

KLİNİK ÖRNEKLERDEN KANTİTATİF OLARAK HEPATİT C VİRUS RNA'SININ SAPTANMASINDA COBAS AMPLICOR VE COBAS TAQMAN SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF COBAS AMPLICOR AND COBAS TAQMAN SYSTEMS FOR THE QUANTITATION OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN CLINICAL SAMPLES

Alpaslan ALP¹, Gülşen HASÇELİK¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(alp@superposta.com)

ÖZET

HCV enfeksiyonlarının tanısında ve tanı konmuş hastaların takibinde, hızlı ve güvenilir sonuç veren yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışma, HCV enfeksiyonunun tanısında klinik örneklerden kantitatif olarak HCV-RNA saptanmasında, Cobas Amplicor sistemi (Roche Diagnostics) ile Cobas Taqman sistemini (Roche Diagnostics) karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına HCV tanısı amacıyla gönderilen 84 serum örneği alınmıştır. Bu örneklerin 52 (%61.9)'sinde iki yöntemle de pozitif sonuç elde edilirken, 32 (%38.1) örnekte iki yöntemle de HCV-RNA saptanamamıştır. Yöntemler arasında uyumsuz sonuç tespit edilmemiştir. Pozitif sonuç elde edilen örnekler incelendiğinde, Cobas Amplicor sistemiyle ortalama 822.452 IU/ml HCV-RNA elde edilirken, Cobas Taqman sistemiyle ortalama 3.069.984 IU/ml HCV-RNA elde edildiği görülmüştür. Çalışmamızda, Cobas Taqman sisteminin saptadığı HCV-RNA düzeyinin, Cobas Amplicor sisteminin saptadığı düzeyden yaklaşık 3.7 kat fazla olması nedeniyle, Cobas Taqman sisteminin HCV enfeksiyonlarının takibinde güvenle kullanılabilecek bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Hepatit C virus, HCV RNA, PCR, kantitasyon, Cobas Amplicor, Cobas Taqman.

ABSTRACT

It is necessary to use rapid and reliable methods for the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infections and follow up of the patients with HCV infection. The purpose of this study was to compare Cobas Amplicor system (Roche Diagnostics) and Cobas Taqman system (Roche Diagnostics) for the quantitative detection of HCV-RNA in clinical samples. Eightyfour serum samples that were sent to Hacettepe University Adult Hospital Clinical Microbiology Laboratory were included in the study. Fiftytwo (61.9%) of these samples were found to be positive by two methods while 32 (38.1%) samples were found to be negative by two methods. There were no discrepant results between the methods. When positive samples were evaluated it was found that Cobas Amplicor system detected an average HCV-RNA of 822.452

IU/ml while Cobas Taqman system detected an average HCV-RNA of 3.069.984 IU/ml. Since the mean number of HCV-RNA detected by Cobas Taqman system was 3.7 fold of the average number of HCV-RNA detected by Cobas Amplicor system, it was concluded that Cobas Taqman system was a reliable method for the follow up of patients with HCV infection.

Key words: *Hepatitis C virus, HCV RNA, PCR, quantitation, Cobas Amplicor, Cobas Taqman.*

GİRİŞ

Hepatit C virusu (HCV) kronik karaciğer hastalıklarının en önemli nedenlerinden biridir¹. Bu virusla enfeksiyon, karaciğer kanseriyle sonuçlanabilmesi nedeniyle transplantasyon endikasyonu oluşturabilmektedir. Dünya genelinde 170 milyon kişi HCV ile enfekte-dir. Kan transfüzyonu sonrasında görülen "non-A, non-B" hepatitlerinin %90-95'inden kan ve kan ürünleriyle bulaşabilen HCV sorumludur². HCV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan en pratik yöntem kan örneklerinde antikor aranmasıdır. Bu amaçla çeşitli rekombinant ve sentetik antijenlerin kullanıldığı ELISA testleri geliştirilmiştir. Bu testler gerek tarama gerekse tanı amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak özellikle serokonversiyonun kısa sürede saptanmasında bu testler yetersiz kalmaktadır. Bunun yanı sıra immün sistemi baskılanmış kişilerde de bu testlerin bir faydası olmamaktadır.

HCV enfeksiyonlarının tanısında ve tanı konmuş hastaların takibinde, hızlı ve güvenilir sonuç veren yöntemlerin kullanılması gerekmektedir³. Bu amaçla kullanılmakta olan moleküler yöntemlerde hem viral nükleik asit izolasyonunun, hem de elde edilen nükleik asitlerin çoğaltılarak saptanmasının hızlı bir şekilde yapılması hedeflenmektedir. HCV-RNA kantitasyonu, immünolojik serokonversiyon öncesinde aktif viremi varlığını ortaya çıkarması açısından büyük önem taşır. Buna ek olarak HCV-RNA kantitasyonu, antiviral tedavi etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla hastaların takibinde kullanılan önemli bir parametre haline gelmiştir⁴. Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden kantitatif olarak HCV-RNA saptanmasında kullanılan bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) platformu olan Cobas Taqman sisteminin (Roche Diagnostics) performansını test etmek ve bu sistemi Cobas Amplicor sistemi (Roche Diagnostics) ile karşılaştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik Örnekler ve Nükleik Asit İzolasyonu

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına HCV tanısı amacıyla gönderilen 84 serum örneği dahil edildi. Örneklerden nükleik asit izolasyonu, Cobas Amplicor sistemi için "Magna Pure", Cobas Taqman sistemi için ise "High Pure" otomatize izolasyon sistemi ile gerçekleştirildi.

"Magna Pure" sistemi: Bu sistemde, ticari kit (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche Diagnostics) içinde bulunan ve sistemin gereksinimlerini içeren reaktiflerin, cihazın ilgili pozisyonlarına yerleştirilmesinden sonra, içinde önceden hazırlanmış lizis tamponu ve kantitasyon standardı içeren özel kartuşlar (A-ring) üzerine serum örneklerinden 100'er µl eklendi ve otomatik işlem başlatıldı. Cihaz içerisinde öncelikle, lizis tamponu içinde bulunan proteinaz K'nın etkisiyle nükleik asitler açığa çıkarıldı. Son-

rasında, yine lizis tamponu içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonunun etkisiyle nükleik asitlerin, karışıma eklenen manyetik boncuklara bağlanması sağlandı. Birkaç yıkama işlemiyle, manyetik boncuklara bağlanmamış olan maddeler ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra yüksek ısı etkisi ve tuz konsantrasyonunun düşürülmesiyle birlikte nükleik asitler manyetik boncuklardan ayrılarak saf olarak elde edildi. Tüm bu işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Cihazın içerisinde, örneklerden otomatik olarak nükleik asit izolasyonu yapan bir kısım ile işlemler sonunda örneklerin bekletildiği bir soğutma bloğu mevcuttu. İzolasyon işlemi sona erdiğinde (yaklaşık 2-2.5 saat) bu kısımda bekletilen kartuşlar alındı ve direkt olarak Cobas Amplicor cihazına yerleştirilip, hedef nükleik asitlerin çoğaltma işlemine geçildi.

“High Pure” sistemi: Bu sistemde, “High Pure System Viral Nucleic Acid” kiti kullanılarak, üretici firmanın (Roche Diagnostics) tavsiyeleri doğrultusunda nükleik asit izolasyon işlemi manuel olarak gerçekleştirildi.

HCV-RNA Çoğaltılması ve Kantitasyonu

Nükleik asit izolasyonu sonrasında elde edilen nükleik asitler Cobas Amplicor ve Cobas Taqman sistemi kullanılarak çoğaltıldı ve her iki yöntemle elde edilen HCV-RNA düzeyleri karşılaştırıldı.

Cobas Amplicor sistemi: Cobas Amplicor cihazında gerçekleştirilen RT (revers transkriptaz)-PCR işleminde HCV Monitor Test kiti (Roche Diagnostics) kullanıldı. Bu amaçla, üretici firmanın önerileri doğrultusunda PCR karışımları hazırlandıktan sonra tüpler cihaza yerleştirildi ve sırasıyla ters transkripsiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon işlemleri uygulandı. İşlemin ilk basamağında, biyotinle işaretli primerlerin hedef RNA dizisine bağlanması, RT enzimi ile RNA’dan cDNA sentezi ve daha sonra cDNA’dan milyonlarca kopya komplementer hedef DNA sentezi gerçekleştirildi. Son aşamada ise, çoğaltılmış ürünler kantitatif olarak belirlendi. Bunun için, çoğaltılmış olan ürünlere kimyasal denatürasyon uygulandı. Oluşan tek zincirli DNA’ların üzerine, komplementer oligonükleotid problemler eklenerek biyotinle işaretli amplikon-prob hibridleri oluşturuldu. Daha sonra bu amplikon-prob hibridine, biyotin varlığından yararlanılarak “avidin-horseradish peroksidaz” konjugatı bağlandı. Hidrojen peroksit ve 3,3',5,5' tetra metilbenzidin (TMB) içeren substrat solüsyonunun eklenmesiyle, “avidin-horseradish peroksidaz” TMB’yi okside ederek renk değişikliğine neden oldu. Bu renk değişikliği Cobas Amplicor cihazı tarafından algılanarak kantitatif olarak rapor edildi. Uygulanan testin kalite kontrolü için, her testte kitle birlikte verilmiş olan düşük pozitif, yüksek pozitif ve negatif kontroller de kullanıldı.

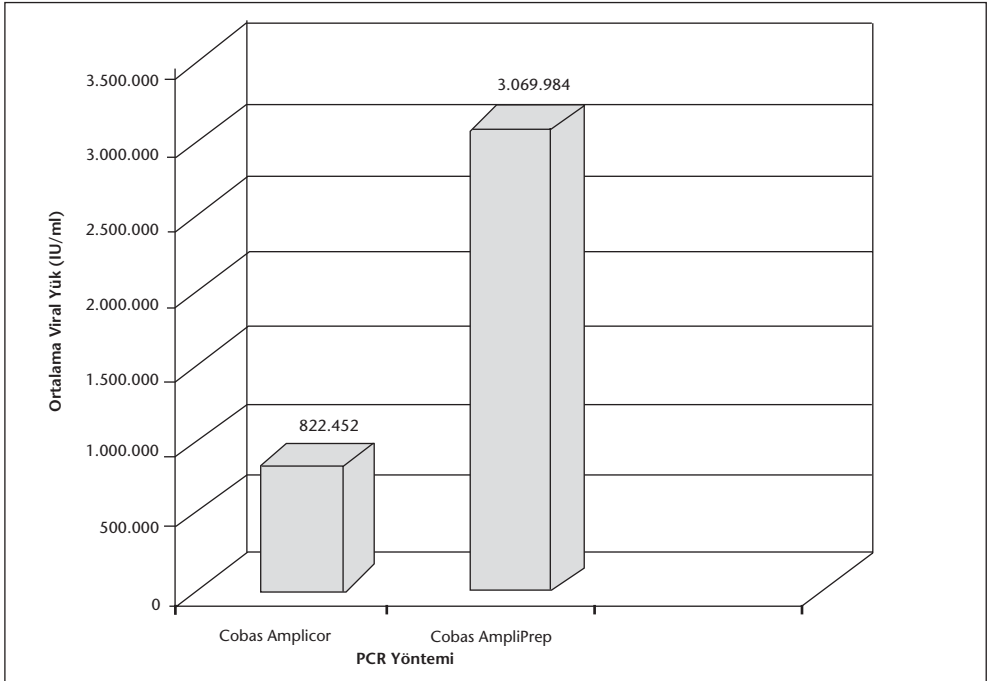
Cobas Taqman 48 sistemi: İzole edilen nükleik asitler, ayrıca Cobas Taqman 48 cihazında da çoğaltıldı ve saptandı. Bu amaçla üretici firmanın (Roche Diagnostics) önerileri doğrultusunda PCR karışımları hazırlandıktan sonra tüpler cihaza yerleştirildi ve sırasıyla ters transkripsiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon işlemleri uygulandı. Bu işlemler için HCV genomunun bütün genotipler için iyi korunmuş bir bölgesi olan 5'-translasyona uğramamış bölgesi, hedef bölge olarak seçildi. PCR ürünlerinin saptanması amacıyla hidroliz problemleri kullanıldı. TaqMan problemleri olarak da bilinen bu problemlerin 5' ve 3' uçları florokrom maddelerle işaretlidir (dual labelled probe). Probun 5' ucunda raportör florok-

rom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturmaması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması, probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenir.

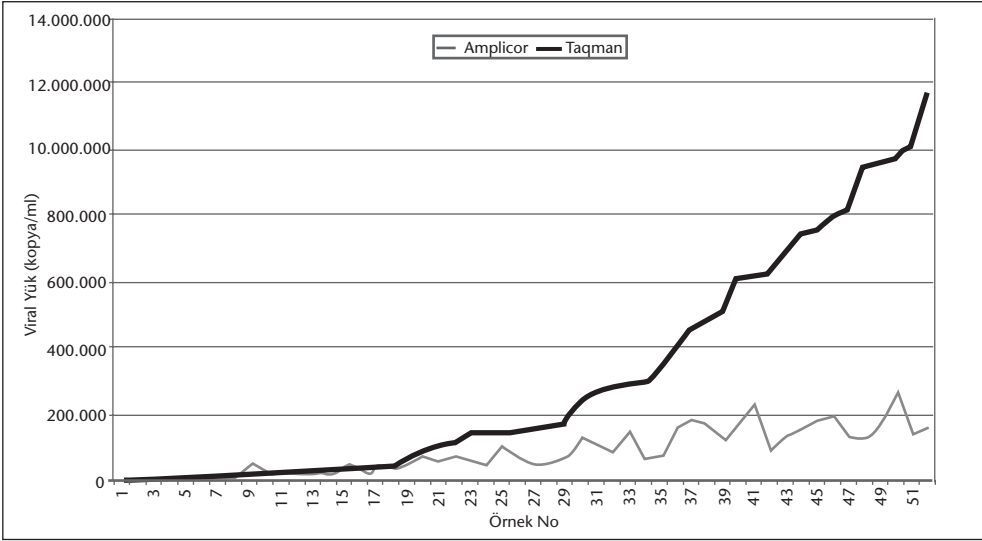
BULGULAR

Çalışılan 84 serum örneğinin 52 (%61.9)'sinde her iki PCR yöntemiyle de pozitif, 32 (%38.1)'sinde ise negatif sonuç elde edilmiş; yöntemler arasında uyumsuz sonuç saptanmamıştır. Her iki PCR yöntemiyle de pozitif sonuç alınan 52 örneğin ortalama HCV-RNA düzeyleri karşılaştırıldığında; Cobas Amplicor sistemiyle 822.452 IU/ml, Cobas Taqman sistemiyle 3.069.984 IU/ml HCV-RNA elde edildiği görülmüştür (Şekil 1).

İki yöntemle elde edilen HCV-RNA miktarları her örnek için tek tek karşılaştırıldığında, özellikle yüksek kopya sayılı örneklerde Cobas Taqman sistemiyle elde edilen sayıların daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 1. Her iki PCR yöntemiyle pozitif sonuç alınan örneklerden (n= 52) elde edilen ortalama HCV-RNA düzeyleri.



Şekil 2. Klinik örneklerden HCV-RNA kantitasyonunda Cobas Amplicor ve Cobas Taqman sistemlerinin karşılaştırılması.

TARTIŞMA

Kronik HCV enfeksiyonu, siroz ve hepatoselüler karsinoma ile sonuçlanabilme riskini taşıdığı için, halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Günümüzde HCV enfeksiyonlarının tedavisinde, interferon-alfa ve ribavirin içeren kombine tedavi şeması uygulanmaktadır. Başarılı bir tedavi şeması, serum HCV-RNA düzeyinin sıfıra inmesi olarak tanımlanmaktadır^{5,6}. Ayrıca, tedavinin kesilmesinden sonraki 24 aylık dönemde de HCV-RNA düzeylerinin sıfırda kalması gerekmektedir. Ancak her hastada tedaviye iyi bir yanıt alınamamaktadır^{7,8}. İyi yanıt alınamayan hastalarda HCV-RNA düzeyi, tedavi sırasında veya tedavi bitiminden sonra pozitif olarak kalmaktadır. Her iki durumda da, serum HCV-RNA düzeylerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır⁹. Özellikle antiviral tedavi sonrasındaki virolojik relapsların başlangıç aşamasında, düşük serum HCV-RNA düzeylerinin saptanabilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak olan moleküler testler hem kısa sürede sonuç verebilmeli, hem de güvenilir kantitatif sonuçlar sunabilmelidir. Albadales ve arkadaşlarının¹⁰ çok merkezli çalışmasında, toplam 2292 serum örneğinde HCV-RNA saptanmasında Cobas Amplicor sisteminin verimliliği araştırılmış ve bu yöntem, ilk versiyon olan ve kapalı bir cihaz olmadan kullanılan Amplicor testiyle karşılaştırılmıştır. Çalışmada, Cobas Amplicor sisteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %96 ve %95 olarak bulunmuş ve bu sistemin rutin laboratuvarlarda serum örneklerinde HCV-RNA saptanmasında kullanılabilecek bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰. Gerken ve arkadaşları¹¹ da 2000 yılında yayımlanan çalışmalarında, Cobas Amplicor sisteminin klinik örneklerden HCV-RNA saptanmasındaki etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışma, o dönemde yeni geliştirilmiş olan "Cobas Amplicor HCV Monitor Test Version 2.0" ile gerçekleştirilmiş ve 87 hastaya ait toplam 211 serum örneği ile çalışılmıştır. Çalışma sonu-

cunda, testin HCV-RNA kopyası elde etmedeki verimliliği, dinamik aralığı ve tekrarlanabilirliğinin, bir önceki versiyona göre daha iyileştirilmiş olduğu sonucuna varılmıştır¹¹. Bu verimlilik artışında özellikle amplikon dilüsyonu ve amplifikasyon sonrası saptama basamaklarının otomatize hale getirilmesinin rol oynadığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte, HCV-RNA kantitasyonunda, kullanılan PCR teknolojisinden kaynaklanan hata payları olabileceğine dikkat çekilmiştir. Ancak o zamanın koşulları da göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede, kontaminasyon riskinin azalması, iş yükü ve zamandan kazanç gibi faktörler de hesaba katıldığında, mevcut koşullar içinde rutin laboratuvar uygulamaları için bu sistemin kullanılabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Yapılan farklı çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçların da etkisiyle, Cobas Amplicor sistemi rutin tanı laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulmuştur¹²⁻¹⁵. Ancak gelişen teknolojiyle birlikte gerçek zamanlı PCR yöntemleri özellikle 2000'li yıllarda, rutin kullanım için daha fazla tercih edilen yöntemler haline gelmeye başlamıştır. 2006 yılında Sarrazin ve arkadaşları¹⁶, kronik hepatit C'li hastalara ait 108 serum örneğinde HCV-RNA kantitasyonunu Cobas Amplicor, Cobas Taqman ve Versant HCV (bDNA) yöntemleriyle gerçekleştirmişler ve nispeten daha yeni bir yöntem olan Cobas Taqman sistemiyle elde edilen sonuçların, diğer yöntemlerle elde edilen sonuçlarla iyi bir uyum gösterdiğini, bazı genotipler için ise daha yüksek HCV-RNA düzeylerini saptayabildiğini ifade etmişlerdir. Halfon ve arkadaşlarının¹⁷, kronik HCV enfeksiyonlu hastaların tedavi takibinde gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, toplam 59 hasta örneğinde Cobas Taqman ve Abbott "real-time" PCR sistemleri değerlendirilmiş ve her iki ticari sistemin de HCV enfeksiyonlu hastaların takibinde viral yük saptanması amacıyla güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, yüksek duyarlılığa sahip bu tür "real-time" PCR yöntemlerinin geliştirilmesi nedeniyle, kalitatif HCV-RNA saptama yöntemlerinin, yerini kantitatif testlere bırakması gerektiği vurgulanmıştır¹⁷.

Serum HCV-RNA düzeyinin kantitatif olarak saptanmasının, antiviral tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde vazgeçilmez bir yöntem haline geldiği, farklı ticari testlerle gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir¹⁸⁻²². Bu çalışmalarda varılan ortak sonuç, gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin serum HCV-RNA düzeylerinin saptanmasında tercih edilmesi gereken yöntemler olduğudur. Bizim çalışmamızda da Cobas Taqman sisteminin HCV enfeksiyonlarının moleküler tanısında ve tedavi etkinliğinin izlenmesinde güvenle kullanılabilecek, pratik ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle fazla miktarda HCV-RNA içeren örneklerde, Cobas Taqman real-time PCR sistemi ile Cobas Amplicor sistemi arasındaki fark belirgin olarak ortaya konmuştur. Bu tür örneklerde Cobas Taqman sisteminin kullanımı, çok daha yüksek duyarlılıkla kantitasyon sağlayabilmesi nedeniyle daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Yüksek düzeyde HCV-RNA içeren örneklerdeki kantitasyon, özellikle tedaviye başlamadan hemen önce ve tedavinin ilk üç ayındaki süreçte çok önemlidir¹⁶. Bunun nedeni, her hasta için en yüksek HCV-RNA düzeyinin bu dönemde olması ve söz konusu dönemdeki değişimlerin saptanmasının tedavi etkinliğinin anlaşılmasında belirleyici olmasıdır. Bu nedenle özellikle bu dönemdeki serum HCV-RNA kantitasyonunun çok hassas bir şekilde gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızın verileri, Cobas Taqman sistemiyle elde edilen ortalama HCV-RNA düzeyinin, Cobas Amplicor sistemi ile elde edilen düzeyden yaklaşık 3.7 kat yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Her örnek için iki yöntemle elde edilen HCV-RNA miktarları karşılaştırıldığında, özellikle düşük miktarda HCV-RNA içeren örneklerde, iki yöntemle elde edilen RNA miktarları arasında çok fazla fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak yüksek miktarda HCV-RNA içeren örneklerde, iki yöntemle elde edilen HCV-RNA miktarları arasındaki farkın, Cobas Taqman sistemi lehine arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, çalışma öncesindeki “real-time” Cobas Taqman sistemiyle daha yüksek düzeyde HCV-RNA saptanabileceği öngörüsünü doğrulamıştır^{17,18}. Aradaki farkın 3.7 kat gibi fazla bir miktarda olmasının, Cobas Amplicor sisteminde saptanabilen üst limitin, Cobas Taqman sistemi ile saptanabilen üst limite göre daha düşük olmasıyla açıklanabileceği düşünülmüştür. Antiviral tedavi etkinliğinin izlenmesinde, kullanılan PCR yönteminin saptama aralığının geniş olması büyük avantaj sağlamaktadır. Böylece, belirli aralıklarla ölçülen serum HCV-RNA düzeylerinin güvenilirliği artmaktadır.

Bu çalışma sonucunda, kontaminasyon riskinin az olması, uygulama kolaylığı, hızlı sonuç alınması, iş yükü ve zamandan kazanç gibi avantajlar da eklendiğinde, Cobas Taqman sisteminin günümüz koşullarında rutin laboratuvarlarda HCV-RNA kantitasyonu için kullanılabilecek uygun bir seçenek olduğu sonucuna varılmıştır. Rutin laboratuvar uygulamalarında, kullanılan mevcut yöntemin, duyarlılığı daha yüksek yeni bir yöntemle değiştirilmesi durumunda, elde edilecek olan kantitatif sonuçların yorumlama hatasına neden olmaması için klinisyenler uyarılmalıdır. Başlangıçtaki geçiş sürecinde, kısa bir süre için bile olsa, eski ve yeni yöntemin birlikte kullanılmasıyla, kantitasyonda nasıl bir fark olduğu gözlenebilecek ve yorumlama hataları önlenmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (5 Suppl 1): 21-9.
2. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-8.
3. Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 713-21.
4. Sizmann D, Boeck C, Boelter J, et al. Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman system. *J Clin Virol* 2007; 38: 326-33.
5. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med* 2002; 347: 975-82.
6. Sarrazin C. Highly sensitive hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. *J Clin Virol* 2002; 25: 23-9.
7. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Eng J Med* 2000; 343: 1666-72.
8. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-65.
9. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006; 3: 35-40.
10. Albadalejo J, Alonso R, Antinazzi R, et al. Multicenter evaluation of the Cobas Amplicor HCV assay, an integrated PCR system for rapid detection of hepatitis C virus RNA in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 862-5.

11. Gerken G, Rothaar T, Rumi MG, et al. Performance of the Cobas Amplicor HCV monitor test, version 2.0, an automated reverse transcription-PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2210-4.
12. DiDomenico N, Link H, Knobel R, et al. Cobas Amplicor: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine PCR. *Clin Chem* 1996; 42: 1915-23.
13. Poljak M, Seme K, Koren S. Evaluation of the Cobas Amplicor hepatitis C virus PCR system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2983-4.
14. Krajden M, Zermann R, Khan A, et al. Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: comparison of analytical sensitivity, clinical performance, and workflow of the Cobas Amplicor HCV test version 2.0 and the HCV RNA transcription-mediated amplification qualitative assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2903-7.
15. Germer JJ, Lins MM, Jensen ME, et al. Evaluation of the MagNa Pure LC instrument for extraction of hepatitis C virus RNA for the Cobas Amplicor hepatitis C virus test, version 2.0. *J Clin Microbiol* 2003; 3503-8.
16. Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 729-37.
17. Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, et al. Real-time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2507-11.
18. Wolff D, Gerritzen A. Comparison of the Roche Cobas Amplicor Monitor, Roche Cobas Ampliprep/Cobas Taqman and Abbott real time test assays for quantification of hepatitis C virus and HIV RNA. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 917-22.
19. Kleiber J, Walter T, Haberhausen G, et al. Performance characteristics of a quantitative, homogeneous Taq-Man RT-PCR test for HCV RNA. *J Mol Diagn* 2000; 2: 158-66.
20. Yang JH, Lai JP, Douglas SD, et al. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods* 2002; 102: 119-28.
21. Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003; 37: 600-9.
22. Desombere I, Vlierberghe HV, Couvent S, et al. Comparison of qualitative (Cobas Amplicor HCV 2.0 versus Versant HCV RNA) and quantitative (Cobas Amplicor HCV monitor 2.0 versus Versant HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2590-7.