



## Bosphore® HCV Genotyping Kit v3

### NÁVOD K POUŽITÍ

Pouze pro *in vitro* diagnostiku



Číslo dokumentu: MB145v3f  
Datum schválení: Srpen 2016

IVD



## **OBSAH**

1. Popis produktu
2. Obsah balení
3. Skladování
4. Potřebný materiál a vybavení
5. Důležitá upozornění a bezpečnostní opatření
6. Omezení testu
7. Patogen
8. Metoda
9. Postup
  - 9.1. Izolace RNA
  - 9.2. Součásti kitu
    - 9.2.1. PCR Master Mix 1
    - 9.2.2. PCR Master Mix 2
    - 9.2.3. PCR Master Mix 3
    - 9.2.4. PCR Master Mix 4
    - 9.2.5. PCR Master Mix 5
    - 9.2.6. Interní kontrola
    - 9.2.7. Pozitivní kontrola
  - 9.3. Příprava RT-PCR
  - 9.4. Nastavení Real-Time PCR instrumentu
10. Analýza
11. Specifikace testu
  - 11.1. Senzitivita
  - 11.2. Detekce genotypu
  - 11.3. Zkřížená reaktivita
12. Literatura
13. Použité symboly
14. Kontakt

## 1. POPIS PRODUKTU

Bosphore® HCV Genotyping Kit v1 detekuje a určuje genotyp virové hepatitidy typu C v lidském séru nebo plasmě, pokrývá celkem 6 hlavních a nejčastější HCV genotypů (1, 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6). Analytická senzitivita testu je 100 IU/ml. Oblast NS5B je amplifikována a detekována fluorescenčně za pomoci FAM a HEX filtrů.

V testu je zahrnuta interní kontrola pro vyloučení PCR inhibice. Amplifikace interní kontroly je detekována pomocí Cy5 filtru. Interní kontrola může být přidána během RNA extrakce nebo před PCR.

## 2. OBSAH BALENÍ

Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 obsahuje real-time RT PCR reagentie, pozitivní a negativní kontrolu.

Položka	Reagentie	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	Interní kontrola	(560 µl)	(280 µl)	(140 µl)
8	Positive Control 1	(120 µl)	(60 µl)	(30 µl)
9	Positive Control 2	(120 µl)	(60 µl)	(30 µl)
10	Positive Control 3	(120 µl)	(60 µl)	(30 µl)
11	Positive Control 4	(120 µl)	(60 µl)	(30 µl)
12	Positive Control 5	(120 µl)	(60 µl)	(30 µl)

## 3. SKLADOVÁNÍ

PCR reagentie kitu Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 by měly být skladovány při teplotě -20° C. Zamezte opakovanému (>3 krát) zamrazení a rozmrazení PCR reagentií, které by mohlo nepříznivě ovlivnit senzitivitu testu. Pro testování malých počtů vzorků je doporučeno před prvním použitím reagentie alikvotovat a zamrazit.

Reagentie nesmí být při pokojové teplotě déle jak 10 minut a detekční mixy nesmí být vystaveny světlu a vzduchu déle, než po dobu nezbytně nutnou pro pipetování, lahvičky uzavírejte i v průběhu pipetování. Je doporučeno pracovat na chladícím bloku a udržovat lahvičky s detekčními mixy stále uzavřené.

Reagentie jsou stabilní do data expirace, vytištěném na obale, pokud jsou skladovány při doporučených podmínkách.

## 4. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ

- Montania® 484, Montania® 4896 Real-Time PCR Instrument (Anatolia Geneworks), nebo jiný Real-Time PCR systém s FAM, HEX a Cy5 filtry (iCycler, iQ5, CFX–BioRad, 7500 Real-Time PCR Systém–ABI, LightCycler 480–Roche, Stratagene Mx3005P, Mx3000P–Agilent, LineGeneK, LineGene 9600–Bioer, Rotorgene 6000, Q–Qiagen)
- 0.2 ml Thin-Wall PCR zkumavky nebo stripy
- Magnesia® 16 Nucleic Acid Extraction System / Magnesia® Viral Nucleic Acid Extraction Kit / Magrev®24 and Magrev® Viral DNA/RNA Extraction Kit / Bosphore Viral RNA Spin Kit (Anatolia Geneworks) nebo jiný vysoce kvalitní kit a systém pro extrakci RNA
- Mrazicí box (-20 °C)
- Stolní centrifuga s nástavcem pro 2 ml mikrocentrifugační zkumavky
- Kalibrované automatické pipety
- Špičky s filtrem (DNA a RNA sterilní, bez pyrogenů)

- 1,5 nebo 2 ml mikrocentrifugační zkumavky (DNA a RNA sterilní, bez pyrogenu)
- Jednorázové laboratorní rukavice

## 5. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

### DŮLEŽITÉ!

- Kit by měl být transportován na suchém ledu. Zkontrolujte ihned po převzetí.
- Ihned po převzetí zkontrolujte data expirace. Nepoužívejte po uplynutí data expirace.
- Používejte pouze kalibrované nebo verifikované zkumavky a špičky, které musí být DNA a RNA sterilní, bez pyrogenu.
- Před použitím musí být všechny součásti kitu důkladně rozmrazeny a následně krátce centrifugovány (stočení po dobu 3-5 sekund), ujistěte se, zda jsou homogenně promíchány.
- Se součástmi kitu by se mělo pracovat a manipulovat na ledu nebo na chladícím bloku a neprodleně po jejich použití musí být zpět uloženy při -20 °C.
- PCR a izolace nukleových kyselin musí být prováděna v oddělených prostorách. Vzorky a kity musí být skladovány odděleně, aby se zabránilo kontaktu a kontaminaci.
- Musí být uvedeny informace o patogenu, jako prevence před zdravotními riziky.
- Se vzorky sér musí být manipulováno s extrémní opatrností a měly by být označeny třídou mikrobiologického rizika: Zamezte kontaktu s patogenem, používejte laboratorní plášť a ochranné rukavice, je zakázáno jíst a pít na pracovišti a na pracoviště je zakázán přístup nepověřeným osobám.
- Veškerý infekční materiál vyprodukovaný během izolace, včetně vzorků sér a materiálů, které přišly do kontaktu se vzorky, musí být zlikvidován jako infekční odpad dle bezpečnostních pokynů.

## 6. OMEZENÍ TESTU

- Všechny součásti kitu musí být použity pouze pro *in vitro* diagnostiku.
- Kit musí být použit v souladu s pokyny v návodu k použití, a musí s ním pracovat pouze zdravotnický personál vyškolený pro metody *in vitro* diagnostiky.

## 7. PATOGEN

### Původce

Virus hepatitidy C patří mezi hepaticiry čeledě Flaviviridae a u lidí způsobuje hepatitidu typu C. Jedná se o malý, obalený, jednovláknový RNA virus o velikosti 9,6 kb, který je klasifikován jako šest hlavních genotypů (1 – 6) s více jak 100 různými subtypy. (1)

Genotyp 1 se vyskytuje nejčastěji, nicméně má nejpomalejší odpověď na léčbu. Virus HCV získal vysokou tendenci mutovat, díky tomu neaktivuje některé odpovědi T-lymfocytů imunitního systému (bílé krvinky), což vede k vysoké míře chronických infekcí. Genetická heterogenita viru, který nemůže být kultivován, ztěžuje diagnostiku, léčbu a vývoj vakcín. (4, 5)

Bylo pozorováno, že různé genotypy HCV vykazují rozdílnou odpověď na antivirotickou léčbu. Doba a úspěšnost léčby (PEG-IFN a ribavirin) převážně závisí na genotypu. Odpověď na léčbu genotypu 2 a 3 je vyšší, než u genotypu 1 a 4 (70 – 80 % oproti 40 – 50 %). Úspěšná léčba u genotypu 2 a 3 trvá přibližně 6 měsíců, zatímco u genotypu 1 a 4 trvá 1 rok. (6, 7, 8) Bylo zjištěno, že odpověď na léčbu je 0 – 3%, a léčba by měla být přerušena, pokud hladina HCV RNA u pacientů nevykazuje snížení alespoň 2 log po 12 týdnech léčby. (9, 10) Doba léčby genotypu 1 ve stádiu akutní infekce je kratší a úspěšnější než u chronické infekce. (11, 12, 13). Terapie pomocí interferonu je u genotypu 6 úspěšnější ve srovnání s genotypem 1. Avšak klinické charakteristiky a vedlejší efekty léčby jsou u genotypu 6 shodné s ostatními genotypy (17).

Sekvence nukleotidů se u jednotlivých genotypů liší v 31 – 34 %, u subtypů o 20 – 23 %. V minulosti se jednotlivé genotypy vyskytovaly endemicky v geograficky oddělených oblastech, dnes už jsou však všechny genotypy rozšířené po celém světě. Genotypy 1, 2 a 3 se běžně vyskytují ve všech oblastech, genotypy 4 a 5 převládají v Africe. Například, v USA je přibližně 75 % všech případů způsobeno genotypem 1, 15 % případů genotypem 2, 5 % genotypem 3 a 1 % genotypem 4. Genotyp 6 je typický

pro Jihovýchodní Asii, genotyp 1 převažuje v západní Evropě a USA a genotyp 3 je velmi častý ve Velké Británii. (14, 15, 16, 17)

### **Epidemiologie**

Celosvětová prevalence infekce HCV se pohybuje v běžné populaci kolem 3 %, tedy přibližně 180 milionů lidí a 3 – 4 milionů nových případů ročně. Naprostá většina případů (70 – 90 %) se vyvinula v chronickou infekci. Přestože chronická infekce může být asymptomatická, je hlavní příčinou chronických onemocnění jater, včetně cirhózy a to u 20 – 50 % pacientů. Léčba může být úspěšná u 10 -50 % pacientů v závislosti na typu léčby. (2)

### **Způsoby přenosu**

Hepatitis typu C je přenášena kontaktem s infikovanou krví. Nicméně, na rozdíl od dalších virů přenášených krví, může dojít k nákaze HCV i přes nepřímý zdroj infekce, např. použitou břitvou, což dělá z HCV snadněji přenositelnou než jiné viry, včetně HIV. Mezi nejčastější cesty přenosu patří krevní transfuze, injekční aplikace drog a jiné použití jehel, profesionální riziko u zdravotnického personálu, sexuální kontakt, přenos z matky na novorozence a jiné cesty, kde dochází k přímému kontaktu s krví. Statistické studie uvádějí nulové riziko přenosu HCV běžnými aktivitami (kýcháním, kašláním, objímáním atd.). (2,3)

## **8. METODA**

Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 je založen na principu real-time RT PCR metody. K amplifikaci genetického materiálu HCV, kterým je molekula RNA, je nejprve nutná reverzní transkripce. RT-PCR je dvoukroková reakce. Nejprve je přepsána RNA do formy cDNA pomocí reverzní transkripce a následně je tato cDNA amplifikována pomocí standardní PCR. Primer navázaný k cílové oblasti RNA během RT-PCR a RNA-DNA dvoušroubovice jsou syntetizovány pomocí reverzní transkriptázy za použití RNA templátu. Následuje standardní PCR.

PCR (polymerázová řetězová reakce) je metoda, při které se amplifikuje určitá oblast DNA. Reakce se skládá z opakujících se cyklů zahřívání a ochlazování ve specifickém rozmezí. Hlavní složky PCR jsou primery, dNTP, Taq polymeráza, pufr a templát. Primery jsou krátké syntetické oligonukleotidy DNA, které nasedají na specifickou oblast templátu a zahajují syntézu. dNTP je stavebním materiálem amplifikovaného produktu. Taq polymeráza amplifikuje DNA templát. Pufr poskytuje vhodné pH nezbytné pro reakci a templát, který je cílovou oblastí pro syntézu. Reverzní transkriptáza je nezbytná pro RT PCR a cDNA syntézu z RNA.

Během real time PCR dochází k zaznamenávání PCR produktu během reakce. Proto real time PCR eliminuje potřebu další analýzy, např. elektroforézy na gelu, přičemž minimalizuje riziko kontaminace. Dvojitě značené sondy přidané k PCR reagentům umožňují detekovat amplifikovaný cíl se zvýšenou senzitivitou.

Test využívá 5' exonukleázové aktivity Taq polymerázy k odštěpení dvojitě fluorescenčně značené sondy během fáze extenze.

Sondy jsou na 5' konci označené fluorescenční molekulou tzv. reportérem a na 3' konci jinou fluorescenční molekulou, tzv. zhášečem. Pokud jsou tyto fluorofory v těsné blízkosti a reportér vyzařuje záření, fluorescence nemůže být detekována. Během fáze elongace Taq polymeráza odštěpí sondu od templátu. Díky tomu přestane být signál reportéru potlačen a fluorescence může být detekována.

Fluorescence produkovaná reportérem se zvyšuje v závislosti na kumulaci PCR produktu. Bod, při kterém signál přesáhne hodnotu fluorescence pozadí a stává se tak rozlišitelným, se nazývá threshold cycle ( $C_T$ ). Díky lineárnímu průběhu mezi log počátečního množství templátu a threshold cycle, může být stanoveno výchozí množství neznámého templátu pomocí standardní křivky sestavené z  $C_T$  známého množství cílového templátu.

Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 využívá principu multiplex PCR, při kterém je zahrnuta interní kontrola, která slouží pro kontrolu izolace a případných PCR inhibicí. HCV RNA (cDNA) a interní kontrola jsou amplifikovány během jedné reakce, za využití sekvenčně specifických primerů.

Fluorescenční signál generovaný amplifikací HCV je s pomocí sondy na 3' konci (FAM/HEX), detekován ve FAM/HEX kanále. Fluorescenční signál generovaný amplifikací interní kontroly je pomocí druhé sondy, značené molekulou Cy5 na 5' konci, detekován v Cy5 kanále.

## **9. POSTUP**

### **9.1. Izolace RNA**

Pro izolaci je doporučen 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) nebo jiný vysoce kvalitní RNA extrakční systém. RNA izolace by měla být provedena dle instrukcí výrobce. Doporučený objem vzorku je 400 µl a eluční objem 60 µl. Objem interní kontroly, která by měla být přidána před izolací, je 5 µl.

### **9.2. Součásti kitu**

#### **9.2.1. PCR Master Mix 1**

PCR mix obsahuje DNA polymerázu, různé pufrы a dNTP mix. DNA polymeráza je v ultra čistém stavu, stabilní při vysokých teplotách a vysoce rezistentní vůči PCR inhibitorům.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu s vylepšenou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách. PCR master mix obsahuje také forward (přední) a reverse (zadní) primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotypy 1b a 4 a pro interní kontrolu.

#### **9.2.2. PCR Master Mix 2**

PCR mix obsahuje DNA polymerázu, různé pufrы a DTP mix. DNA polymeráza je v ultra čistém stavu, stabilní při vysokých teplotách a vysoce rezistentní vůči PCR inhibitorům.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu s vylepšenou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách. PCR master mix obsahuje také forward (přední) a reverse (zadní) primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotypy 1a a 2 a pro interní kontrolu.

#### **9.2.3. PCR Master Mix 3**

PCR mix obsahuje DNA polymerázu, různé pufrы a DTP mix. DNA polymeráza je v ultra čistém stavu, stabilní při vysokých teplotách a vysoce rezistentní vůči PCR inhibitorům.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu s vylepšenou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách. Obsahuje také forward (přední) a reverse (zadní) primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotyp 3 a pro interní kontrolu.

#### **9.2.4. PCR Master Mix 4**

PCR mix obsahuje DNA polymerázu, různé pufrы a DTP mix. DNA polymeráza je v ultra čistém stavu, stabilní při vysokých teplotách a vysoce rezistentní vůči PCR inhibitorům.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu s vylepšenou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách. PCR master mix obsahuje také forward (přední) a reverse (zadní) primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotyp 1 (1 c, d, e, f, g, h, i, j, k) a pro interní kontrolu.

#### **9.2.5. PCR Master Mix 5**

PCR mix obsahuje DNA polymerázu, různé pufrы a DTP mix. DNA polymeráza je v ultra čistém stavu, stabilní při vysokých teplotách a vysoce rezistentní vůči PCR inhibitorům.

PCR master mix obsahuje také unikátní reverzní transkriptázu s vylepšenou aktivitou a stabilitou při vyšších teplotách. PCR master mix obsahuje také forward (přední) a reverse (zadní) primery a duálně značené sondy specifické pro HCV genotypy 5 a 6 a pro interní kontrolu.

#### **9.2.6. Interní kontrola**

Součástí kitu je interní kontrola, která slouží pro kontrolu správnosti izolace RNA a PCR inhibicím. Skládá se ze syntetické DNA molekuly. Přidává se do séra/plasmy společně s proteinázou K a

nosičovou RNA v průběhu izolace a slouží jako kontrola správné izolace a PCR inhibicí. Množství IC přidané během izolace je 5 µl na 400 µl séra/plasmy. Případně může být interní kontrola přidána pouze do PCR master mixu a takto slouží pouze pro kontrolu PCR inhibicí. V tomto případě se přidává 0,4 µl interní kontroly do mastermixu pro každý vzorek. **Upozornění: Není nutné použít interní kontrolu do mastermixu, pokud byla použita již během izolace.** Nedostatečný signál amplifikace interní kontroly ve FAM/HEX negativních vzorcích může indikovat problém s izolací nebo přítomnost PCR inhibicí. V tomto případě musí být opakována izolace i PCR. U vzorků s vysokou virovou náloží může být signál interní kontroly potlačen a nemusí být detekován.

### 9.2.7. Pozitivní kontrola

Kit obsahuje 5 pozitivních kontrol; HCV 1b RNA, HCV 1a RNA, HCV 3 RNA a HCV 1 (1 c, d, e, f, g, h, i, j, k) RNA a HCV 6 RNA. Pozitivní kontrola 1 obsahuje genotyp HCV1b, pozitivní kontrola 2 obsahuje genotyp HCV1a, pozitivní kontrola 3 obsahuje genotyp HCV3, pozitivní kontrola 4 obsahuje genotyp HCV1c, pozitivní kontrola 5 obsahuje genotyp HCV6. Každá pozitivní kontrola by měla být použita ke specifickému detekčnímu PCR mixu. Pozitivní kontrola musí být zahrnuta do PCR ke kontrole správnosti PCR.

### 9.3. Příprava RT-PCR

Ujistěte se, zda jsou všechny reagenty před použitím rozmrazeny. Pro přípravu PCR postupujte dle níže uvedené tabulky. Množství uvedené v tabulce je určeno pro 1 reakci. Vynásobte uvedené množství počtem vzorků pro celkové množství mastermixu. Pokud připravujete mastermix pro více jak 5 vzorků, přidejte 10 % reagentů navíc.

PCR Master mix	26 µl
Vzorek RNA (negativní/pozitivní kontrola)	14 µl
Celkový objem	40 µl

Pipetujte 26 µl Master mixu do PCR zkumavky nebo stripu a přidejte 14 µl RNA (vzorku/ pozitivní/ negativní kontroly). Uzavřete víčkem. Ujistěte se, zda je roztok na dně zkumavky. V případě potřeby centrifugujte.

### 9.4. Nastavení Real-Time PCR instrumentu

Teplotní profil kitu Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 je dvoukrokový, nejprve probíhá reverzní transkripce a poté real time PCR. Reakce začíná počáteční denaturací, která aktivuje HotStarTaq DNA polymerázu, pokračuje dvoukrokovou amplifikací a závěrečným „hold“. Real time data jsou detekována až v druhém kroku amplifikace.

1) Nastavení teplotního profilu pro Master mix 1, 2, 3 a 5			
Reverzní transkripce	50 °C	30:00 min.	
Počáteční denaturace	95 °C	14:30 min.	
Denaturace	97 °C	00:30 min.	} 50 cyklů
Hybridizace (Annealing) (Data collection)	54 °C	01:20 min.	
Syntéza	72 °C	00:15 min.	
Hold	22 °C	05:00 min.	

2) Nastavení teplotního profilu pro Master mix 4			
Reverzní transkripce	50 °C	30:00 min.	
Počáteční denaturace	95 °C	14:30 min.	
Denaturace	97 °C	00:30 min.	} 50 cyklů
Hybridizace (Annealing) (Data collection)	58 °C	01:10 min.	
Hold	22 °C	05:00 min.	

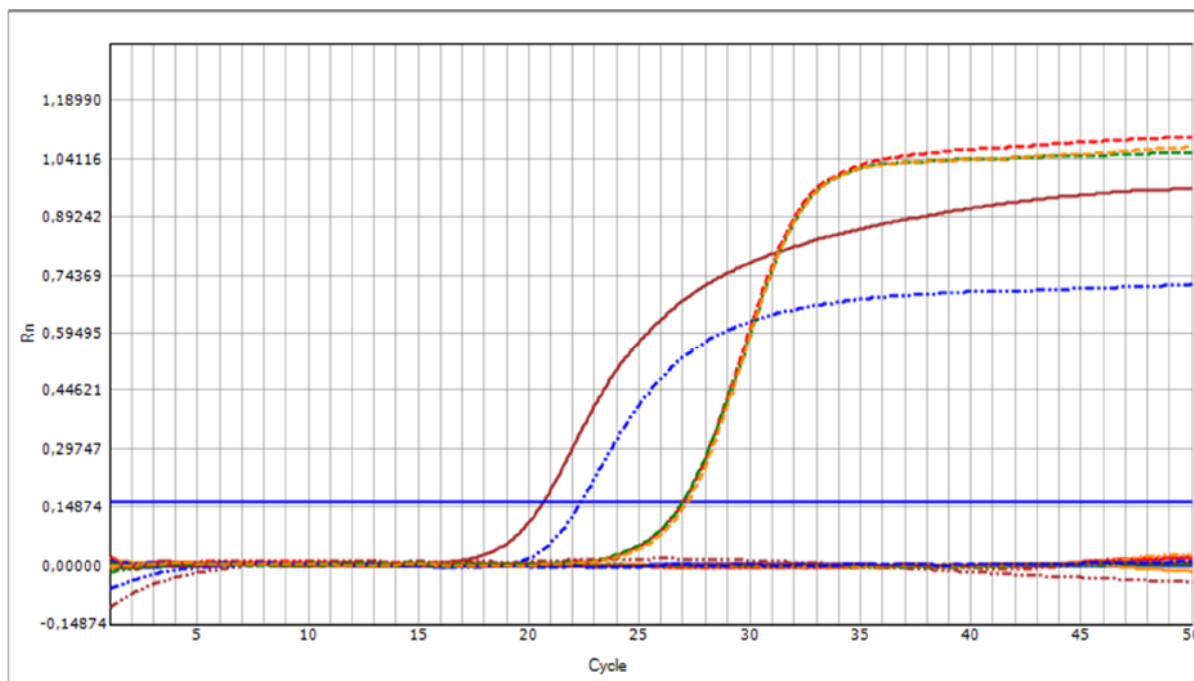
Před zahájením real time PCR reakce musí být nastaveno:

- Vyberete potřebné filtry (FAM, HEX a Cy5)
- Určete vzorky, pozitivní a negativní kontroly
- Nastavte správné teplotní profily
- Spustíte experiment

## 10. ANALÝZA

Po skončení teplotních režimů software Real-Time PCR přístroje automaticky vyhodnotí křivky a threshold.

Příklad amplifikační křivky uveden v Obr. 1.



Obr. 1. Amplifikační křivka kitu Bosphore® HCV Genotyping Kit v3

Analýza a hodnocení výsledků by mělo být provedeno vyškolenou osobou pro analýzu real time PCR dat. Je doporučeno výsledky testu hodnotit ve spolupráci s lékařem, s klinickými nálezy pacienta a dalšími výsledky testů.

Všechny analýzy jsou prováděny v rutinním provozu. Nicméně pokud se vyškolený personál, který má požadované školení od výrobce, rozhodne snížit threshold co nejnižší pro detekci slabě pozitivních vzorků, je nezbytné věnovat pozornost udržení threshold křivky nad pozadím.

Výsledky testu by neměly být interpretovány, pokud není detekována amplifikace interní kontroly u negativních vzorků. Kontaktujte prosím výrobce v případě, že byly pozorovány potíže se stanovením. (Kontaktní údaje naleznete na poslední straně).



Vzorky, které přesahují hodnotu threshold v kanálech FAM, HEX a Cy5 jsou uvedeny jako pozitivní/negativní. Vzorky, které nepřesáhly threshold, jsou označeny „No Ct“. Tyto vzorky jsou považovány za negativní nebo s virovou náloží nižší než je detekční limit tohoto testu. U těchto vzorků by měla být zkontrolována interní kontrola (Cy5 data) pro vyloučení falešné negativy.

Tabulka možnými výsledky a jejich interpretace:

Master mix	Kanál (Channel)			Výsledek
	FAM	HEX	Cy5	
1	+	-	+/-	HCV 4
1	-	+	+/-	HCV 1b
1	-	-	-	Test musí být opakován.
2	+	-	+/-	HCV 1a
2	-	+	+/-	HCV 2
2	-	-	-	Test musí být opakován.
3	none	+	+/-	HCV 3
3	none	-	-	Test musí být opakován.
4	+	none	+/-	HCV 1 (1c, d, e, f, g, h, l, j, k)
4	-	none	-	Test musí být opakován.
5	-	+	+/-	HCV6
5	+	-	+/-	HCV5
5	-	-	-	Test musí být opakován.

## 11. SPECIFIKACE

### 11.1. Senzitivita

Analytická senzitivita může být vyjádřena jako detekční limit, nejnižší množství cílového markeru, který je s přesností detekován. Detekční limit samostatného analytického postupu je nejnižší množství nukleové kyseliny ve vzorku, kterou lze detekovat, ale není nezbytně nutná kvantifikace na přesnou hodnotu. Analytická senzitivita a detekční limit NAT analýzy je 95 % pozitivní cut-off hodnoty.

Analytický detekční limit kitu Bosphore® HCV Genotyping Kit v3 je  $1 \times 10^2$  IU/ml ( $p=0,05$ ). Senzitivita byla stanovena pomocí sériového ředění RNA standardů kalibrovaných WHO pro HCV RNA NAT analýzu (NIBSC Code 06/100). Ředění bylo testováno v několika testování a opakování. Výsledek byl analyzován pomocí probit analýzy.

### 11.2. Detekce genotypu

Efektivita detekce a kvantifikace různých genotypů byl srovnávána se sekvenováním a real time PCR testem za použití Worldwide HCV Performance Panel WWHV302 (M) (Seracare). Byly testovány následující genotypy, které byly stanoveny jako pozitivní.

Panel	Genotyp	HCV (FAM)
1	1b	+
2	1a	+
3	1b	+
4	2a/2c	+
6	3b	+
8	3a	+
10	4	+
11	4	+
12	5a	+
14	6a	+

### 11.3. Zkřížená reaktivita

Z důvodu eliminace zkřížené reaktivity byly použity jak podklady pro navržení testu, tak experimentální studie. Sekvence primerů a sond byly studovány pro zjištění případných homologií s dalšími sekvencemi jiných patogenů a srovnávány za použití databází. Byly testovány vysoce pozitivní vzorky s HIV, HDV, HBV a shledány jako negativní.

## 12. LITERATURA

1. K. E. Nelson, C. Williams, and N. Graham., Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice, July 15, 2000, p:923-926
2. Theodore Sy and M. Mazen Jamal, Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection, Int J Med Sci. 2006; 3(2), p:41-46.
3. Anonymous, Hepatitis C Fact Sheet No. 164. 2000, World Health Organization.
4. Simmonds et al, Hepatology 21: 570-83, 1995
5. Klenerman et al (2009) PloS Med 6(6): e1000096. doi:10.1371/journal.pmed.1000096
6. Sizmann D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S, Zadak M, Babel R. J Clin Virol 2007, 38:326-33.
7. J Viral Hepat. 2007 14: 213-20
8. Zeuzem et al J Viral 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, and J. K. Albrecht. 2001. Lancet 358:958-965
13. Kamal et al Gastroenterology 2006, 130, 632-638
14. Lau et al J Infect Dis 1995, 171, 281-289.
15. Simmonds et al Hepatology 2005, 42, 962-73.
16. Mellor et al J. Clin. Microbiol. 34, 417-423.
17. Chao D.T., Abe K. and Nguyen M.H., Alimentary Pharmacology & Therapeutics, Volume 34, Issue 3, pages 286-296, 2011.

### 13. SYMBOLY

Použitelné do	
Šarže	
Katalogové číslo	
Uchovávejte při	
Dbejte pokynů k použití	
Výrobce	
In vitro diagnostický test	

### 14. KONTAKT

#### Výrobce

Anatolia Geneworks  
Egitim Mh. Kasap Ismail Sk.  
No:10/23 Kadikoy 34722  
ISTANBUL-TURKEY  
T +90 216 330 04 55  
F +90 216 330 00 42

[info@anatoliageneworks.com](mailto:info@anatoliageneworks.com)  
[www.anatoliageneworks.com](http://www.anatoliageneworks.com)

#### Dodavatel

GALI spol. s r.o.  
Ke Stadionu 179  
513 01 Semily  
Czech Republic  
T + 420 481 689 050  
F + 420 481 689 051

[info@gali.cz](mailto:info@gali.cz)  
[www.gali.cz](http://www.gali.cz)

Registrovaná značka: Anatolia Geneworks® Montania®, Magnesia® and Bosphore® jsou registrované značky Anatolia Tani ve Biyoteknologi. A.S.