí (70-90 %) se rozvine chronická infekce. Ačkoli chronická infekce může být asymptomatická, je hlavní příčinou chronických onemocnění jater, včetně cirhózy u 20 až 50 % pacientů. Léčba může být účinná u 10-50 % pacientů v závislosti na použité terapii. (2)

**Přenos**

Předpokládá se, že hepatitida C se šíří kontaktem s infikovanou krví. Na rozdíl od mnoha jiných virů přenášených krví se však HCV může přenášet i nepřímými zdroji, jako je použitá žiletka, díky čemuž je HCV přenosnější než jiné viry přenášené krví - včetně HIV. Mezi běžné způsoby přenosu patří transfuze krevních produktů, intravenózní a perkutánní použití léků a jehel, pracovní úrazy mezi zdravotnickými pracovníky a jakékoli další kontakty krve na krev, jako jsou sexuální praktiky a přenos z matky na novorozence (přenos z matky na dítě). Statistické studie neodhalily žádné rizikové faktory pro přenos HCV v činnostech každodenního života (kýchání, kašel, objímání atd.). (2), (3)

## 8. METODA

Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 je založen na metodě Real Time RT PCR. Genetický materiál HCV je amplifikován technikou reverzní transkripce, protože je složen z RNA. RT-PCR, která se také označuje jako RNA PCR, je dvoustupňová reakce. Nejprve se z RNA reverzní transkripcí syntetizuje komplementární DNA a poté se komplementární DNA amplifikuje standardní PCR. Primer se váže na cílovou oblast RNA v RT-PCR a RNA-DNA double string je syntetizován enzymem reverzní transkriptázy pomocí templátu RNA pro komplementární DNA. Poté pokračuje standardní PCR.

Polymerázová řetězová reakce je technika, která se používá k amplifikaci oblasti DNA. K reakci dochází opakujícími se cykly ohřevu a chlazení. Hlavními složkami PCR jsou primery, dNTP, enzym Taq polymeráza, pufrovací roztok a templát. Jako stručné vysvětlení, primery jsou malé syntetické DNA, které žíhají do specifických oblastí templátu, aby zahájily syntézu. dNTP jsou stavebními kameny zesílených produktů. Taq polymeráza zesiluje templát DNA. Pufrovací roztok poskytuje úpravu pH potřebnou pro reakci a templát, jak je uvedeno, je cílovou oblastí pro syntézu. Kromě těchto složek se při RT PCR do reakce přidává reverzní transkriptáza a získává se syntéza cDNA z templátu RNA.

V technice Real Time PCR, na rozdíl od konvenční PCR, může být PCR produkt sledován během reakce. Real-Time PCR proto odstraňuje potřebu dalších analytických metod, jako je gelová elektroforéza, čímž se minimalizuje riziko kontaminace. Dvojitě značené sondy používané v reakci spolu s konvenčními činidly PCR umožňují detekci amplifikovaného cíle se zvýšenou citlivostí.

Test využívá 5' exonukleázovou aktivitu Taq polymerázy k rozštěpení duálně značené fluorescenční hydrolytické sondy během prodloužené fáze PCR.

Sonda je na 5' konci označena fluorescenční 'reportérovou' molekulou a na 3' konci další fluorescenční molekulou, která funguje jako 'zhášeč' pro 'reportér'. Když jsou dva fluorofory v těsné blízkosti a reportér je excitován světlem, nemůže být detekována žádná fluorescence reportéru. Během kroku prodloužení PCR se Taq polymeráza setká se sondou navázanou na templát a rozštěpí ji. Jakmile je reportér osvobozen od potlačovacího účinku zhášeče, lze detekovat fluorescenční signál.

Fluorescence generovaná reportérem se zvyšuje s akumulací produktu PCR ; bod, ve kterém signál stoupá nad úroveň pozadí a stává se rozlišitelným, se nazývá prahový cyklus (CT). Existuje lineární vztah mezi logaritmem počáteční částky templátu a jejím prahovým cyklem, takže počáteční množství neznámých šablon lze určit pomocí standardních křivek zkonstruovaných pomocí CT hodnot známých počátečních hodnot cílových šablon.

Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 využívá multiplexní PCR a do systému je začleněna interní kontrola za účelem kontroly izolačního postupu, kontroly možné inhibice PCR a aplikačních chyb. HCV RNA (cDNA) a vnitřní kontrola jsou koamplifikovány v jediné reakci za použití sekvenčně specifických primerů. Fluorescenční signál generovaný HCVamplifikací je detekován sondou označenou na 3' konci FAM/HEX, prostřednictvím kanálu FAM/HEX. Fluorescenční signál generovaný interním kontrolním zesílením je detekován druhou sondou (označenou na 5' konci jinou molekulou reportéru, Cy5) prostřednictvím kanálu Cy5.

## 9. PROCEDURA

### 9.1. Izolace RNA

Doporučujeme, aby se s Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 používal izolační systém Magnesia® 16 Nucleic Acid Extraction System / Magnesia® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / Magrev®24 a Magrev® Viral DNA/RNA Extraction Kit / Bosphore Viral RNA Spin Kit (Anatolia Geneworks). Izolace RNA by měla být provedena podle pokynů výrobce. Doporučený počáteční objem je 400 µl a eluční objem je 60 µl. Míra vnitřní kontroly, která by měla být použita během izolace pro každý systém, je 5 µl.

### 9.2. Součásti sady

#### 9.2.1. PCR Master Mix 1

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

Hlavní směs PCR obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu na vyšších ternperaturách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro genotypy HCV **1b,** 4 a pro interní kontrolu.

**9.2.2. PCR Master Mix 2**

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

Hlavní směs PCR obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu na vyšších ternperaturách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro genotypy HCV **1a, 2 a pro interní kontrolu.**

**9.2.3. PCR Master Mix 3**

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

Hlavní směs PCR obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu na vyšších ternperaturách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotyp 3 a pro interní kontrolu.

**9.2.4. PCR Master Mix 4**

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

Hlavní směs PCR obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu na vyšších ternperaturách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro genotyp HCV **1(1** c, d, e, f, g, h, i, j, k) a pro vnitřní kontrolu. (Viz část Analýza*).

**9.2.5. PCR Master Mix 5**

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

Hlavní směs PCR obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu na vyšších ternperaturách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotypy 5, 6 a pro interní kontrolu.

**9.2.6. PCR Master Mix 6**

PCR Master Mix obsahuje DNA polymerázu, různé soli a aditiva a dNTP mix. DNA polymeráza je ultra čistá, stabilní při vyšších teplotách a vysoce odolná vůči inhibitorům PCR.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu, která má zlepšenou aktivitu a stabilitu při vyšších teplotách.

PCR master mix obsahuje také dopředné a reverzní primery a duálně značené sondy specifické pro genotypy HCV 3a, 3b a pro interní kontrolu.

#### 9.2.7. Vnitřní kontrola

Součástí soupravy je interní kontrola pro kontrolu izolace RNA a inhibice PCR. Vnitřní ovládací prvek je syntetická molekula DNA. Přidává se do vzorku séra/plazmy, proteinázy Ka a směsi nosné RNA během izolace RNA pro kontrolu účinnosti izolace, inhibice PCR a aplikačních chyb. Množství IC, které by mělo být přidáno během izolace, je 5 µl na 400 µl vzorku. Doporučujeme přidat IC do negativní kontroly při extrakci. Alternativně lze interní kontrolu přidat přímo do hlavního mixu PCR a kontrolovat tak výhradně inhibici PCR. Za tímto účelem by mělo být pro každou reakci do hlavní směsi přidáno 0,4 µl vnitřní kontroly . **Upozornění: Není nutné zahrnovat interní kontrolu do reakce, pokud již byla přidána v průběhu extrakce.** Nedostatek interní kontrolní amplifikace u FAM/HEX negativních vzorků může znamenat problém v izolaci nebo inhibici PCR. V tomto případě je třeba izolaci a PCR opakovat. U vzorků, které obsahují vysokou virovou nálož, může být interní kontrola potlačena a není detekováno žádné zvýšení signálu.

#### 9.2.8. Pozitivní kontrola

Sada obsahuje 6 pozitivních kontrol;

Pozitivní kontrola 1: HCV 1b

Pozitivní kontrola 2: HCV 1a

Pozitivní kontrola 3: HCV 3

Pozitivní kontrola 4: HCV 1 (c, d, e, f, g, h, i, j, k)

Pozitivní kontrola 5: HCV 6

Pozitivní kontrola 6: HCV 3a

Každá pozitivní kontrola by měla být použita se svým specifickým PCR Master Mixem. Musí být zahrnuty do PCR, aby bylo možné testovat účinnost výhradně PCR.

### 9.3. Příprava RT-PCR

Před použitím se ujistěte, že jsou všechny součásti sady rozmraženy. Příprava PCR je popsána v tabulce níže.

| | |
|---|---|
| **PCR Master Mix** | 26µl |
| **Vnitřní kontrola*** | 0.4µl |
| **Vzorek RNA (Negativní/pozitivní kontrola)** | 14 µl |
| **Celkový objem** | 40 µl |

• Vnitřní kontrola by neměla být do reakce přidávána, pokud již byla přidána během kroku extrakce

Napipetujte 26 µl master mixu do zkumavek nebo proužků PCR a přidejte 14 µl RNA (vzorek/pozitivní nebo negativní kontrola). Zavřete uzávěr zkumavky. Ujistěte se, že roztok v každé zkumavce je na dně zkumavky. V případě potřeby odstředivka.

### 9.4. Programování přístroje pro měření Real-Time PCR

Tepelný protokol pro Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 se skládá ze dvou kroků; za prvé krok reverzní transkripce a za druhé kroky PCR v reálném čase; počáteční denaturace pro aktivaci Taq DNA polymerázy (s vlastností hot-start), dvoustupňový amplifikační cyklus a terminální prodleva. Data v reálném čase se shromažďují ve druhém kroku cyklu zesílení.

Tepelný protokol potřebný pro provoz s PCR Master Mix **1,** 2, 3 a 5 je uveden v následující tabulce:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Reverzní přepis | 50°C | 30:00 min. | |
| Počáteční denaturace | 95°C | 14:30 minut | |
| Denaturace | 97°C | 00:30 min. | |
| Annealing (Sběr dat) | 54°C | 01:20 minut. | 50 cyklů |
| Syntéza | 72°C | 00:15 min. | |
| Držení | 32°C | 01:00 min. | |

Tepelný protokol potřebný pro spuštění s PCR Master Mix4 a 6 je uveden v tabulce níže:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Reverzní přepis | 50°C | 30:00 min. | |
| Počáteční denaturace | 95°C | 14:30 minut | |
| Denaturace | 97°C | 00:30 min. | |
| Annealing (Sběr dat) | 58°C | 01:10 Min. | 50 cyklů |
| Držení | 32°C | 01:00 min. | |

Před zahájením reakce PCR v reálném čase pomocí genotypové sady Bosphore® HCV v7 je třeba provést následující kroky:

- Vyberte filtry, které chcete použít (FAM, HEX a CyS),
- Identifikace neznámých vzorků, pozitivních a negativních kontrol,
- Vyberte správný tepelný protokol.
- Spusťte experiment.

**10. ANALÝZA**

Na konci tepelného protokolu software Real-Time PCR Instrument automaticky vypočítá základní cykly a prahovou hodnotu.

Analýzu výsledků by měl provádět vyškolený personál, který absolvoval požadované školení pro analýzu dat Real-Time PCR. Doporučujeme, aby výsledky testů vyhodnotil odborný klinický lékař s přihlédnutím ke klinickým nálezům pacienta a výsledkům dalších testů.

Veškerá analýza se provádí automaticky při rutinním použití. Pokud však vyškolený personál, který absolvoval požadované školení od výrobce, považuje za nezbytné, pokud systém umožňuje co nejvíce snížit práh za účelem detekce mírného zesílení, je třeba dbát na to, aby prahová čára zůstala nad pozadím.

Výsledky testů by neměly být hlášeny, pokud nedojde k zesílení vnitřní kontroly u negativních vzorků. Pokud zjistíte zhoršení výkonu produktu, kontaktujte prosím výrobce (kontaktní informace naleznete na poslední stránce).

Vzorky, které překročí prahovou hodnotu v kanálu FAM a kanálu HEX, se zobrazí s pozitivními/negativními výsledky, vzorky, které prahovou hodnotu nesníží, se zobrazí jako "Bez Ct". Tyto vzorky jsou považovány za negativní nebo s virovou náloží pod detekčním limitem testu. U těchto nedetekovatelných vzorků by měla být zkontrolována také data CyS z vnitřní kontroly, aby se předešlo falešně negativním výsledkům.

Níže uvedená tabulka ukazuje možné výsledky a jejich interpretaci:

| **PCR Master Mix Ne** | **FAM Kanál** | **HEX Kanál** | **Cy5 (Vnitřní kontrola)** | **Výsledek** |
|---|---|---|---|---|
| **1** | + | - | -/+ | Vzorek je HCV 4 |
| **1** | - | + | -/+ | Vzorek je HCV 1b |
| **1** | - | - | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix **1** (genotyp 4 a **1b)** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | - | - | - | Test je nutné opakovat |
| 2 | + | - | -/+ | Vzorek je HCV Ia |
| 2 | - | + | -/+ | Vzorek je HCV 2 |
| 2 | - | - | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix 2 (genotyp Ia a 2) |
| 2 | - | - | - | Test je nutné opakovat |
| 3 | Žádný | + | -/+ | Vzorek je HCV 3 |
| 3 | Žádný | - | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix 3 (genotyp 3) |
| 3 | Žádný | - | - | Test je nutné opakovat |
| 4 | + | Žádný | -/+ | Vzorek je HCV **1** (HCV **1**c,d,e,f,g,h,l,j,k pokud je PCR Master Signál Mix **1** HEX a signál PCR Master Mix 2 FAM jsou negativní)* |
| 4 | - | Žádný | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix 4 (genotyp 1c,d,e,f,g,h,l,j,k) |
| 4 | - | Žádný | - | Test je nutné opakovat |
| 5 | - | + | -/+ | Vzorek je HCV 6 |
| 5 | + | - | -/+ | Vzorek je HCV 5 |
| 5 | - | - | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix 5 (genotyp 5 a 6) |
| 5 | - | - | - | Test je nutné opakovat |
| 6 | + | - | -/+ | Vzorek je HCV 3a pozitivní |
| 6 | - | + | -/+ | Vzorek je HCV 3b pozitivní |
| 6 | - | - | + | Vzorek je negativní na PCR Master Mix 6 (genotyp 3a a 3b) |
| 6 | - | - | - | Test je nutné opakovat |

*Některé genotypy 1a a 1b mohou být také amplifikovány pomocí PCR Master Mix 4. Interpretace genotypů 1a a 1b tedy musí být provedena výhradně podle dat z PCR Master Mix 1 a 2.

## 11. SPECIFIKACE

### 11.1. Citlivost

Analytická citlivost může být vyjádřena jako mez detekce: tj. nejmenší množství cílového markeru, které lze přesně detekovat. Detekční limit jednotlivého analytického postupu je nejnižší množství nukleové kyseliny ve vzorku, které lze detekovat, ale nemusí být nutně kvantifikováno jako přesná hodnota. Analytická citlivost nebo detekční limit pro testy NAT je vyjádřen 95% kladnou mezní hodnotou.

Bylo zjištěno, že analytický detekční limit pro Bosphore® HCV Genotyping Kit v7 je $1x10^2$ IU/ml (p=0,05). Citlivost byla stanovena pomocí sériových ředění RNA kalibrovaných podle mezinárodního standardu WHO pro testy HCV RNA NAT (NIBSC kód 06/100). Ředění byla testována v různých bězích v replikátech. Výsledky byly analyzovány metodou probit.

### 11.2. Detekce genotypu

Efektivita detekce a kvantifikace různých genotypů byla zajištěna jak sekvenční srovnávací analýzou, tak Real-Time PCR testem pomocí Worldwide HCV Performance Panel WWHV302(M) (Seracare). Následující genotypy byly testovány a shledány pozitivními pro následující genotypy:

| Člen panelu | Genotyp | HCV |
|---|---|---|
| 1 | 1b | + |
| 2 | 1a | + |
| 3 | 1b | + |
| 4 | 2a/2c | + |
| 6 | 3b | + |
| 8 | 3a | + |
| 10 | 4 | + |
| 11 | 4 | + |
| 12 | 5a | + |
| 14 | 6a | + |

### 11.3. Křížová reaktivita

K vyloučení potenciální zkřížené reaktivity byly použity jak důkazy o návrhu testu, tak experimentální studie. Sekvence primeru a sondy byly zkontrolovány na možnou homologii s jinými známými sekvencemi patogenů pomocí srovnávací analýzy sekvencí pomocí zarovnání databáze. Byly testovány vzorky HIV, HDV, HBV se známou vysokou pozitivitou, které byly shledány negativními.

## 12. ODKAZY


1. K. E. Nelson, C. Williams a N. Graham., Epidemiologie infekčních nemocí: Teorie a praxe, 15. července 2000, str :923-926
2. Theodore Sy a M. Mazen Jamal, Epidemiologie infekce virem hepatitidy C (HCV), Int J Med Sci. 2006; 3(2), s:41-46.
3. Anonym, Informační list o hepatitidě C č. 164. 2000, Světová zdravotnická organizace.
4. Simmonds et al, Hepatologie 21: 570-83, 1995
5. Klenerman a kol. (2009) PloS Med 6(6): el 000096. doi:10.1371/journal.pmed.1000096
6. Sizmann D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S, Zadak M, Babiel R. J Clin Viral 2007, 38:326-33.
7. JViralHepat.200714:213-20 řekl:
8. Zeuzem et al J Virový hepat 16: 75-90
9. Strader et al Hepatology 2004, 39, 1147-1171.
10. Davis et al Hepatology 2003, 38, 645-652.
11. Fried, M. W. et al. 2002. N. Engl. J. Med. 347: 975-982.
12. Manns, M. P., J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury, M. Ling a J. K. Albrecht. 2001. Lancet 358: 958-965.
13. Kamal et al Gastroeneterology 2006, 130, 632-638.
14. Lau a kol. J Infect Dis 1995, 171, 281-289.
15. Simmonds et al Hepatology 2005, 42, 962-73.
16. Mellor et al J. Clin. Mikrobiální. 34, 417-423.
17. Chao D.T., Abe K. a Nguyen M.H., Alimentární farmakologie a terapie, svazek 34, vydání 3, strany 286-296, 2011.13

## 13. SYMBOLY

Expirace

Šarže

Reference

Upozornění

Diagnostické zařízení *in vitro*

Výrobce

## 14. REFERENCE

Katalogové číslo:

**ABHCGJ** (25 reakcí/box)
**ABHCGK** (50 reakcí/box)
**ABHCGL** (100 reakcí/box)

## 15. KONTAKTNÍ INFORMACE


**Anatolia Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Ve Tic. A.S.**

**Address:** Eğitim Mah. Kasap İsmail Sk
Istanbul Plaza
No:10/23 Kadikoy 34722
ISTANBUL-TURKEY
Phone: +90 216 330 04 55
Fax: +90 216 330 00 42
E-mail: info@anatoliageneworks.com
www.anatoliageneworks.com



Registered Trademarks: Anatolia Geneworks® Montania®, Magnesia®, Magrev® and Bosphore® are registered trademarks of Anatolia Tani ve Biyoteknoloji A.S.