

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, verze 2.0

cobas

Rx Only

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
HIV-1 Test, v2.0

HI2CAP

48 Tests

P/N: 05212294 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

ÚČEL POUŽITÍ

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, verze 2.0 (v2.0) je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) v lidské EDTA plazmě nebo ze suché kapky plazmy ze **cobas**® separační karty na plazmu (**PSC**) s použitím zařízení COBAS® AmpliPrep pro automatizované zpracování vzorků a analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Tento test dokáže kvantifikovat RNA HIV-1 v rozsahu 20–10 000 000 kopií/ml (33 až $1,67 \times 10^7$ mezinárodních jednotek [IU]/ml v EDTA plazmě a 738–10 000 000 kopií/ml (1230 až $1,67 \times 10^7$ mezinárodních jednotek [IU]/ml) v suché kapce plazmy **PSC**). Jedna kopie RNA HIV-1 je ekvivalentní 1,67 IU dle 1. mezinárodního standardu WHO pro techniky ke zjištění RNA HIV-1 založené na nukleové kyselině (NAT) (NIBSC 97/656)³⁶.

Tento test se používá ve spojení s klinickými údaji a dalšími laboratorními markery postupu nemoci k určování klinické terapie pacientů infikovaných virem HIV-1 skupiny M a HIV-1 skupiny O. Pomocí testu lze posuzovat pacientovu prognózu stanovením výchozí hladiny RNA HIV-1 nebo sledovat účinky antiretrovirové terapie stanovením změn koncentrací RNA HIV-1 v průběhu antiretrovirové terapie.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 není určen k plošnému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost HIV-1, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem HIV-1.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je původce syndromu získané imunodeficiency (AIDS)¹⁻³. Infekce virem HIV se může přenést pohlavním stykem, stykem s infikovanou krví či krevními deriváty nebo z infikované matky na plod⁴. V průběhu tří až šesti týdnů od vystavení viru HIV se u infikovaných jedinců většinou vytvoří krátkodobý, akutní syndrom s příznaky podobnými chřipce a spojené s vysokými hladinami virémie v periferní krvi⁵⁻⁸. U nejvíce infikovaných osob následuje obvykle v době čtyř až šesti týdnů od prvních příznaků imunitní reakce specifická pro HIV a pokles virémie v plazmě^{9,10}. Po sérokonverzi se u infikovaných osob obvykle dostavuje klinicky stabilní asymptomatická fáze, která může trvat i léta¹¹⁻¹³. Pro asymptomatické období je charakteristická přetrvávající nízká virémie v plazmě¹⁴ a postupný pokles CD4⁺ T lymfocytů, což vede k závažné imunodeficienci, četným oportunním infekcím, malignitám a smrti¹⁵. Koncentrace virů v periferní krvi je sice během asymptomatické fáze infekce relativně nízká, nicméně replikace a odstraňování viru jsou dynamické procesy, kde je vysoká hodnota produkce viru a infekce buněk CD4⁺ vyvážena stejnými vysokými hodnotami virové clearance, odumírání infikovaných buněk a doplňování buněk CD4⁺, což vede k poměrně stálým hladinám plazmatické virémie a CD4⁺ buněk¹⁶⁻¹⁸.

Kvantitativní měření virémie HIV v periferní krvi ukázala, že vyšší hladiny viru mohou být spojeny se zvýšeným rizikem klinické progresy onemocnění HIV a že snížení hladiny viru v plazmě může být spojeno se sníženým rizikem klinické progresy¹⁹⁻²¹. Hladiny viru v periferní krvi je možno kvantifikovat měřením HIV antigenu p24 v séru, a to kvantitativní kultivací HIV z plazmy, nebo přímým měřením virové RNA v plazmě pomocí amplifikace nukleové kyseliny nebo technologiemi amplifikace signálu²²⁻²⁶.

Oddíl s informacemi o revizi dokumentu se nachází na konci tohoto dokumentu.
05447933001-19CS

Světová zdravotnická organizace také nyní doporučuje použití vzorků suché kapky plazmy (dried spot) k rozšíření dosahu testování virové nálože v prostředí s omezenými zdroji bez připraveného přístupu k flebotomickým službám nebo možností odolné přepravy vzorků EDTA plazmy²⁷. Suchá kapka plazmy z **PSC**, která také stabilizuje RNA HIV v sušené plazmě, může tak zlepšit testování virů v těchto podmínkách tím, že umožní přepravu vzorků na dlouhé vzdálenosti a v horších podmínkách prostředí, než EDTA plazma.

Antigen p24 je hlavní protein jádra HIV a v séru se vyskytuje buď volně nebo vázaný na protilátku proti p24. Volný antigen p24 je možno měřit komerční soupravou pro enzymovou imunoanalýzu (EIA), ovšem jako marker virové nálože má antigen p24 jen omezený význam, protože je detekovatelný jen u 20 % asymptomatických pacientů a u 40–50 % symptomatických pacientů. Citlivost testů na antigen p24 sice zvyšují postupy disociace komplexu antigen-protilátka, ale i tak zůstává tento virový protein u většiny asymptomatických pacientů nezjistitelný²².

Infekční HIV v plazmě může být kultivován inokulací do aktivovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) od normálních dárců. Množství se stanovuje inokulací PBMC se sériovým ředěním vzorku plazmy. Pro sledování hladin viru u infikovaných osob má kvantitativní kultivace pouze omezený význam, protože jen malý podíl virových částí je infekčních *in vitro*. U asymptomatických osob je infekční virus často nedetekovatelný²².

RNA HIV v plazmě může být kvantifikována pomocí technologií amplifikace nukleové kyseliny, například polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)²⁸⁻³⁰. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 využívá technologii PCR pro dosažení maximální senzitivity a dynamického rozsahu pro kvantitativní detekci RNA HIV-1 v plazmě s antikoagulantem EDTA a ze suché kapky plazmy **PSC**.

PRINCIPY POSTUPU

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru lidského imunodeficitu typu 1 (HIV-1) v lidské EDTA plazmě nebo ze suché kapky plazmy **PSC**. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 je založena na třech hlavních procesech: (1) přípravě vzorku pro izolaci RNA HIV-1; (2) reverzní transkripci cílové RNA pro vytvoření komplementární DNA (cDNA), a (3) simultánní PCR amplifikaci cílové cDNA a detekci rozštěpených, dvojité značených oligonukleotidových detekčních sond specifických pro cíl.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 umožňuje automatizovanou přípravu vzorku následovanou automatizovanou reverzní transkripcí, PCR amplifikací a detekcí cílové RNA HIV-1 a kvantifikačního standardu (QS) HIV-1 Armored RNA. Činidlo Master Mix obsahuje primery a sondy specifické pro RNA HIV-1 i RNA HIV-1 QS. Master Mix byl vyvinut pro zajištění ekvivalentní kvantifikace subtypů HIV-1 skupiny M a HIV-1 skupiny O. Detekce amplifikované DNA je prováděna pomocí cílové specifické a QS specifické, dvojité značené oligonukleotidové sondy, která umožňuje nezávislou identifikaci amplikonu HIV-1 a HIV-1 QS.

Stanovení množství virové RNA HIV-1 se provádí pomocí kvantifikačního standardu HIV-1 QS. Ten kompenzuje účinky inhibitorů a kontroluje přípravné a amplifikační procesy, čímž umožňuje přesnější kvantifikaci RNA HIV-1 v každém vzorku. HIV-1 QS je neinfekční Armored RNA konstrukce, která obsahuje sekvence HIV s vazebnými oblastmi pro primer identickými s cílovou RNA HIV-1 a unikátní vazebné oblasti pro sondu, které umožní odlišení amplikonu HIV-1 QS od cílového HIV-1 amplikonu.

HIV-1 QS se přidává do každého vzorku o známém počtu kopií a prochází následujícími kroky přípravy vzorku, reverzní transkripcí, simultánní PCR amplifikací a detekcí štěpených, dvojité značených oligonukleotidových detekčních sond. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vypočítává koncentraci RNA HIV-1 v testovaných vzorcích srovnáním signálu HIV-1 se signálem HIV-1 QS u každého vzorku a kontroly.

Volba cílové sekvence

Volba cílové sekvence RNA pro HIV-1 závisí na identifikaci oblastí v genomu HIV-1, která vykazuje maximální zachování sekvencí mezi jednotlivými subtypy HIV-1 skupiny M a skupiny O. Aby bylo možné určit vysokou genetickou variabilitu viru, jsou současně začleny dvě oblasti genomu HIV pro amplifikaci a detekci pomocí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Dvě sondy specifické pro cílovou sekvenci a jedna pro QS dvojité značená oligonukleotidová sonda umožňují nezávislou identifikaci amplikonu HIV-1 a HIV-1 QS. Obdobně je vhodná volba primerů a dvojité značených oligonukleotidových sond nezbytná pro schopnost testu amplifikovat subtypy HIV-1 skupiny M a HIV-1 skupiny O. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 využívá reverzní transkripcie a primery PCR amplifikace, které definují sekvence ve vysoce konzervovaných oblastech HIV-1 genu *gag*³³ a oblasti LTR HIV-1.

Příprava vzorku

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 využívá automatizovanou přípravu vzorku na zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí generické technologie vychytávání založené na křemíku. Při postupu se zpracovává 850 µl plazmy nebo extraktu na bázi SPEX z PSC. Virové částice HIV-1 jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným pufrům, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou RNA HIV-1 před působením RNáz v plazmě. Proteáza a známý počet molekul HIV-1 QS Armored RNA jsou přidány do každého vzorku spolu s lytickým činidlem a magnetickými skleněnými částicemi. Následně je směs inkubována a RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS jsou navázány na povrch magnetických skleněných částic. Nenávané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny propláchnutím magnetických skleněných částic. Po separaci magnetických skleněných částic a dokončení oplachování jsou absorbované nukleové kyseliny eluovány při zvýšené teplotě pomocí vodného roztoku. Zpracovaný vzorek obsahující magnetické skleněné částice a uvolněnou RNA HIV-1 a HIV-1 QS RNA je přidán do amplifikační směsi a přemístěn do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Cílové RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS jsou vystaveny reverzní transkripci a následně amplifikovány a simultánně detekovány štěpením dvou cílově specifických a jedné QS specifické, dvojité značené oligonukleotidové sondy.

Reverzní transkripcie a PCR amplifikace

Reverzní transkripcie a amplifikační PCR reakce je prováděna pomocí termostabilního rekombinantního enzymu DNA polymerázy (Z05) druhu *Thermus* Z05. Za přítomnosti dvojmocného manganu (Mn²⁺) a za příznivých pufovacích podmínek vykazuje Z05 aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak DNA polymerázy^{31,32}. To umožňuje reverzní transkripci a PCR amplifikaci spolu s detekcí amplikonu v reálném čase.

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), kde probíhá jak reverzní transkripcie, tak PCR amplifikace. Reakční směs se zahřívá, aby se downstream primery napojily specificky na cílovou RNA HIV-1 a na kvantifikační standard RNA HIV-1 QS. V přítomnosti Mn²⁺ a nadbytku deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin, deoxyguanozin, deoxycytidin, deoxyuridin a deoxythymidin trifosfáty, polymerizuje Z05 polymeráza hybridizované primery za vzniku vláken DNA komplementárního k cílové RNA.

Amplifikace cíle

Zpracované vzorky se přidají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), ve kterých probíhá PCR amplifikace. Po reverzní transkripci cílové RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS zahřeje termocyklér v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 reakční směs tak, aby došlo k denaturaci hybridů RNA:cDNA a expozici specifických primerových cílových sekvencí. Při chlazení směsi se primery připojí k cílové DNA. V přítomnosti Mn²⁺ a nadbytku deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin, deoxyguanozin, deoxycytidin, deoxyuridin a deoxythymidin trifosfáty, polymerizuje Z05 polymeráza hybridizované primery spolu s cílovým templatem a vznikají molekuly dvouřetězcové DNA, zvané amplikony. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení amplikonové DNA. Požadovaný počet cyklů je předem naprogramován v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Amplifikace probíhá pouze ve dvou oblastech genomu HIV-1 mezi primery; celý genom HIV-1 amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje destrukci vláken DNA obsahujících deoxyuridin³⁴, ale přitom vynechává DNA obsahující deoxythymidin.

Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribózoového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklickém kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55 °C, tzn. v průběhu kroků tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový amplikon vzniklý během amplifikace.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

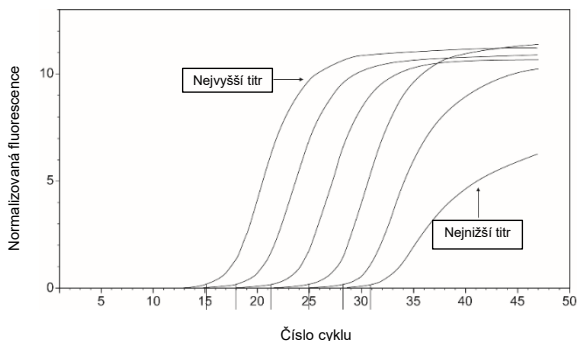
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 využívá technologii PCR běžící v reálném čase^{35,36}. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. Sonden se skládají z HIV-1 a HIV-1 QS-specifických oligonukleotidových sond s oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 jsou sondy HIV-1 a HIV-1 QS značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumícího barviva kvůli vlivu Försterova přenosu energie. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumící barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvýší. Amplifikace RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS je měřena nezávisle při různých vlnových délkách. Tento proces je opakován po předem určený počet cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS. PCR cyklus, při němž růstová křivka začíná exponenciální růst, souvisí s množstvím počátečního materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace v testu COBAS® TaqMan®

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 je svou podstatou kvantitativní ve velmi širokém dynamickém rozmezí, protože monitorování amplikonu je prováděno v exponenciální fázi amplifikace. Čím vyšší je titr HIV-1 ve vzorku, tím dříve překročí fluorescence oznamovacího barviva HIV-1 sond základní hladinu fluorescence (viz obrázek 1). Protože je množství RNA HIV-1 QS konstantní ve všech vzorcích, tak by se měla fluorescence oznamovacího barviva sondy HIV-1 QS objevit ve stejném cyklu u všech vzorků (viz obrázek 2). Ve vzorcích, v nichž je fluorescence QS postižena, je koncentrace upravena odpovídajícím způsobem. Objevení specifických fluorescenčních signálů je hlášeno jako kritická prahová hodnota (Ct). Ct je definována jako dílčí číslo cyklu, kdy fluorescence oznamovacího barviva překročí přednastavenou prahovou hodnotu (určenou fluorescenční hladinu) a začne exponenciální růstovou fází tohoto signálu (viz obrázek 3). Vyšší Ct hodnota značí nižší titr iniciálního HIV-1 cílového materiálu. Dvojnásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 1 Ct pro cílovou RNA HIV-1, zatímco desetinásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 3,3 Ct.

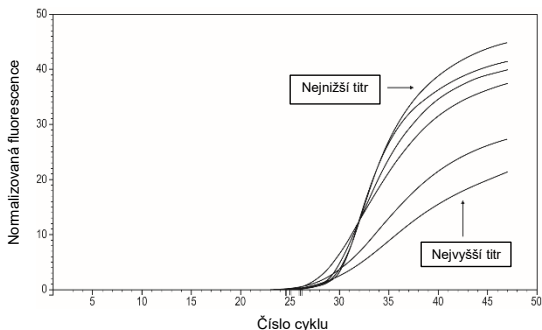
Na obrázku 1 jsou znázorněny cílové růstové křivky pro sérii ředění v rozsahu 5-log₁₀. Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

Obrázek 1
Cílové růstové křivky pro sérii ředění v rozsahu 5-log₁₀



Na obrázku 2 jsou znázorněny růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze série ředění viru zaujímající rozsah 5-log₁₀. Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je podobná bez ohledu na titr viru.

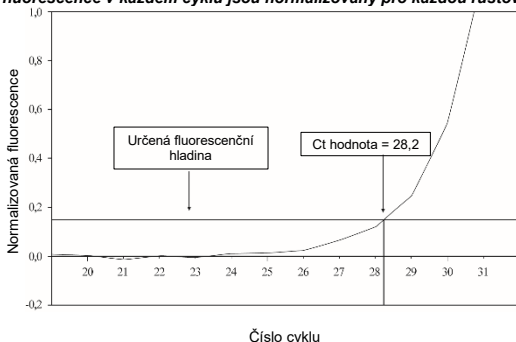
Obrázek 2
Růstové křivky kvantifikačního standardu pro sérii ředění viru v rozsahu 5-Log₁₀



Na obrázku 3 je znázorněn příklad, jak jsou hodnoty fluorescence v každém cyklu normalizovány pro každou růstovou křivku. Dílčí číslo cyklu (Ct) je vypočítáno kde fluorescenční signál překročí Určenou fluorescenční hladinu.

Obrázek 3

Hodnoty fluorescence v každém cyklu jsou normalizovány pro každou růstovou křivku



Stanovení množství RNA HIV-1

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 stanovuje množství RNA viru HIV-1 pomocí druhé cílové sekvence (kvantifikační standard HIV-1), který je do každého testovaného vzorku přidán o známé koncentraci. HIV-1 QS je neinfekční Armored RNA konstrukce, která obsahuje fragmenty HIV-1 sekvencí s vazebnými oblastmi pro primer identickými s cílovými sekvencemi *gag* HIV-1. HIV-1 QS obsahuje vazebné oblasti pro HIV-1 primer a generuje amplifikační produkt stejné délky a základního složení, jako cílová RNA HIV-1 *gag*. Vazebná oblast pro detekční sondu pro HIV-1 QS byla modifikována pro odlišení ampliconu HIV-1 QS od cílového *gag* ampliconu HIV-1.

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Hodnoty pro každý vzorek jsou poté korigovány na kolísání hodnot zařízení. Tyto hodnoty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Pre-Checks (kontroly) se používají pro stanovení, zda-li RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS data reprezentují sady, které jsou platné a příznaky jsou generovány v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech kontrol jsou odečty fluorescence zpracovány pro generování Ct hodnot pro RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS. Kalibrační konstanty specifické pro sérii poskytované spolu s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 je standardizován vůči referenčnímu materiálu Světové zdravotnické organizace pro RNA HIV-1. Výsledné titry jsou udávány v kopiích/ml (kopii/ml) nebo mezinárodních jednotkách/ml (IU/ml). Konverzní faktor mezi daným počtem RNA HIV-1 kopií/ml a HIV-1 IU/ml byl stanoven Roche Molecular Systems, Inc. na hodnotu 0,6 kopií/IU (1,67 IU/kopii).

ČINIDLA

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
(P/N: 05212294 190)

HI2CAP

48 testů

HIV-1 v2.0 CS1

(HIV-1 kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

Magnetické skleněné částice

93 % Isopropanol

1 x 48 testů

HIV-1 v2.0 CS2

(HIV-1 kazeta s lytickým činidlem)

Dihydrát citrátu sodného

42,5 % Guanidinthiokyanát

< 14 % Polydokanol

0,9 % Dithiothreitol

1 x 48 testů

HIV-1 v2.0 CS3

HIV-1 kazeta s více činidly obsahuje:

Pase

(Roztok proteinázy)

Tris pufr

< 0,05 % EDTA

Chlorid vápenatý

Octan vápenatý

≤ 7,8 % proteináza

Glycerol

1 x 3,8 ml

EB

(Eluční pufr)

Tris – báze pufr

0,2 % Methylparaben

1 x 7,0 ml

HIV-1 v2.0 CS4

HIV-1 Kazeta na činidla specifická pro test obsahuje:

HIV-1 QS

(HIV-1 kvantifikační standard)

Pufr Tris-HCl

EDTA

< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)

< 0,001% Armored HIV-1 RNA konstrukce obsahující HIV-1

vazebné sekvence primeru a unikátní vazebnou oblast

sondy (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)

0,05 % azid sodný

1 x 3,6 ml

HIV-1 MMX

(HIV-1 Master Mix)

Tricinový pufr

Octan draselný

Hydroxid draselný

20% dimethyl sulfoxid

Glycerol

< 0,04% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP

< 0,003% Upstream a downstream primery pro *gag* a LTR

oblast HIV-1

< 0,003 % oligonukleotidový aptamer

1 x 2,5 ml

< 0,003% fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy
specifické pro HIV-1 a kvantifikační standard HIV-1
< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)
< 0,1 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)
0,09 % azid sodný

CAP/CTM Mn²⁺

(CAP/CTM roztok manganu)

< 0,5 % octan manganatý
Ledová kyselina octová
0,09 % azid sodný

1 x 19,8 ml

HIV-1 H(+), v2.0

(HIV-1 Vysoce pozitivní kontrola, v2.0)

< 0,001% Armored HIV-1 RNA konstrukce obsahující
HIV-1 sekvenční (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)
Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na
protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV
p24 antigenu a HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV
a DNA HBV nedetekovatelné PCR metodami
0,1 % konzervantu ProClin® 300

4 x 1,0 ml

HIV-1 L(+), v2.0

(HIV-1 Nízce pozitivní kontrola, v2.0)

< 0,001% Armored HIV-1 RNA konstrukce obsahující
HIV-1 sekvenční (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)
Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na
protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24
antigenu a HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV a DNA HBV
nedetekovatelné PCR metodami
0,1 % konzervantu ProClin® 300

4 x 1,0 ml

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]

Negativní lidská plazma, nereagující podle testů na
protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2, HIV p24
antigenu a HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV a DNA HBV
nedetekovatelné PCR metodami
0,1 % konzervantu ProClin® 300

4 x 1,0 ml

Klip HIV-1 H(+), v2.0

(Klip s čárovým kódem pro vysoko pozitivní kontrolu HIV-1, v2.0)

1 x 4 klipů

Klip HIV-1 L(+), v2.0

(Klip s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu HIV-1, v2.0)

1 x 4 klipů

Klip HIV-1 (-) C

(Klip s čárovým kódem pro negativní kontrolu HIV-1, v2.0)

1 x 4 klipů

Promývací činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)

PG WR

1 x 5,1 l

PG WR

(Promývací činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)
Dihydrát citrátu sodného
< 0,1% N-metylizotiazolon HCl

SPEX

(cobas® pre-extrakční činidlo na vzorky)

- 42,5 % guanidinthiokyanát
- 0,79 % citrát sodný
- 0,01 % kyselina citronová
- 3,6 % Polydokanol
- 1,8 % Dithiothreitol

Pozn.: Toto činidlo je volitelné a mělo by se používat ve spojení s PSC k vytvoření vzorků ze suché kapky plazmy (dried plasma spot). Viz metodický list PSC ms_09411763190.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY IN VITRO.

B. Tento test je určen pro použití s lidskou plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla nebo ze suché kapky plazmy **PSC**.

C. Nepipetujte ústy.

D. V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.

E. **Při odebírání alikvotních podílů z kontrolních lahvíček dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo ribonukleázové kontaminaci.**

F. **Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a pipetovací špičky bez RNázy.**

G. Nesměšujte dohromady kontroly z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.

H. Nesmíchávejte kazety na činidla ani kontroly z různých souprav.

I. Neotevírejte kazety COBAS® AmpliPrep ani nevyměňujte, nemíchejte, neodstraňujte ani nepřidávejte láhve.

J. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.

K. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.

L. Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.

M. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ a v dokumentu CLSI č. M29-A3³⁹. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného v deionizované či destilované vodě.

Pozn.: Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

Pozn.: Pokud dojde k rozliti vzorků ze sušené kapky plazmy PSC v cobas® pře-extrakčním činidlo na vzorky (SPEX) (které obsahuje guanidin thiokyanát), nesmí přijít do kontaktu s dezinfekčními prostředky s obsahem chlornanu sodného, například bělidlem. Tato směs může vytvářet vysoce toxický plyn.

N. **POZOR: CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0 obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován a byl shledán nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a antigenu HIV p24. Testování negativní lidské plazmy metodami PCR neprokázalo žádné detekovatelné RNA HIV-1, RNA HCV ani DNA HBV. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaká infekční**

agens. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. **S CTM (-) C, HIV-1 L(+)+C, v2.0 a HIV-1 H(+)+C, v2.0** je třeba zacházet jako s infekčním materiálem a při práci s nimi je nutno uplatňovat bezpečné laboratorní postupy, například ty, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ a v dokumentu CLSI M29-A3³⁹. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného v deionizované či destilované vodě.

- O. **HIV-1 QS, CAP/CTM Mn²⁺ a HIV-1 MMX** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- P. Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozsypou, nafeďte je vodou a dosucha vytřete.
- Q. Dbejte na to, aby **HIV-1 v2.0 CS2, SPEX** (použitý při postupu **PSC** přípravy sušené kapky plazmy) a tekutý odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep, který obsahuje guanidin thiokyanát, nepřišel do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.
- R. **SPEX** je citlivý na světlo a zasílá se v lahvičkách zajišťujících ochranu před světlem.
- S. Při likvidaci jednotek pro zpracování vzorku (SPU – Sample Processing Unit) ze zařízení COBAS® AmpliPrep, které obsahují guanidin thiokyanát, zabraňte jakémukoli kontaktu s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.
- T. Viz metodický list **PSC** ms_09411763190, kde naleznete další varování a bezpečnostní opatření.

POŽADAVKY NA UCHOVÁVÁNÍ A MANIPULACI

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. Před použitím vizuálně zkontrolujte každou kazetu a lahvičku s činidly, zda nejeví žádné známky netěsnosti. Pokud známky netěsnosti vykazuje, nepoužívejte tento materiál k testování.
- C. Činidla **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 a HIV-1 v2.0 CS4** skladujte při teplotě 2–8 °C. Pokud jsou nepoužitá, jsou tato činidla stabilní až do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou při teplotě 2–8 °C stálá ještě 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší. **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 a HIV-1 v2.0 CS4** je možné použít maximálně ve 4 cyklech zařízení až do maximální kumulativní doby 64 hodin v zařízení COBAS® AmpliPrep. Činidla musí být mezi jednotlivými použitími uchovávána při teplotě 2–8 °C.
- D. Činidla **HIV-1 H(+)+C, v2.0, HIV-1 L(+)+C, v2.0 a CTM (-) C** uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Kontroly jsou stabilní až do vyznačeného data expirace. Po otevření je nutné nepotřebovanou část zlikvidovat.
- E. Klipy s čárovým kódem **[HIV-1 H(+)+C, v2.0 Clip, HIV-1 L(+)+C Clip, v2.0 a HIV-1 (-) C Clip]** skladujte při teplotě 2–30 °C.
- F. **PG WR** uchovávejte při teplotách 2–30 °C. **PG WR** je stálý až do vypršení vyznačené doby expirace. Po otevření je toto činidlo stabilní při teplotě 2–30 °C po dobu 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- G. **SPEX** uchovávejte (použito při postupu **PSC** suché kapky plazmy) při teplotě 2–8 °C. **SPEX** je stabilní až do vyznačeného data expirace. Po otevření je toto činidlo stabilní při teplotě 2–30 °C po dobu 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- H. Požadavky na uchovávání a manipulaci **PSC** jsou stanoveny v metodickém listu **PSC** ms_09411763190.

DODÁVANÝ MATERIÁL

- A. **Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**
(P/N: 05212294 190)

HI2CAP

HIV-1 v2.0 CS1

(kazeta s čínidly pro magnetické skleněné částice pro test HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS2

(kazeta s lytickým činidlem pro test HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS3

(kazeta s více čínidly pro test HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS4

(kazeta s čínidly specifickými pro test HIV-1)

HIV-1 H(+)C, v2.0

(vysoce pozitivní kontrola HIV-1, v2.0)

HIV-1 L(+)C, v2.0

(nízce pozitivní kontrola HIV-1, v2.0)

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® negativní kontrola (lidská plazma)]

HIV-1 H(+)C, v2.0 Clip

(klip s čárovým kódem pro vysoce pozitivní kontrolu HIV-1, v2.0)

HIV-1 L(+)C, v2.0 Clip

(klip s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu HIV-1, v2.0)

HIV-1 (-) C Clip

(klip s čárovým kódem pro negativní kontrolu HIV-1)

- B. **Promývací činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®**
(P/N: 03587797 190)

PG WR

- C. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
pře-extrakční činidlo na vzorky**
(P/N: 06989861190)

SPEX

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Zařízení COBAS® AmpliPrep
- Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48
- Volitelně: Zařízení **cobas p 630**
- Volitelně: Dokovací stanice
- Software AMPLILINK Software verze 3.3 nebo 3.4
- Řídící jednotka pro software AMPLILINK Software s tiskárnou
- Příručky k zařízení a softwaru:
 - příručka pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4
 - příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4
 - příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4
 - aplikační příručka softwaru AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátozem COBAS® TaqMan®, analyzátozem COBAS® TaqMan® 48, analyzátozem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p 630** nebo
 - provozní příručka pro software AMPLILINK Software verze 3.4
 - Volitelně: příručka obsluhy pro zařízení **cobas p 630** instrument se softwarem verze 2.2
- Definiční soubor testu (TDF). Viz karta informací o výrobku, dodaná se soupravou, kde naleznete název a aktuální verzi TDF.

Spotřební materiál

- Jednotky pro zpracování vzorku: SPU
- Vstupní zkumavky pro vzorek (S-zkumavky) s klípy s čárovým kódem
- Stojany s K-špičkami
- Krabice s K-zkumavkami v počtu 12 x 96

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL (POUZE PRO POUŽITÍ SE VZORKY EDTA PLAZMY), KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Stojan na vzorky (stojan SK24)
- Stojan na činidla
- Stojan SPU
- Zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek, s motorem
- Zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek
- K-nosič
- Přenašeč K-nosiče
- Stojan K-nosičů
- Pipetory s RNázy-prostými hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem (kapacita 1000µl)*
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Vlířivý mixér

* Pipetory musí být přesné na 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo s přímým vypuzováním bez RNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL (POUZE PRO POUŽITÍ VZORKŮ SUCHÉ KAPKY PLAZMY PSC), KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Separční karta na plazmu **cobas®** Plasma Separation Card (P/N 07963084190 nebo P/N 09411763190)*
- Sterilní nebo jednorázové pinzety nebo kleštičky**
- Kapilára 140 µl (např. plastová zkumavka Vitrex) s kompatibilním dávkovačem (např. držák na pipety Vitrex)*
- Jednorázový vpichovací prostředek (např. Greiner Bio-one: bezpečnostní lanceta MiniCollect® s penetrační hloubkou 2,00 mm)*
- Sáček na vzorky (průhledný plastový uzavíratelný sáček) a sáčky se silikagelovým vysoušedlem (celkem 4 gramy. Další informace o uchování a zasílání **PSC** naleznete v metodickém listu **PSC** ms_09411763190).
- Převravní sáček (např. Wicoseal 180 x 60 x 240 mm)
- Pipeta (např. pipeta Multistep®)
- Eppendorf Thermomixer® (např. model R 5355 nebo C či jejich ekvivalent) s termoblokem pro 24 krytů zkumavek

* Další informace o odběru vzorků **PSC** viz metodický list **PSC** ms_09411763190.

** Pro zabránění křížové kontaminace používejte u každého pacienta vždy pouze jedny kleštičky (pinzety)! Doporučuje se použít kovové kleštičky, které se po každém použití sterilizují v autoklávu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ EDTA PLAZMY

Pozn.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

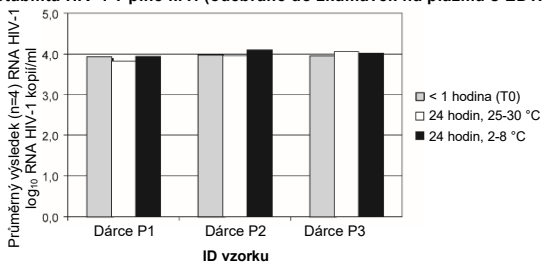
Pozn.: Tento test byl validován pouze pro použití s lidskou plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla nebo ze suché kapky plazmy PSC. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.

A. Odběr vzorků

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 je určen pro použití se vzorky plazmy. Krev se odebírá do sterilních zkumavek za použití EDTA jako antikoagulantu a musí být náležitě promíchána podle pokynů výrobce zkumavky.

Plnou krev uchovávejte při teplotě 2–25 °C maximálně 24 hodin. Plazmu z plné krve separujte do 24 hodin od odběru, a to odstředováním za pokojové teploty po dobu 20 minut při zrychlení 800–1600 x g. Plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky. Na obrázku 4 jsou uvedeny údaje o stabilitě vzorků ze studií o stabilitě vzorků provedené u testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

Obrázek 4
Stabilita HIV-1 v plné krvi (odebrané do zkumavek na plazmu s EDTA)



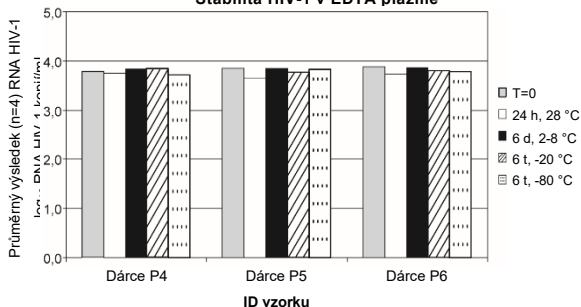
B. Přeprava vzorků

Při přepravě plné krve nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o dopravě etiologických agens⁴⁰. Plná krev se musí přepravovat za teplot 2–25 °C a musí se odstředit do 24 hodin od odběru. Plazma se může přepravovat při teplotě 2–8 °C nebo ve zmrazeném stavu při teplotách -20 °C až -80 °C.

C. Uchovávání vzorků

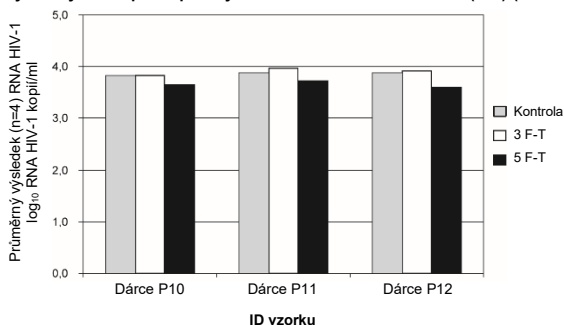
Vzorky plazmy mohou být skladovány při pokojové teplotě (25–30 °C) až po dobu 1 dne nebo při teplotě 2–8 °C až po dobu 6 dní. U zmrazených vzorků plazmy při teplotách -20 °C až -80 °C je prokázána stabilita po dobu šesti týdnů. Vzorky plazmy se doporučuje uchovávat v alikvotních podílech po 1100–1200 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.694.006). Na obrázku 5 jsou uvedeny údaje o stabilitě vzorků ze studie o uchovávání vzorků provedené u testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

Obrázek 5
Stabilita HIV-1 v EDTA plazmě



Vzorky plazmy mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně pětikrát bez významné ztráty RNA HIV-1. Na obrázku 6 jsou uvedeny údaje ze studie o zmrazení-rozmrazení provedené u testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

Obrázek 6
Výsledky HIV-1 po až pěti cyklech zmrazení a rozmrazení (F-T) (EDTA plazma)



ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ SUCHÉ KAPKY PLAZMY PSC

Pozn.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

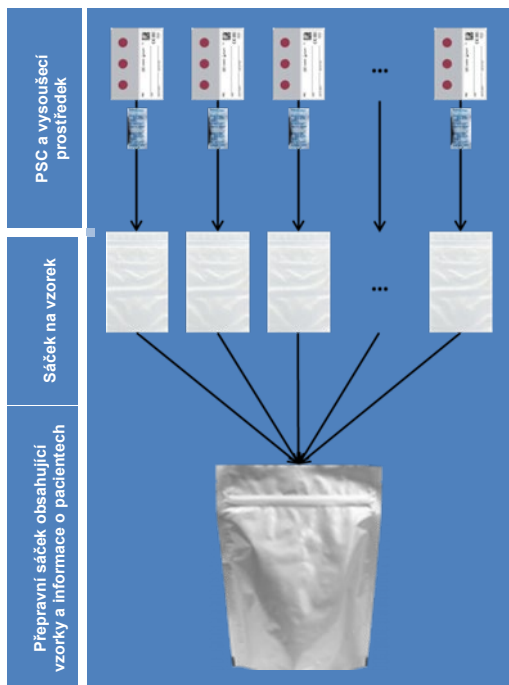
Pozn.: Tento test byl validován pouze pro použití s lidskou plazmou odebranou do EDTA antikoagulačního činidla nebo ze suché kapky plazmy PSC. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.

A. Odběr vzorků

Vzorky suché kapky plazmy **PSC** se odebírají dle náležitých klinických postupů. Před použitím je nutné zkontrolovat datum expirace **PSC**. Pokračujte pouze pokud nevypršelo datum expirace **PSC** a pokud je sáček s **PSC** utěsněný a dokonale uzavřený a neporušený. Na **PSC** uveďte jméno pacienta, datum narození, datum a čas odběru vzorku. Naneste 140 µl plné krve na každý kroužek membrány **PSC** vyznačený vrstvou pro umístění kapky s použitím vhodné kapiláry a dávkovače. Doporučuje se naplnit všechny tři body pro kapky na **PSC**, aby bylo možné provést opakované testy. Na jednu kartu **PSC** nenanášejte vzorky od více pacientů. Po 5 minutách se přesvědčte, že jsou OBE strany bodů **PSC** (přední: membrána s krví; zadní: kapka plazmy) nasyceny. Zkontrolujte zadní stranu přes průhlednou zadní vrstvu. Během tohoto postupu zabraňte kontaktu membrán s rukavicemi, nástroji nebo jakýmkoliv potenciálně kontaminovanými povrchy.

Ponechte **PSC** vyschnout při pokojové teplotě nejméně po dobu 4 hodin (maximálně přes noc); chraňte ji přitom před přímým slunečním světlem. Neodstraňujte vrstvu pro umístění kapky (skvrny). To se provádí v laboratoři. Po vysušení uchovávejte **PSC** v samostatném sáčku na vzorek se 4 gramy vysoušedla a sáček uzavřete (obrázek 7). Sáčky s odebranými vzorky musí být zabaleny v přepravním sáčku spolu s příslušným informačním listem pacienta. Doporučuje se do přepravního sáčku zabalit maximálně 25 karet **PSC**.

Obrázek 7
Přehled koncepce balení pro přepravu PSC



B. Přeprava vzorků

Pokud mají být vzorky přepravovány, musí být zabaleny a označeny dle platných státních anebo mezinárodních předpisů o přepravě vzorků a etiologických agens. Převravní sáčky obsahující karty **PSC** musí být zaslány během 28 dní při teplotě 18–45 °C a při hodnotě vlhkosti do 85%.

C. Uchovávání vzorků

Karty **PSC** v jednotlivých sáčcích na vzorky se 4 gramy vysoušecího prostředku, v převravním sáčku, se mohou po přepravě uchovávat při pokojové teplotě (18–30 °C), při teplotě 2–8 °C nebo při teplotě ≤ -10 °C až po dobu 56 dní (s oddělením vrstvy nebo bez oddělení vrstvy).

NÁVOD K POUŽITÍ

Pozn.: Podrobný návod k použití, podrobný popis možných konfigurací, tisku výsledků a interpretaci příznaků, poznámek a chybových hlášení naleznete v následujících dokumentech: (1) příručka k zařízení COBAS® AmpliPrep Instrument pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4; (2) příručka k analyzátoru COBAS® TaqMan® Analyzer pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4; (3) příručka k analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 Analyzer pro použití se softwarem AMPLILINK Software verze 3.3 a 3.4; (4) provozní příručka pro software AMPLILINK Software verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep Instrument, analyzátořem COBAS® TaqMan® Analyzer, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 Analyzer, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® Analyzer a zařízením cobas p 630 nebo provozní příručka pro software AMPLILINK Software verze 3.4; (5) volitelně: příručka k zařízením cobas p 630 instrument se softwarem verze 2.2.

Informace obsažené v částí A-C a F-J jsou obecné pro oba typy vzorků (EDTA plazma a vzorky suché kapky plazmy PSC). Část D obsahuje informace o objednání a plnění pouze vzorků EDTA plazmy. Část E obsahuje informace o objednání a plnění pouze vzorků suché kapky plazmy PSC.

Velkost dávky

Každá souprava obsahuje dostatek činidel pro 48 testů, které mohou být provedeny v dávkách po 12 až 24 testech. Alespoň jedna kontrola CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0 musí být zahrnuta do každé dávky (viz část „Kontrola kvality“).

Pracovní postup

Cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 musí být započat do 120 minut po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Pozn.: Nezmrazujte ani neskladujte zpracované vzorky a kontroly při teplotě 2–8 °C.

Příprava vzorku a kontroly

Pozn.: Používáte-li vzorky zmrazené, ponechte je při pokojové teplotě, dokud kompletně nerozmrznou a před použitím je nechte 3–5 sekund vířit. Kontroly musí být před použitím vyjmuty ze skladovacího prostoru s teplotou 2–8 °C a vyrovnány na okolní teplotu.

Nastavení zařízení COBAS® AmpliPrep

Část A. Údržba a plnění

- A1. Zařízení COBAS® AmpliPrep je připraveno k práci v pohotovostním režimu.
- A2. Zapněte řídicí jednotku pro software AMPLILINK Software (**ON**). Připravte řídicí jednotku dle následujícího návodu:
 1. Přihlaste se k operačnímu systému Microsoft Windows.
 2. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru AMPLILINK.
 3. Přihlaste se k softwaru AMPLILINK zadáním přiděleného uživatelského jména a hesla.
- A3. Zkontrolujte naplnění **PG WR** pomocí stavové obrazovky (**Status**) a v případě potřeby proveďte výměnu.
- A4. Proveďte veškerou údržbu, jak je uvedeno v záložce Due. Zařízení COBAS® AmpliPrep automaticky naplní systém.

Část B. Plnění kazet s činidly

Pozn.: Všechny kazety s činidly musí být vyjmuty ze skladovacího místa s teplotou 2–8 °C, okamžitě vloženy do zařízení COBAS® AmpliPrep a ponechány pro vyrovnání s okolní teplotou v zařízení po dobu minimálně 30 minut předtím, než bude zpracován první vzorek. Nenechejte kazety s činidly vyrovnat s teplotou mimo zařízení, protože by mohlo dojít ke kondenzaci na štítcích s čárovým kódem. Neotírejte kondenzát v případě, že se objeví na štítcích s čárovým kódem.

- B1. Vložte **HIV-1 v2.0 CS1** do stojanu na činidla. Vložte **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** a **HIV-1 v2.0 CS4** do samostatného stojanu na činidla.
- B2. Zaveďte stojan na činidla obsahující **HIV-1 v2.0 CS1** do pozice stojanu **A** zařízení COBAS® AmpliPrep.
- B3. Zaveďte stojan na činidla obsahující **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** a **HIV-1 v2.0 CS4** do pozice stojanu **B**, **C**, **D** nebo **E** zařízení COBAS® AmpliPrep. (Doplňující informace viz tabulka 1).

Část C. Plnění spotřebním materiálem

Pozn.: Stanovte počet kazet na činidla pro zařízení COBAS® AmpliPrep jednotek pro zpracování vzorků (SPU), vstupních zkumavek na vzorky (S-zkumavky), K-špiček a K-zkumavek, které budou potřeba. Jedna SPU, jedna vstupní S-zkumavka, jedna K-špička a jedna K-zkumavka jsou potřeba pro každý vzorek a kontrolu.

U zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátozem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 je možné použít více pracovních postupů. Pro bližší informace viz tabulka 1 uvedená níže. Podle použitého postupu práce zaveďte příslušný počet stojanů s kazetami na činidla, stojanů se vzorky se vstupními S-zkumavkami, stojanů SPU, stojanů s K-hroty, stojanů s K-zkumavkami a K-nosiči na stojanech pro K-nosiče do příslušných pozic stojanů zařízení COBAS® AmpliPrep (další informace viz Tabulka 1).

- C1. Umístěte SPU do stojanu(ů) SPU a zaveďte stojan(y) do pozice stojanu **J**, **K** nebo **L** zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C2. Podle použitého postupu práce zaveďte plný(é) stojan(y) K-zkumavek do polohy stojanu **M**, **N**, **O** nebo **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C3. Zaveďte plný(é) stojan(y) s K-hroty do polohy stojanu **M**, **N**, **O** nebo **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.
- C4. Pro postup práce 3 s využitím analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 zaveďte K-nosiče na stojanech K-nosičů do polohy stojanu **M** a **N** nebo **O** a **P** zařízení COBAS® AmpliPrep.

Tabulka 1
Možné postupy práce pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep
s analyzátořem COBAS® TaqMan® nebo analyzátořem COBAS® TaqMan® 48

Pracovní postup		Režim přenosu do analyzátořu COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48	Stojany, nosiče a spotřební materiál	Pozice na zařízení COBAS® AmpliPrep
1	Zařízení COBAS® AmpliPrep s dokovací stanicí a analyzátořem COBAS® TaqMan®	Automatický přesun K-nosiče	K-zkumavky v plných stojanech K-zkumavek	M – P
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M – P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F – H
			SPU ve stojanech na SPU	J – L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B – E
2	Zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan®	Manuální přesun K-zkumavek na stojanu(ech) na vzorky do analyzátořu COBAS® TaqMan®	K-zkumavky v plných stojanech K-zkumavek	M – P
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M – P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F – H
			SPU ve stojanech na SPU	J – L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B – E
			<u>Po dokončení zpracování vzorku:</u> K-zkumavky ve stojanech na vzorky (připravené k manuálnímu přesunu)	Stejně jako výše (F – H)
3	Zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem(y) COBAS® TaqMan® 48	Manuální přesun K-nosiče na stojanu(ech) pro K-nosiče do analyzátořu COBAS® TaqMan® 48	K-zkumavky na stojanech na vzorky	F – H
			K-špičky v plných stojanech na K-špičky	M – P
			Vstupní S-zkumavky obsahující vzorky a kontroly na stojanech na vzorky	F – H
			SPU ve stojanech na SPU	J – L
			CS1 ve stojanu na kazety	A
			CS2, CS3, CS4 ve stojanu na kazety	B – E
			Prázdný K-nosič označený čárovým kódem ve stojanu pro K-nosič	M – P
			<u>Po dokončení zpracování vzorku:</u> K-zkumavky v K-nosiči ve stojanu pro K-nosič	Stejně jako výše (M – P)

Část D. Objednávání a ukládání vzorků: Vzorky EDTA plazmy

- D1. Připravte stojany na vzorky dle následujícího postupu: Připevněte klipy s čárovým kódem ke každé pozici stojanu na vzorky, kam je ukládán vzorek (S-zkumavka). Připevněte jeden ze specifických klipů s čárovým kódem pro kontroly **[CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0]** ke každé pozici stojanu na vzorky, do které budou kontroly (S-zkumavky) uloženy. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo šarže kontroly, jako je číslo šarže na kontrolních lahvíčkách v soupravě. Dbejte na to, abyste přiřadili správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím klipem kontroly s čárovým kódem. Vložte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice obsahující klip s čárovým kódem.
- D2. Pomocí softwaru AMPLILINK vyberte definiční soubor testu (HI2CAP96 pro zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan®, HI2CAP48 pro zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan® 48), pro každý vzorek a kontrolu vytvořte příkaz (objednávku) v okně **Orders**, složce **Sample** a dokončete uložení.
- D3. Přiřaďte příkazy pro vzorek a kontrolu k pozici stojanu na vzorky v okně **Orders** ve složce **Sample Rack**. Číslo stojanu na vzorky musí být pro stojan připravený v kroku D1.
- D4. Vytiskněte zprávu **Sample Rack Order** pro použití jako pracovní tabulku.
- D5. Připravte stojany na vzorek a kontrolu na určeném místě pro přidávání vzorků a kontrol dle následujícího postupu: Vřívením promíchejte každý vzorek a kontrolu **[CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0]** po dobu 3 až 5 sekund. Při manipulaci se vzorky a kontrolami zabraňte kontaminaci rukavic.
- D6. Přeneste 1000 až 1050 µl každého vzorku a kontroly **[CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0]** do odpovídající vstupní S-zkumavky s čárovým kódem pomocí mikropipetoru s aerosolovou bariérou nebo hrotem bez RNázy s pozitivním posuvem. **Zabraňte přenosu částic a/nebo fibrinových sraženin z originálního vzorku do vstupní S-zkumavky.** Vzorky a kontroly musí být přenášeny do pozic na zkumavky, jak bylo určeno a zaznamenáno v pracovní tabulce v kroku D4. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo šarže kontroly, jako je číslo šarže na kontrolních lahvíčkách v soupravě. Přiřaďte správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím klipem s čárovým kódem kontroly. **Zabraňte kontaminaci horní části S-zkumavek vzorkem nebo kontrolami.** Jestliže používáte zařízení **cobas p 630** pro přípravu vzorků, přečtěte si příručku obsluhy pro zařízení **cobas p 630**.
- D7. Pro pracovní postupy 1 a 2 zaveďte stojan(y) na vzorky naplněné vstupními S-zkumavkami do pozic **F, G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- D8. Pro pracovní postup 3 pomocí analyzátořu COBAS® TaqMan® 48 zaveďte stojan(y) na vzorky se vstupními S-zkumavkami a K-zkumavkami (jedna pro každou vstupní S-zkumavku, zavedené v pozici vpravo vedle vstupních S-zkumavek) do pozice stojanu **F, G** nebo **H** zařízení COBAS® AmpliPrep.

Část E. Objednávání a vkládání vzorků: vzorky suché kapky plazmy PSC

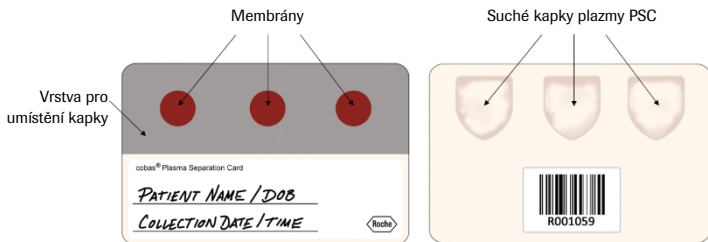
- E1. Před otevřením zkontrolujte přepravní sáček, zda je zcela neporušený. V případě, že je sáček dokonale uzavřený, pokračujte.

Otevřete přepravní sáček a u každého sáčku na vzorek pokračujte pouze pokud platí následující:

- Laboratorní žádanka je úplně vyplněna.
- Čárový kód laboratorní žádanky a PSC odpovídají.
- Sáček na vzorek je dokonale uzavřený a každý obsahuje PSC se 4 gramy vysoušedla.
- Je uvedeno datum odběru vzorku a odběr vzorku byl proveden v uplynulých 28 dnech, a před vypršením data expirace PSC.
- PSC nemá prošlé datum expirace.
- Suchá kapka plazmy PSC vypadá na přední straně homogenně a při pozorování ze zadní strany vypadá, že je úplně pokryta plazmou (viz Obrázek 8).

Obrázek 8

Suché kapky plazmy PSC ke zpracování (vlevo: přední strana. vpravo: zadní strana)



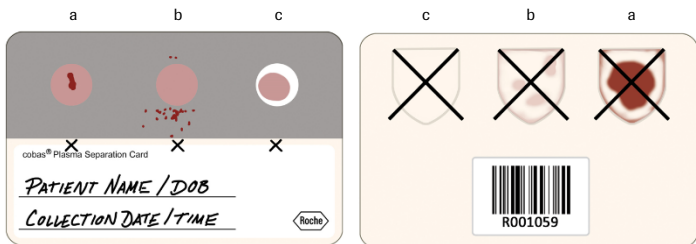
- E2. Suché kapky plazmy PSC by měly být označeny a zamítnuty, pokud platí následující:

- jsou viditelné stopy rozlité krve (obrázek 9b) a/nebo membrána není úplně pokryta krví (obrázek 9c) a proto kapka (skvrna) PSC obsahuje nehomogenní přední část a/nebo zadní strana není úplně pokryta plazmou (viditelné přes nosič).
- membrána je poškozena (obrázek 9a) a proto kapka PSC obsahuje nehomogenní přední část a zadní strana je tmavě červenohnědá (viditelné přes nosič).

Pozn.: Tři body jsou určeny pro možnost opakovaného testování. PSC může obsahovat špatný bod, ale musí stále obsahovat dobrý vzorek pro testování. Řádně označte špatné body (skvrny), aby byly rozpoznatelné. Neoznačujte je však na vrstvě pro umístění kapky. Vždy mezi sebou porovnejte všechny tři body, abyste vyhodnotili jejich kvalitu.

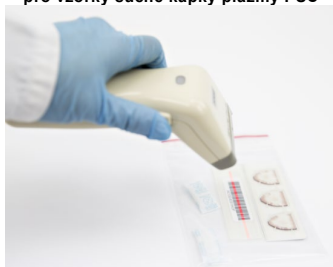
Obrázek 9

**Kritéria pro zamítnutí PSC (vlevo: přední strana; vpravo: zadní strana).
Body s rozlitou krví (b) nebo nepokrytá membrána (c), nebo viditelně poškozené membrány (a) nesmí být zpracovány. Pokud jsou body zamítnuty, měly být takto jasně označeny.**



- E3. Připravte stojany na vzorky dle následujícího postupu: Připevněte klipy s čárovým kódem ke každé pozici stojanu na vzorky, kam je ukládán vzorek (S-zkumavka). Připevněte jeden ze specifických klipů s čárovým kódem pro kontroly [CTM (-) C, HIV-1 L(+), v2.0 a HIV-1 H(+), v2.0] ke každé pozici stojanu na vzorky, do které budou kontroly (S-zkumavky) uloženy. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo šarže kontroly, jako je číslo šarže na kontrolních lahvíčkách v soupravě. Dbejte na to, abyste přiřadili správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím klipem kontroly s čárovým kódem. Vložte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice obsahující klip s čárovým kódem.
- E4. Pomocí softwaru AMPLILINK vyberte příslušný definiční soubor testu (HI2PSC96 pro zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan®, HI2PSC48 pro zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátořem COBAS® TaqMan® 48), pro každý vzorek a kontrolu vytvořte příkaz (objednávku) v okně **Orders**, složce **Sample** a dokončete uložení.
- E5. Přiřaďte příkazy pro vzorek a kontrolu k pozici stojanu na vzorky v okně **Orders** ve složce **Sample Rack**. Číslo stojanu na vzorky musí být pro stojan připravený v kroku E1. Čárový kód pacienta na zadní straně **PSC** může být nasnímán přes sáček na vzorek (Obrázek 10). Neotevírejte v tuto chvíli sáček na vzorek a postup dokončete uložení.

Obrázek 10
**Snímání čárového kódu vzorku pro vytvoření příkazu
pro vzorky suché kapky plazmy PSC**



- E6. Vytiskněte zprávu **Sample Rack Order** pro použití jako pracovní list a znovu ověřte, zda je použit náležitý soubor testu.
- E7. Proveďte kroky E7 až E11 v digestoři. Pro vybranou kartu **PSC** otevřete sáček a odstraňte vrstvu pro umístění kapky (obrázek 11). Zlehka ohněte **PSC** a odstraňte jednu kapku suché plazmy pomocí sterilní pinzety či kleštiček tak, že ji zdvihněte nahoru. Ohněte kapku suché plazmy na kartě **PSC**, aby se usnadnilo vložení do zkumavky (obrázek 12).

Obrázek 11
Odstranění vrstvy pro umístění kapky



Obrázek 12
Odstranění a ohnutí bodu se suchou plazmou z PSC

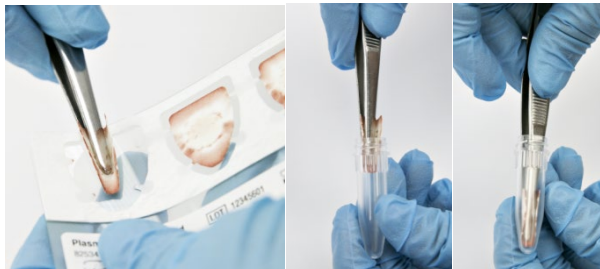


Pozn.: Používejte vždy pouze jedny kleštičky (pinzetu) pro jednoho pacienta.

- E8. Přeneste jednu ohnutou kapku suché plazmy **PSC** do odpovídající vstupní S-zkumavky tak, aby se nejnižší část kapky suché kapky plazmy **PSC** dotýkala dna zkumavky a také stěny zkumavky, aby se předešlo chybám pipetování (obrázek 13 a obrázek 14).

Pozn.: Body (kapky) suché plazmy mohou při skladování zkřehnout. Viz požadavky na uchovávání pro PSC. Při vkládání do zkumavky s nimi zacházejte opatrně.

Obrázek 13
Přenesení kapky suché plazmy PSC do zkumavky



Obrázek 16

1100 µl činidla SPEX přidáno je každému vzorku sušené kapky plazmy PSC



Pozn.: Zabraňte kontaminaci horní části vstupních S-zkumavek se vzorky a ujistěte se, že jsou zkumavky správně uzavřeny, aby se zabránilo vypařování.

- E12. Přeneste vstupní S-zkumavky do zařízení termomixéru Eppendorf Thermomixer a inkubujte připravené vstupní S-zkumavky při teplotě 56 °C a 1000 ot/min při nepřetržitém třepání po dobu 10 minut, aby došlo k extrakci viru ze sušené plazmy (Obrázek 17).

Obrázek 17

Inkubace se provádí po dobu 10 minut.



Pozn.: Zahajte inkubaci bezprostředně po přidání SPEX.

- E13. Během doby inkubace připravte kontroly následovně.

Pozn.: Kontroly neinkubujte.

Umístěte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice (1 až 3) připraveného stojanu SK24 obsahujícího klip s čárovým kódem kontroly.

Důkladně promíchejte 1 zkumavku **CTM (-) C** po dobu 20 sekund na vortexu. Přeneste 1000 µl **CTM (-) C** do vstupní S-zkumavky 1 na stojanu SK24. Ihned opět uzavřete tuto S-zkumavku.

Důkladně promíchejte 1 zkumavku **HIV-1 L(+)C, v2.0** po dobu 20 sekund na vortexu. Přeneste 1000 µl **HIV-1 L(+)C, v2.0** do vstupní S-zkumavky 2 na stojanu SK24. Ihned opět uzavřete tuto S-zkumavku.

Důkladně promíchejte 1 zkumavku **HIV-1 H(+)C, v2.0** po dobu 20 sekund na vortexu. Přeneste 1000 µl **HIV-1 H(+)C, v2.0** do vstupní S-zkumavky 3 na stojanu SK24. Ihned opět uzavřete tuto S-zkumavku.

Tabulka 2
Provedení příkazů a plnění pro vzorky sušené kapky plazmy PSC

Vzorek	Pozice příkazu AMPLILINK	Pozice stojanu IsoRack Eppendorf	Pozice stojanu SK24
Vzorek	Vstupní S-zkumavka	Vstupní S-zkumavka	Vstupní S-zkumavka
CTM(-)C	1	Prázdná	1
HIV-1 L(+)C, v2.0	2	Prázdná	2
HIV-1 H(+)C, v2.0	3	Prázdná	3
Suchá kapka plazmy PSC + 1100 µl SPEX	4-24	4-24	4-24

E14. Po inkubaci přeneste vzorky ve správném pořadí do stojanu SK24 obsahujícího kontroly (krok E13) (další podrobnosti naleznete v tabulce 2).

Pozn.: Zkontrolujte, zda je pozice suché kapky plazmy PSC ve zkumavce stále správná (obrázek 14) a v případě potřeby ji upravte sterilní pipetovací špičkou. V případě, že jsou přítomny bubliny, bubliny odstraňte pomocí sterilní pipetovací špičky.

E15. Zaveďte stojan(y) na vzorky naplněné vstupními S-zkumavkami do pozic **F, G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.

Část F. Spuštění cyklu zařízení COBAS® AmpliPrep

F1. Spustíte zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí softwaru AMPLILINK.

Část G. Konec cyklu zařízení COBAS® AmpliPrep a přenos do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 (pouze pro pracovní postup 2 a 3 v Tabulka 1)

G1. Zkontrolujte příznaky a chybová hlášení.

G2. Vyjměte zpracované vzorky a kontroly ze zařízení COBAS® AmpliPrep na stojanech na vzorky (pro analyzátor COBAS® TaqMan® bez dokovací stanice) nebo na stojanech pro K-nosiče (pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48), v závislosti na postupu práce (další podrobnosti viz Část G).

G3. Odstraňte odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep.

Pozn.: Žádné zpracované vzorky a kontroly by neměly být vystaveny světlu po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Amplifikace a detekce

Nastavení analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

Cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 musí být započat do 120 minut po dokončení přípravy vzorku a kontroly.

Pozn.: Nezmrazujte ani neskladujte zpracované vzorky a kontroly při teplotě 2–8 °C.

Část H. Zavedení zpracovaných vzorků

- H1. V závislosti na zvoleném pracovním postupu proveďte odpovídající kroky pro přemístění K-zkumavek do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48:

Pracovní postup 1: Automatizovaný přesun K-nosiče přes dokovací stanici do analyzátoru COBAS® TaqMan®. Manuální zásah není nutný.

Pracovní postup 2: Manuální přenos K-zkumavek ve stojanu(ech) na vzorky do analyzátoru COBAS® TaqMan®.

Pracovní postup 3: Manuální přesun K-nosiče na stojanu(ech) K-nosiče do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48. Manuální přesun K-nosičů do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 za použití přemísťovače K-nosiče.

Část I. Spuštění cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

- I1. Spustěte analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jednou z možností uvedených níže v závislosti na použitém pracovním postupu:

Pracovní postup 1: Není nutný žádný zásah.

Pracovní postup 2: Automatický start analyzátoru COBAS® TaqMan® po vložení stojanu(ů) na vzorky.

Pracovní postup 3: Naplňte K-nosič prázdnými K-zkumavkami v případě, že je méně než 6 K-zkumavek v K-nosiči. Plnění je řízeno pomocí softwaru AMPLILINK. Otevřete kryt termocykleru, zaveďte K-nosič a uzavřete víko. Spustěte cyklus analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

Část J. Ukončení cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

- J1. Po dokončení cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vytiskněte výsledkový protokol. Proveďte kontrolu, abyste se ujistili, že byl použit náležitý definiční soubor testu a zkontrolujte příznaky nebo chybové zprávy ve zprávě s výsledky. Vzorky s příznaky a komentáři jsou interpretovány podle popisu v části „Výsledky“. Po odsouhlasení uložte data do archívu.
- J2. Vyjměte použité K-zkumavky z COBAS® TaqMan® nebo z analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

VÝSLEDKY

Analýzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje koncentrace RNA HIV-1 u vzorků a kontrol. **Koncentrace RNA HIV-1 je vyjádřena v kopiích (cp)/ml nebo mezinárodních jednotkách (IU)/ml v závislosti na použitém definičním souboru testu (TDF).** Konverzní faktor mezi kopiemi RNA HIV-1 kopií/ml a HIV-1 v IU/ml je 0,6 kopií/IU, s použitím 1. mezinárodní normy WHO pro technologie analýzy nukleových kyselin (NAT) pro RNA HIV-1 (NIBSC 97/656)³⁷. Tento konverzní faktor by stanoven pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a testu COBAS® TaqMan® HIV-1 pro použití na systému High Pure.

Software AMPLILINK:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS.
- Stanovuje koncentraci RNA HIV-1 založenou na Ct hodnotách pro RNA HIV-1 a RNA HIV-1 QS a kalibračních koeficientech specifických pro danou šarži, které jsou poskytnuty na čárových kódech kazet.
- Určuje, že vypočtená hodnota titru v kopiích/ml pro **HIV-1 L(+)**C, **v2.0** a **HIV-1 H(+)**C, **v2.0** spadá do vymezeného rozmezí.

Validace dávek – AMPLILINK verze 3.3 a 3.4

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK nebo výsledkový výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je dávka platná. Pro kontrolní objednávky je provedena kontrola, zda-li je hodnota kopií/ml nebo IU/ml pro danou kontrolu v rámci specifikovaného rozmezí. Je-li hodnota kopií/ml nebo IU/ml pro kontrolu mimo její rozsah, je vytvořen PŘÍZNAK, který ukazuje, že kontrola selhala.

Dávka je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [**HIV-1 L(+)**C, **v2.0**; **HIV-1 H(+)**C **v2.0** a **CTM (-)** C].

Dávka není platná, pokud se u HIV-1 kontrol objeví některý z následujících příznaků:

Negativní kontrola

Varovná značka	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo „platný“ výsledek, který nebyl negativní pro cílový HIV-1

HIV-1 Nízce pozitivní kontrola, v2.0

Varovná značka	Výsledek	Interpretace
LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

HIV-1 Vysoce pozitivní kontrola, v2.0

Varovná značka	Výsledek	Interpretace
HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

Pokud je dávka neplatná, musíte zopakovat celou dávku, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.

Interpretace výsledků

Pro platnou dávku zkontrolujte každý jednotlivý vzorek na přítomnost příznaků nebo komentářů ve výtisku výsledku. Výsledky se interpretují takto:

- Platná dávka může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků v závislosti na tom, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky a/nebo poznámky.

Výsledky vzorků se interpretují takto:

	Výsledek titru	Interpretace
	Target Not Detected	Ct hodnota pro HIV-1 je nad hranici testu nebo nebyla žádná Ct hodnota pro HIV-1 získána. Výsledky uvádějte jako „RNA HIV-1 nedetekována“.
Kopii/ml	< 2,00E+01 kopii/ml (plazma) < 738 kopii/ml (PSC)	Vypočtená hodnota kopii/ml je pod detekčním limitem analýzy. Výsledky uvádějte jako „RNA HIV-1 detekována, méně než 20 RNA HIV-1 kopii/ml“ pro plazmu a „RNA HIV-1 detekována, méně než 738 RNA HIV-1 kopii/ml“ pro PSC.
	≥ 2,00E+01 kopii/ml a ≤ 1,00E+07 kopii/ml (plazma) ≥ 738 kopii/ml a ≤ 1,00E+07 kopii/ml (PSC)	Vypočtené výsledky větší než nebo rovný hodnotě 20 kopii/ml a menší než nebo rovný 1,00E+07 kopii/ml jsou v lineárním rozmezí testu použitého s plazmou. Vypočtené výsledky větší než nebo rovný hodnotě 738 kopii/ml a menší než nebo rovný 1,00E+07 kopii/ml jsou v lineárním rozmezí testu použitého s PSC.
	> 1,00E+07 kopii/ml (Plazma aPSC)	Vypočtená hodnota kopii/ml je nad rozsahem analýzy. Označte výsledky jako „vyšší než 1,00E+07 RNA HIV-1 kopii/ml“. Jsou-li požadovány kvantitativní výsledky, musí být originální vzorek rozředěn HIV-1 negativní lidskou EDTA plazmou v poměru 1:100 a test zopakován. Vynásobte uváděný výsledek faktorem ředění.
Mezinárodní jednotky/ml	< 3,34E+01 IU/ml (plazma)	Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranicí testu. Výsledky uvádějte jako „RNA HIV-1 detekována, méně než 33,4 RNA HIV-1 IU/ml“.
	≥ 3,34E+01 IU/ml a ≤ 1,67E+07 IU/ml (plazma)	Vypočtené výsledky větší než nebo rovný hodnotě 33,4 IU/ml a menší než nebo rovný 1,67E+07 IU/ml jsou v lineárním rozmezí testu použitého s plazmou.
	> 1,67E+07 IU/ml (plazma)	Vypočtená hodnota IU/ml leží nad rozsahem testu. Výsledky uvádějte jako "greater than 1.67E+07 HIV-1 RNA IU/mL". Jsou-li požadovány kvantitativní výsledky, musí být originální vzorek rozředěn HIV-1 negativní lidskou EDTA plazmou v poměru 1:100 a test zopakován. Vynásobte uváděný výsledek faktorem ředění.

Pozn.: Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 1,00E +07 kopii/ml nebo 1,67E +07 IU/ml. Originální vzorek je nutné rozředit lidskou EDTA plazmou negativní na HIV-1 v ředění 1:100 a test by měl být zopakován. Vynásobte uváděný výsledek faktorem ředění.

Pozn.: Výsledek „Failed“. Interpretace: Během přípravy vzorků na zařízení COBAS® AmpliPrep nebyl vzorek správně zpracován.

Pozn.: Výsledek titru „Invalid“. Interpretace: Neplatný výsledek.

KONTROLA KVALITY

V každé dávce testu musí být zahrnuta jedna kontrola **CTM (–) C**, jedna **HIV-1 L(+)C, v2.0** a jedna **HIV-1 H(+)C, v2.0**. Dávka je platná v případě, že se neobjeví žádný příznak pro žádnou kontrolu [**HIV-1 L(+)C, v2.0; HIV-1 H(+)C v2.0 a CTM (–) C**].

Na výtisku výsledků zkontrolujte výskyt příznaků a poznámek pro ověření, zda je dávka platná.

Negativní kontrola

CTM (–) C musí dát výsledek „Target Not Detected“. Je-li **CTM (–) C** označena jako neplatná, pak je celá dávka neplatná. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CTM (–) C** trvale neplatná ve více dávkách, kontaktujte vašeho místního zástupce společnosti Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přířazený rozsah titru pro **HIV-1 L(+)C, v2.0** a **HIV-1 H(+)C, v2.0** je specifický pro každou šarži činidel a je uveden na čárovém kódu kazety s činidly pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Počet kopií/ml RNA HIV-1 pro **HIV-1 L(+)C, v2.0** a **HIV-1 H(+)C, v2.0** by měl spadat do daného předepsaného rozsahu titru. Jsou-li jedna nebo obě pozitivní kontroly označeny příznakem jako neplatné, je neplatná celá dávka. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže leží titr RNA HIV-1 u jedné nebo obou pozitivních kontrol soustavně mimo rozmezí u mnoha dávek, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je validován pouze pro používání s lidskou plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.
2. Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 nebyla hodnocena u vzorků obsahujících HIV-1 skupiny N ani u vzorků obsahujících HIV-2.
3. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
4. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mixu pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HIV-1 pozitivních kontrol a klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.
5. S tímto výrobkem mohou pracovat pouze pracovníci proškolení v technice PCR.
6. Tento produkt může být použit pouze spolu s zařízením COBAS® AmpliPrep a analyzátořem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.
7. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a/nebo sondami mohou vést k podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.
8. Detekce RNA HIV-1 závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku a status pacienta (např. věk, přítomnost symptomů a/nebo stádium infekce). Přestože klinická specifita testu je 99,3 % (95% CI = 98,2 % až 99,8 %), bylo zaznamenáno i několik falešně pozitivních výsledků s nízkou hladinou u HIV negativních jedinců.
9. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a kvantifikovali rozdíly mezi technologiemi.

INTERFERENČNÍ LÁTKY

Při zvýšených hladinách triglyceridů (až do 3500 mg/dl), bilirubinu (až do 28 mg/dl), albuminu (až do 8900 mg/dl), hemoglobinu (až do 900 mg/dl) a lidské DNA (až do 0,4 mg/dl) ve vzorcích a také při přítomnosti autoimunních onemocnění nebo příslušných markerů, jako je systémový lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritida (RA) a antinukleární protilátky (ANA) bylo zjištěno, že nedochází k interferenci s kvantifikací RNA HIV-1 ani dopadu na specifitu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP7-A2 s použitím jedné šarže činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Následující složky léků testované při trojnásobné úrovni maximální plazmatické hladiny (C_{max}) nevykazovaly interferenci s kvantifikací RNA HIV-1 nebo vliv na specifitu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0:

<u>Léky na HIV:</u>	
Inhibitory proteázy Atazanavir Darunavir Fosamprenavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavir mesylát Ritonavir Saquinavir Tipranavir	Nukleosidový analog, inhibitor reverzní transkriptázy Abacavir sulfát Didanosin, ddl Emtricitabin Lamivudin, 3TC Stavudin, 4dT Tenofovir DF Zidovudin
Inhibitor integrázy Raltegravir	Nenukleosidový analog, inhibitor reverzní transkriptázy Efavirenz Nevirapin
Inhibitor vstupu Maraviroc	Inhibitory fúze Enfuvirtid
<u>Léky na HBV a / nebo HCV:</u>	
Analogový nukleotid Adefovir dipivoxil	Analogový nukleosid Entekavir Telbivudin
Imunomodulátory Peginterferon α-2a Peginterferon α-2b Ribavirin	
<u>Látky pro léčbu herpetických virů:</u>	
Analogový nukleotid Acyklovir	Derivát nukleotidu Gancyklovir Valganciclovir HCl

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

Hlavní funkční charakteristiky pro vzorky EDTA plazmy

A. Mez detekce

Meze detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla stanovena testováním 2. mezinárodního standardu WHO pro RNA HIV-1, dle zákona NIBSC 97/650⁴², HIV-1 subtyp B, ředěného v HIV-1-negativní lidské EDTA plazmě. Mez detekce byla stanovena pro tři šarže činidel. Pro každou šarži byly analyzovány tři dilační série. Celkově bylo testováno 126 replikátů na hladinu koncentrace. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP17-A.

Koncentrace RNA HIV-1, kterou je možné detekovat s mírou pozitivitu větší než 95%, jak je určeno analýzou PROBIT, je 20 kopií/ml nebo 33 IU/ml. Výsledky jednotlivých šarží byly 17,7 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 13,7 – 26,9 kopií/ml) u šarže 1, 17,0 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 14,0 – 22,6 kopií/ml) u šarže 2, 14,2 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 11,2 – 22,1 kopií/ml) u šarže 3. Kombinované výsledky všech tří šarží činidel viz Tabulka 3. **Tento konverzní faktor mezi IU/ml a kopie/ml byl stanoven pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a testu COBAS® TaqMan® HIV-1 pro použití na systému High Pure.**

Tabulka 3
Mez detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Nominální vstup (RNA HIV-1 IU/ml)	Nominální vstup (RNA HIV-1 kopii/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivity
100	60	126	126	100 %
67	40	186	185	99 %
50	30	126	125	99 %
33	20	126	124	98 %
25	15	59	53	90 %
17	10	126	108	86 %
8	5	125	66	53 %
0	0	126	0	0 %
PROBIT 95% úspěšnost detekce		27,5 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 23,8–33,0 IU/ml) 16,5 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 14,3–19,8 kopií/ml)		

Kromě toho byla analyzována ředění supernatantů buněčné kultivace představující HIV-1 skupiny M subtypy A-H v HIV-1 negativní lidské EDTA plazmě s dvěma šaržemi činidel. U každého izolátu subtypu HIV-1 bylo testováno několik úrovní (jmenovité titry mezi 10 a 75 kopiemi/ml) ve 24 replikátech na každou šarži činidla. Přiřazení jmenovitých koncentrací materiálů zásobní buněčné kultury bylo provedeno stanovením průměrných titrů testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) a Abbott RealTime HIV-1. Úspěšnost detekce vykazala míru positivity vyšší než 95 % u všech subtypů při 20 kopiích/ml nebo nižší. Kombinované výsledky dvou šarží činidel jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4
Ověření meze detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Subtyp	Označení izolátu	Nejnižší úroveň koncentrace ≥ 95% úspěšnost detekce (kopii/ml)
A	92UG029	10
A	4237A/98	20
B	92TH026	20
B	8E5/LAV	20
C	92BR025	20
C	3777A/97	11
D	92UG021	20
D	92UG035	11
CRF01_AE	92TH022	12
CRF01_AE	92TH009	14
F	93BR020	20
G	ARP173/RU570	13
H	HIV V1557	16

B. Přesnost

Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla stanovena analýzou sériových ředění vzorku supernatantu buněčné kultury HIV-1 (HIV-1 subtyp B), v HIV-1 negativní lidské EDTA plazmě. Přiřazení titru vzorku supernatantu buněčné kultury (zásobní koncentrace) bylo provedeno metodou, která zajišťuje sledovatelnost dle 1. mezinárodní normy WHO pro RNA HIV-1, zákona NIBSC 97/656³⁶. Tři šarže činidel byly analyzovány a bylo provedeno 15 cyklů na šarži činidla, každý se skládal z 6 úrovní ředění a 3 replikátů na každou úroveň. Každý vzorek prošel celým postupem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Výsledky každé šarže činidla a tří šarží činidel viz Tabulka 5.

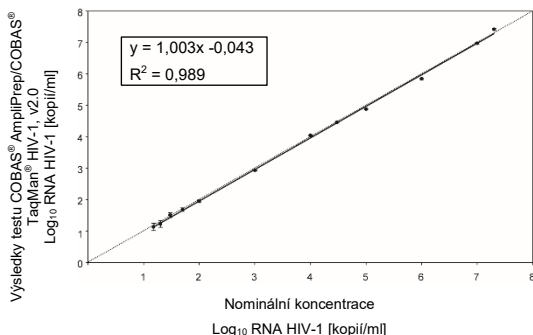
Tabulka 5
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Titř (kopie/ml)	Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3	Kombinace všech tří šarží	
	Celková směrodatná odchylka v Log	Celková směrodatná odchylka v Log	Celková směrodatná odchylka v Log	Celková směrodatná odchylka v Log	Celkové lognormální rozložení CV (%)
1,0E+02	0,19	0,16	0,17	0,17	41
1,0E+03	0,07	0,09	0,07	0,08	20
1,0E+04	0,07	0,07	0,06	0,07	16
1,0E+05	0,04	0,05	0,07	0,06	15
1,0E+06	0,10	0,09	0,10	0,10	25
1,0E+07	0,11	0,12	0,14	0,13	33

C. Lineární rozmezí

U testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 bylo zjištěno, že poskytuje lineární odezvu od 20 ($\log_{10} = 1,30$) RNA HIV-1 kopií/ml do $1,0E+07$ ($\log_{10} = 7,00$) RNA HIV-1 kopií/ml. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP6-A s použitím dvou šarží činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a sériových ředění vysokého titru vzorku supernatantu buněčné kultury RNA HIV-1 (+). Dvě šarže činidel byly analyzovány a bylo provedeno 15 cyklů na šarži činidla, každý se skládá z 12 úrovní ředění a 3 replikátů na každou úroveň. Výsledky pro jednu šarži činidla jsou uvedeny na obrázku 18.

Obrázek 18
Linearita pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



D. Inkluzivita HIV-1 skupiny M

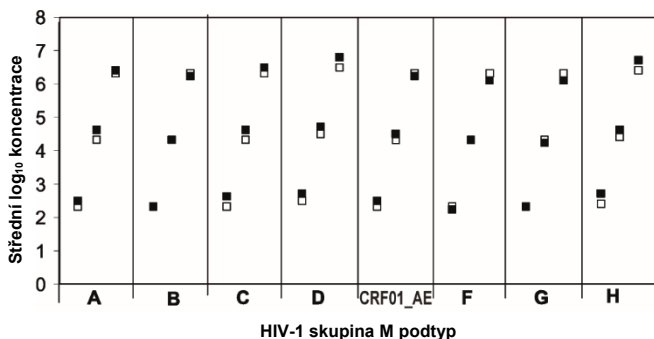
Osm kategorií subtypů bylo navrženo pro HIV-1 skupinu M na základě divergence nukleotidů. Tyto subtypy jsou označeny velkými písmeny abecedy od A do H⁴¹.

Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 u subtypů HIV-1 byla hodnocena analýzou zásobních buněčných kultur zástupců každého subtypu A až H HIV-1 skupiny M. Přidělení nominálních koncentrací roztoků se zásobní buněčnou kulturou bylo provedeno stanovením průměrných titrů testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) a testu Abbott RealTime HIV-1. Každý materiál zásobních buněčných kultur byl zředěn na jmenovité koncentrace přibližně $2,00E+02$, $2,00E+04$ a $2,00E+06$ kopií/ml v EDTA plazmě. Koncentrace byly poté testovány v 10 replikátech testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pomocí jedné šarže činidel. Střední titry $\log_{10}$ všech koncentrací a subtypů byly porovnány s příslušnými nominálními titry $\log_{10}$.

Vyhodnocení 8 izolátů subtypů HIV-1 testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vykazuje ekvivalentní výsledky pro všechny testované zástupce subtypů HIV-1 skupiny M (viz obrázek 19). Výsledky střední koncentrace $\log_{10}$ pro všechny subtypy byly v rozmezí $\pm 0,3 \log_{10}$ přiřazené vstupní koncentrace.

Obrázek 19
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

□ jmenovitá koncentrace ■ Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

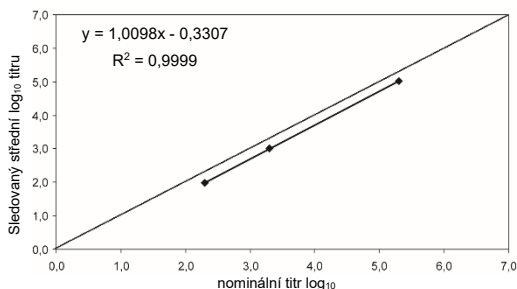


E. Detekce HIV-1 skupiny O

Ředění supernatantu buněčné struktury HIV-1 skupiny O (izolát MVP5180) v lidské EDTA plazmě byla analyzována pomocí dvou šarží činidla. Bylo testováno několik úrovní koncentrace (jmenovité titry mezi 10 a 75 kopiemi/ml) ve 24 replikátech na jednu šarži činidla. Přiřazení jmenovité koncentrace materiálu zásobních buněčných kultur bylo provedeno pomocí testu Abbott RealTime HIV-1. Úspěšnost detekce vykazovala míru pozitivitu vyšší než 95% při 20 kopiích/ml.

Materiál zásobních buněčných kultur HIV-1 skupiny O byl zředěn na jmenovité koncentrace přibližně 2,00E+02, 2,00E+03 a 2,00E+05 kopií/ml v EDTA plazmě. Koncentrace byly poté testovány v 10 replikátech testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pomocí jedné šarže činidel. Sřední titry log₁₀ všech koncentrací byly lineární a v rozmezí $\pm 0,3$ log₁₀ příslušného jmenovitého titru log₁₀ (viz Obrázek 20).

Obrázek 20
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
Subtyp linearit y O (MVP5180)



Kromě toho bylo testováno paralelně v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a Abbott RealTime HIV-1 10 buněčných kultur a jeden zředěný vzorek od pacienta (11613) představující HIV-1 skupiny O. Všechny 11 vzorků bylo u testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pozitivních (viz Tabulka 6). U obou testů byl střední titr log₁₀ u 11 vzorků v rozmezí 0,1 log₁₀.

Tabulka 6
Zjištění izolátů HIV-1 skupiny O pomocí testu
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Označení izolátu	Titř Log ₁₀ Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0	Titř Log ₁₀ Test Abbott RealTime HIV-1
BBI PRD 301, BV-5050	3,09	2,42
BBI PRD 301, BV-5051	2,86	3,35
BBI PRD 301, BV-5003	3,00	2,71
BBI PRD 301, BV-5024	2,87	2,69
MVP5180	2,78	3,25
HIV-1 CA-9	3,31	3,08
BCF01	5,71	5,61
BCF02	5,16	5,39
BCF07	4,27	4,81
BCF011	5,57	5,26
11613	2,97	2,05
Střední titř log₁₀	3,78	3,69

F. Specifická

Specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla stanovena s použitím dvou šarží činidel analýzou vzorků HIV-1 negativní EDTA plazmy od dárců krve. V testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byly u celkem 660 jednotlivých vzorků EDTA plazmy zjištěny platné výsledky a všechny byly negativní na RNA HIV-1. Na základě těchto výsledků je klinická specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 100% (jednostranná nižší mez spolehlivosti 95%: $\geq 99,6\%$).

G. Analytická specifická

Analytická specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla hodnocena přidáním kultivovaných organismů (virů, bakterií, kvasinek) nebo DNA (HTLV-2) se vstupní koncentrací $5E+04$ částic/ml do HIV-1 negativní lidské EDTA plazmy a do HIV-1 pozitivní lidské EDTA plazmy s $1,5E+02$ kopií/ml HIV-1 (viz Tabulka 7).

Žádný z testovaných organismů nevykázal křížovou reakci s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. U HIV-1 pozitivních vzorků byly stanoveny titry, které byly v rozmezí $\pm 0,5 \log_{10}$ od HIV-1 pozitivní kontroly.

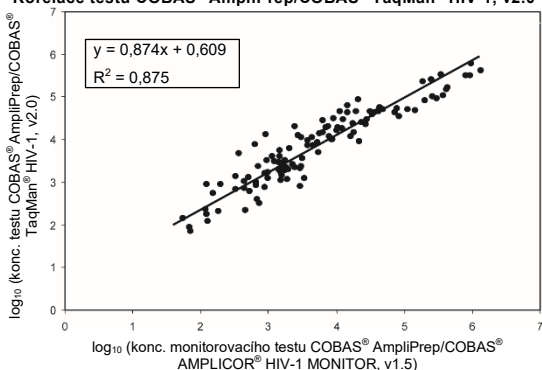
Tabulka 7
Analytická specifická vzorků

Virus	Baktérie
<i>Adenovirus typ 5</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Virus Epstein-Barrové</i>	
<i>Lidský herpes virus typ 6</i>	
<i>Herpes simplex virus typ 1</i>	
<i>Herpes simplex virus typ 2</i>	
<i>Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 1</i>	Kvasinky
<i>Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ 2</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chřipka typu A</i>	
<i>Virus hepatitidy A</i>	
<i>Virus hepatitidy B</i>	
<i>Virus hepatitidy C</i>	

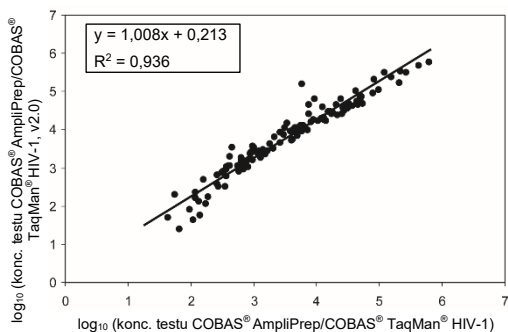
H. Metoda korelace

Účinnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla porovnávána s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 a testem Abbott RealTime HIV-1 analýzou 92 postupně odebíraných, nefeděných HIV-1 pozitivních klinických vzorků a analýzou 34 ředěných supernatantů buněčné kultivace. Vzorky obsahovaly subtypy HIV-1 A až H skupiny M a také cirkulující rekombinantní formy viru a byly analyzovány ve dvou externích pracovištích. Celkem 126 vzorků bylo rozprostřeno po dynamickém rozmezí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a bylo testováno ve čtyřech testech. Pouze platné páry titrů v obou lineárních rozmezích dvou porovnávaných testů byly zařazeny do Demingovy regresní analýzy (viz obrázek 21 až obrázek 23).

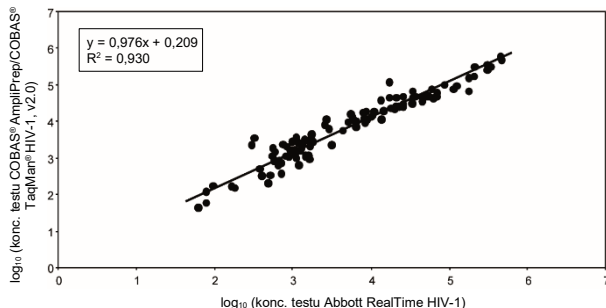
Obrázek 21
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



Obrázek 22
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



Obrázek 23
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



I. Selhání celého systému

Míra selhání celého systému dvou šarží testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2, byla zjištěna testováním 113 replikátů pro šarži 1 a 114 replikátů pro šarži 2 EDTA plazmy s přidáním cílovou sekvencí viru HIV-1 podtypu B skupiny M. Tyto vzorky byly testovány při přibližné koncentraci 3 x LoD. Z kombinovaných výsledků (šarže 1 a 2) této studie vyplynulo, že jeden replikát poskytl negativní výsledek byly na cílovou sekvenci HIV-1, což znamená výslednou míru selhání celého systému 0,4 %.

Hlavní funkční charakteristiky pro vzorky sušené kapky plazmy PSC

A. Mez detekce plazmy s použitím separační karty na plazmu

Mez detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** byla stanovena analýzou titrů plazmy přiřazených k sériovým ředěním supernatantu buněčné kultivace HIV-1 skupiny M, v HIV-negativní lidské plné krvi. Panely pěti hladin koncentrace plus negativní vzorek byly testovány na třech šaržích karet **PSC** a se třemi šaržemi činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 při větším počtu cyklů v různých dnech s různou obsluhou a přístroji. Část členů panelu s nejvyšším titrem byla centrifugována a plazmě byl přiřazen titr dle metody kalibračního označení (CBM) s použitím testu **cobas®** HIV-1 (na systémech **cobas®** 6800/8800) s použitím 3. mezinárodního standardu WHO HIV-1, HIV-1 skupiny M, subtyp B, pro přípravu vysokého a nízkého kalibrátoru.

Výsledky **PSC** uvádí Tabulka 8. Studie ukazuje, že test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** detekoval RNA HIV-1 při koncentraci 737,9 kopií/ml podle analýzy Probit s úspěšností detekce 95 %.

Tabulka 8
Mez detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Přirazená plazmová koncentrace HIV-1 skupiny M (kopii/ml)	Počet reaktivních	Počet platných replikátů	% reaktivních
1691,1	61	61	100 %
1098,1	51	51	100 %
2276,4	61	62	98,39 %
845,6	59	60	98,33 %
549,1	46	49	93,88 %
1138,2	59	60	98,33 %
563,7	54	60	90,00 %
366	49	53	92,45 %
758,8	56	61	91,80 %
281,9	46	62	74,19 %
183	36	49	73,47 %
379,4	50	62	80,65 %
140,9	38	63	60,32 %
91,5	22	54	40,74 %
189,7	37	63	58,73 %
0	0	63	0,00 %
0	0	54	0,00 %
0	0	59	0,00 %
PROBIT 95% úspěšnost detekce		737,9 kopii/ml (95% interval spolehlivosti: 614,3–938,5 kopii/ml) 1230 IU/ml (1023,8–1564,2 IU/ml)	

Odhad LOD v plné krvi:

Odpovídající titry v plné krvi stejného vzorku nelze přesně stanovit, protože plná krev není typem vzorku pro testování virové nálože. Titry plné krve založené na množství RNA HIV-1 přidané ke vzorkům plné krve nebyly použity pro odhad LoD, protože množství přidané RNA nemusí nutně odpovídat množství RNA v plazmě. Dokonce i po centrifugaci může RNA zůstat v mezibuněčné vrstvě (buffy coat) nebo může být spojena s buněčnou frakcí plné krve. Avšak vzhledem k tomu, že i u dalších technologií, například suché krevní kapky, se používaly přidané titry plné krve k odhadu meze detekce v plné krvi, odhad LoD plné krve v **PSC** lze poskytnout na základě empirického faktoru, u něhož se předpokládá souvislost s průměrným obsahem hematokritu (45 %) vzorků (Tabulka 9).

Hodnoty LOD plné krve jsou odhady na základě následujícího vztahu:

Odhad LOD plné krve = LOD plazmy **PSC** / 1,8

Tabulka 9
Odhad LoD plné krve

LOD podle analýzy PROBIT (95% úspěšnost detekce)	439,0 cp/ml
95% interval spolehlivosti	366,1–557,6 kopii/ml

B. Přesnost s použitím separační karty na plazmu

Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** byla stanovena analýzou sériových ředění vysoce pozitivního vzorku HIV-1 (pozitivní vzorek supernatantu buněčné kultury RNA HIV-1 s vysokým titrem) v HIV negativní plné krvi s EDTA. Bylo testováno pět úrovní ředění ve 48 replikátech pro každou úroveň a objem zpracování mezi dvěma šaržemi **PSC** a dvěma šaržemi činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 s použitím dvou systémů CAP/CTM a dvou pracovníků obsluhy v průběhu 12 dní. Každý vzorek prošel úplným pracovním postupem **PSC** a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Uvedené výsledky přesnosti zahrnují všechny aspekty testovacího postupu. Výsledky uvádí Tabulka 10.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** ukázal vysokou přesnost pro dvě šarže **PSC** a činidel testované při rozsahu koncentrací 7,38+02 kopii/ml až 1,00E+07 kopii/ml.

Tabulka 10
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
v kombinaci s PSC v rámci jedné laboratoře

Měřená koncentrace (kopii/ml)	Zdrojový materiál	Směr. odch. směsi
6,31E+06	Buněčná kultura	0,08
1,05E+06	Buněčná kultura	0,09
1,02E+05	Buněčná kultura	0,12
1,05E+04	Buněčná kultura	0,19
2,29E+03	Buněčná kultura	0,25

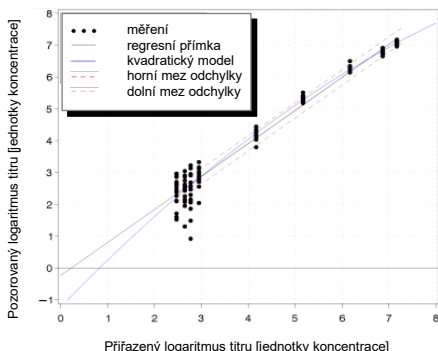
C. Lineární rozmezí s použitím separační karty na plazmu

Studie linearity testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** byla provedena se sériemi ředění zahrnujícími 9 členů panelu v celém lineárním rozmezí pro převládající HIV-1 skupiny M, subtyp B. Členy panelu byli připraveni z pozitivního vzorku supernatantu buněčné kultury s vysokým titrem RNA HIV-1. Vyhodnocení bylo provedeno podle pokynů CLSI číslo EP06-A²⁰. Dvě šarže **PSC** a dvě šarže činidel byly analyzovány na dvou systémech CAP/CTM, se třemi pracovníky obsluhy a celkem 20 replikáty na každou úroveň koncentrace.

Část jednoho člena panelu byla centrifugována a plazmá byl přiřazen titr dle metody kalibračního označení (CBM) s použitím testu **cobas®** HIV-1 (na systémech **cobas®** 6800/8800) s použitím 3. mezinárodního standardu WHO HIV-1, HIV-1 skupiny M, subtyp B, pro přípravu vysokého a nízkého kalibrátoru.

V kombinaci s **PSC** je test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 lineární od 7,38+02 kopii/ml do 1,00E+07 kopii/ml a vykazuje absolutní odchylku od lépe se hodící nelineární regrese nižší než $\pm 0,16 \log_{10}$ s **PSC** (viz Obrázek 24). V lineárním rozmezí testu byla přesnost testu $\pm 0,3 \log_{10}$.

Obrázek 24
Linearita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
v kombinaci s kartou na separaci plazmy



D. Verifikace subtypu s použitím separační karty na plazmu

Ačkoliv by subtyp HIV neměl ovlivnit parametry **PSC**, kultivované vzorky HIV-1 pro běžné subtypy HIV-1M (A, C a D) byly zředěny na jednu úroveň koncentrace v plné krvi. Stanovení přesnosti a správnosti bylo provedeno se 12 replikátů pro každý vzorek. Testování se provádělo s 1 šarží **PSC** a 1 šarží činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Každý vzorek plné krve byl centrifugován a plazmě byl přiřazen titr dle metody kalibračního označení (CBM) s použitím testu **cobas®** HIV-1 (na systémech **cobas®** 6800/8800) s použitím 3. mezinárodního standardu WHO HIV-1, HIV-1 skupiny M, subtyp B, pro přípravu vysokého a nízkého kalibrátoru.

Výsledky uvádí Tabulka 11. Tyto výsledky potvrzují, že test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** detekoval HIV pro HIV-1M (A, C a D).

Tabulka 11
Verifikace HIV-1 skupiny M subtypů A, C a D

Subtyp HIV-1 M	Počet platných replikátů	Správnost	Přesnost	Ekvivalence plazma vs. PSC-plazma
Subtyp A	12	-0,02	0,09	0,17
Subtyp C	12	0,13	0,16	0,06
Subtyp D	12	0,07	0,15	0,05

E. Specifická s použitím separační karty na plazmu

Specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** byla stanovena analýzou vzorků plné krve s EDTA negativních na HIV od jednotlivých dárců. 160 jednotlivých vzorků plné krve s EDTA bylo testováno se dvěma šaržemi **PSC** a dvěma šaržemi činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Jeden vzorek byl testován jako pozitivní a 159 negativních na RNA HIV-1. V panelu testů byla specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v kombinaci s **PSC** 99,4 % (95% interval spolehlivosti: $\geq 97,07$ %).

F. Míra selhání celého systému s použitím separační karty na plazmu

Míra selhání celého systému testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, v kombinaci s **PSC** byla zjištěna testováním 100 replikátů plné krve s EDTA s přidáním virem HIV-1 skupiny M, subtypu B. Tyto vzorky byly testovány při přibližné koncentraci 3 x LoD. Z výsledků této studie vyplynulo, že žádný replikát neposkytl negativní výsledek na cílovou sekvenci HIV-1, což znamená výslednou míru selhání celého systému 0 %.

ZHODNOCENÍ KLINICKÝCH VÝSLEDKŮ

Hlavní funkční charakteristiky pro vzorky EDTA plazmy

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla vyhodnocena v EDTA plazmě za použití dvou různých pracovních postupů (analýzátor COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® a analýzátor COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48). Studie byla provedena pomocí panelů sestavených z dobře charakterizovaného kultivovaného virového kmene HIV-1 skupiny M, subtyp B a EDTA plazmy negativní na protilátky RNA HIV-1 a HIV-1/2. Panel pokrýval dynamické rozmezí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i klíčová lékařská rozhodnutí pro daný účel použití podporovaná Pokyny „Department of Health and Human Services 2008“ pro použití antiretrovirových látek u dospělých a dospívajících infikovaných HIV-1¹³. Studie měla vyhodnotit hlavní proměnné, které přispívají k variaci celkové přesnosti včetně variace mezi šaržemi, pracovišti/přístroji, obsluhou, dnem/cyklem a variací v rámci cyklu. Další testy srovnávaly funkční charakteristiky a komparativní variabilitu přesnosti mezi dvěma pracovními postupy. Dva členové obsluhy v každém ze 3 pracovišť prováděli 5denní testování každé ze 3 šarží soupravy činidel za použití každého pracovního postupu. Každý cyklus se skládal ze soupravy kontrol (1 vysoce pozitivní, 1 nízkou pozitivní a 1 negativní) a ze sedmičlenného panelu testovaného v triplicátu (21 vzorků) na zařízení COBAS® AmpliPrep. Připravené vzorky a kontroly byly amplifikovány a detekovány na analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

Reprodukovatelnost byla vyhodnocena pomocí modelu náhodných jevů se členy pro (a) šarži, (b) pracoviště/přístroj, (c) obsluhu v rámci pracoviště/přístroje (d) den/cyklus v rámci šarže, pracoviště/přístroje a obsluhy; a (e) alikvotní podíly v rámci cyklu s použitím transformovaných výsledků PROC MIXED a log₁₀. Byla spočítána procenta variability způsobená každou složkou a koeficient variace log₁₀ koncentrace transformované RNA HIV-1. Byla zkoumána pouze data v rozmezí analýzy (2,00E+01 až 1,00E+07 kopií/ml).

Tabulka 12 obsahuje variace celkové přesnosti a celková směrodatná odchylka získaná na analyzátoru COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® a stanovená analýzou variance. Obecně složka v rámci cyklu přispěla v variabilitě více než jiné složky.

Tabulka 12

Přisouditelné procento celkové variace, celková směrodatná odchylka a lognormální rozložení CV koncentrace RNA HIV-1 ($\log_{10}$ kopií/ml) u testů v rozmezí analýzy

Koncentrace RNA HIV-1 ($\log_{10}$ kopií/ml)			Příspěvek k celkové variaci (%)					Celková přesnost
Očekávaná	Zjištěná (průměr)	Počet platných testů ¹	Šarže	Pracoviště/zařízení	Obsluha	Den/cyklus	SD v rámci cyklu	(lognormální %CV)
1,699	1,832	270	5 %	2 %	0 %	8 %	85 %	0,20 (48 %)
2,602	2,676	275	6 %	1 %	0 %	17 %	77 %	0,11 (25 %)
3,000	3,067	274	16 %	0 %	4 %	12 %	69 %	0,10 (24 %)
3,699	3,822	273	20 %	6 %	0 %	17 %	57 %	0,10 (23 %)
4,699	4,746	273	27 %	0 %	0 %	14 %	59 %	0,07 (17 %)
5,699	5,644	274	33 %	10 %	0 %	19 %	38 %	0,10 (23 %)
6,699	6,751	259	27 %	14 %	0 %	20 %	39 %	0,12 (27 %)

Pozn.: Výsledky v rámci rozmezí testu jsou od 20 kopií/ml až 1,00E+07 kopií/ml (1,30 $\log_{10}$ kopií/ml až 7,00 $\log_{10}$ kopií/ml) včetně.

¹ Počet testů v rámci rozmezí testu.

Výsledky získané pracovním postupem v systému COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 13). Obecně složka v rámci cyklu přispěla k variabilitě více než jiné složky s výjimkou člena panelu s nejvyšším titrem.

Tabulka 13

Přisouditelné procento celkové variace, celková směrodatná odchylka a lognormální rozložení CV koncentrace RNA HIV-1 ($\log_{10}$ kopií/ml) u testů v rozmezí analýzy

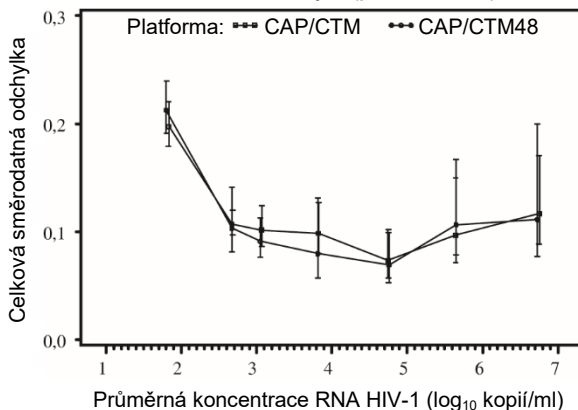
Koncentrace RNA HIV-1 ($\log_{10}$ kopií/ml)			Příspěvek k celkové variaci (%)					Celková přesnost
Očekávaná	Zjištěná (průměr)	Počet platných testů ¹	Šarže	Pracoviště/zařízení	Obsluha	Den/cyklus	SD v rámci cyklu	(lognormální %CV)
1,699	1,804	266	7 %	2 %	0 %	2 %	89 %	0,21 (52 %)
2,602	2,672	273	26 %	0 %	2 %	5 %	68 %	0,10 (24 %)
3,000	3,048	272	17 %	0 %	0 %	6 %	77 %	0,09 (21 %)
3,699	3,814	271	39 %	0 %	2 %	13 %	46 %	0,08 (19 %)
4,699	4,756	272	30 %	0 %	0 %	10 %	61 %	0,07 (16 %)
5,699	5,647	272	35 %	0 %	6 %	16 %	43 %	0,11 (25 %)
6,699	6,727	269	45 %	0 %	4 %	13 %	38 %	0,11 (26 %)

Pozn.: Výsledky v rámci rozmezí testu jsou od 20 kopií/ml až 1,00E+07 kopií/ml (1,30 $\log_{10}$ kopií/ml až 7,00 $\log_{10}$ kopií/ml) včetně.

¹ Počet testů v rámci rozmezí testu.

Výsledky na obr. 25 ukazují celkovou směrodatnou odchylku s odpovídajícími přibližnými 95% intervaly spolehlivosti vůči průměrným RNA HIV-1 koncentracím $\log_{10}$. Tyto výsledky ukazují srovnatelné vyhodnocení přesnosti mezi systémem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) a systémem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 (CAP/CTM48).

Obrázek 25
Celková směrodatná odchylka (přibližně 95% CI)



Pozn.: Přibližný 95% CI pro celkovou směrodatnou odchylku byl vypočítán jako druhá odmocnina mezi 95% CI variace celkové přesnosti.

Klinická citlivost, specifita a srovnání

Metodologie

Primárním cílem této studie bylo vyhodnotit klinickou specifitu a citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 u vzorků od HIV negativních a HIV-1 pozitivních pacientů. V každém hodnocení byly testovány jak čerstvé (nikdy nezmrazené), tak i zmrazené vzorky EDTA plazmy. Sekundárními cíli této studie bylo srovnat výsledky a vyhodnotit výslednou procentní shodu pozitivních i negativních vzorků v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 s výsledky získanými pomocí testů schválených FDA, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 a testu COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5.

Klinická specifita byla vyhodnocena pomocí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 analýzou 148 čerstvých (nikdy nezmrazených) vzorků a 418 zmrazených vzorků od dárců krve, kteří měli negativní protilátky na HIV-1/2. Klinická citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla vyhodnocena analýzou 117 čerstvých vzorků a 301 zmrazených vzorků v EDTA plazmě odebraných od pacientů infikovaných HIV-1 (zmrazené vzorky byly náhodně distribuovány mezi testovací pracoviště podle kategorie počtu buněk CD4). Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byly srovnány s výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 a testu COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5. Testování probíhalo na 3 testovacích pracovištích, kdy na každém pracovišti byl jeden systém COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. Byly použity tři šarže činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Statistické metody

Pomocí testů COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 a COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 byly testovány čerstvé i zmrazené vzorky od HIV negativních a HIV-1 pozitivních pacientů. HIV negativní pacienti byli vhodní pro vyhodnocení specifity pomocí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 s použitím statistické analýzy za předpokladu, že měli platné výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. HIV-1 pozitivní pacienti byli vhodní pro vyhodnocení citlivosti pomocí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 s použitím statistické analýzy za předpokladu, že měli platné výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a měli platné výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v lineárním rozmezí testu.

Klinická specifita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla vypočítána jako procento vyhodnotitelných HIV negativních pacientů s výsledkem „Target Not Detected“ (Cíl nebyl detekován) v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Byl poskytnut i související 95% přesný interval spolehlivosti (CI). Klinická citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla vypočítána jako procento vyhodnotitelných HIV-1 pozitivních pacientů s detekovatelnou virovou náloží HIV-1 v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Byl poskytnut i související 95% přesný interval spolehlivosti (CI). Metoda srovnání vyhodnotila výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 odděleně na obou srovnávaných platformách (test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 a test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5). Mezi testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a oběma srovnávanými platformami byly vypočítány procentní shody pozitivních a negativních vzorků. Spárované vzorky HIV-1 pozitivních pacientů přispívající k výsledkům v rámci lineárního rozmezí obou testů COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 byly srovnány pomocí bodového grafu a analyzovány pomocí Demingovy regrese.

Výsledky

Do analýzy klinické specifity a citlivosti bylo zařazeno celkem 566 vyhodnotitelných HIV negativních a 418 HIV-1 pozitivních vzorků pacientů. Asi 75 % vzorků bylo zmrazeno a 25 % vzorků bylo čerstvých. Shrnutí specifických podílů každé platformy je uvedeno v tabulce (Tabulka 14).

Tabulka 14
Vyhodnotitelní HIV-1 negativní a pozitivní pacienti podle typu vzorku

Typ vzorku	Všechny HIV negativní vzorky	Všechny HIV-1 pozitivní vzorky
Čerstvé	148 (26,1 %)	117 (28,0 %)
Zmrazené	418 (73,9 %)	301 (72,0 %)
Celkem	566	418

Demografické charakteristiky 418 vyhodnotitelných HIV-1 pozitivních vzorků jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 15). Počty buněk CD4 pacientů distribuované přibližně stejnoměrně do všech kategorií počtu buněk CD4 (< 200, 200-500, > 500 buněk/ μ l). Většina pacientů byli muži (74,2 %) ve věku 30 až 49 let (72,5 %). Distribuce dle etnické příslušnosti je srovnatelná s distribucí zjištěnou u HIV-1 populace ve Spojených státech³².

Tabulka 15
Demografická charakteristika vyhodnotitelných HIV-1 pozitivních pacientů

Demografická charakteristika	Kategorie	Všechny HIV-1 pozitivní subjekty
Souhrnně	Celkem	418
Počet buněk CD4 (buněk/μl)	< 200	130 (31,1 %)
	200 – 500	152 (36,4 %)
	> 500	136 (32,5 %)
Typ vzorku	Čerstvé	117 (28,0 %)
	Zmrazené	301 (72,0 %)
Pohlaví	Muž	310 (74,2 %)
	Žena	108 (25,8 %)
Věk (roky)	18-29	23 (5,5 %)
	30-39	100 (23,9 %)
	40-49	203 (48,6 %)
	50-59	74 (17,7 %)
	≥ 60	18 (4,3 %)
Etnická příslušnost	bělošská	129 (30,9 %)
	hispánská	46 (11,0 %)
	černošská	223 (53,3 %)
	asijská/tichomořská	3 (0,7 %)
	jiná	17 (4,1 %)
Užívající antiretrovirální léky	Ano	240 (57,4 %)
	Ne	178 (42,6 %)

Klinická specifita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (Tabulka 16) byla 99,3 % (562/566; 95% CI = 98,2 % až 99,8 %); 4 vzorky byly klasifikovány jako falešně pozitivní. Tři z těchto vzorků měly < 20 kopií/ml, což je pod spodním limitem kvantifikace (LLOQ) analýzy. Zbývající jeden vzorek z 566 testovaných byl v lineárním rozmezí, ale s velice nízkým titrem (28,8 kopií/ml). Klinická specifita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla podobná jak u čerstvých vzorků (99,3 % [147/148; 95% CI = 96,3 % až 100 %]), tak u zmrazených vzorků (99,3 % [415/418; 95% CI = 97,9 % až 99,9 %]).

Tabulka 16
Klinická specifická testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Skupina pacientů	Test CAP/CTM HIV-1, v2.0		Celkem N	Klinická specifická (95% přesný CI)
	Pozitivní	Negativní		
HIV-negativní	4 (0,7 %)	562 (99,3 %)	566	99,3 % (98,2 %, 99,8 %)

Klinická citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla definována jako procento vyhodnotitelných HIV-1 pozitivních pacientů s pozitivním výsledkem v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Shrnutí je uvedeno v tabulce (Tabulka 17). Klinická citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla 100 % (418/418; 95% CI = 99,1 % až 100 %). Žádní pacienti neměli v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 falešně negativní výsledky. Klinická citlivost byla testována v populaci HIV infikovaných pacientů, která odrážela stejnou populaci ve Spojených státech s ohledem na pohlaví, věk, etnickou příslušnost a expozici na antiretrovirální léčbu²⁹. Test prokázal 100% klinickou citlivost nezávislou na výše uvedených demografických charakteristikách, počtu buněk CD4 nebo typu vzorku (čerstvá nebo zmrazený).

Tabulka 17
Klinická citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Skupina pacientů	Test CAP/CTM HIV-1, v2.0		Celkem N	Klinická citlivost (95% přesný CI)
	Pozitivní	Negativní		
HIV-1 pozitivní	418 (100,0 %)	0 (0,0 %)	418	100,0 % (99,1 %, 100,0 %)

Srovnání klinických metod

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vs. test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Srovnání výsledků testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 u 950 pacientů vhodných pro analýzu je shrnuto v tabulce (Tabulka 18). Procentní shoda pozitivních vzorků testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 byla 99,5 % (427/429; 95% CI = 98,3 % až 99,9 %). Procentní shoda negativních vzorků testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 byla 98,1 % (511/521; 95% CI = 96,5 % až 99,1 %). Bylo 10 vzorků s pozitivními výsledky v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a s negativními výsledky v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Tři vzorky měly titr pod LLoQ testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, s největší pravděpodobností to odráží zvýšenou citlivost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Tři vzorky vykazaly v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 falešně pozitivní výsledky u HIV negativních pacientů identifikovaných při analýze klinické specifické, které byly opět pod LLoQ. Čtyři vzorky měly titr v rozmezí od 24,9 kopií/ml do 158 kopií/ml a s největší pravděpodobností odráží známou variabilitu spojenou s nízkotitrační kvantifikací.

Tabulka 18
Srovnání testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 , v2.0
vs. test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Test CAP/CTM HIV-1, v2.0	Test CAP/CTM HIV-1		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
Pozitivní	427	10	437
Negativní	2	511	513
Celkem	429	521	950
Procentní shoda pozitivních (95% přesný CI)	99,5 % (98,3 %, 99,9 %)		
Procentní shoda negativních (95% přesný CI)		98,1 % (96,5 %, 99,1 %)	

CI=interval spolehlivosti; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Pozn.: Do této shrnující tabulky byly zařazeni HIV negativní a HIV-1 pozitivní pacienti, jejichž vzorky byly součástí obou platných testů CAP/CTM HIV-1, v2.0 a CAP/CTM HIV-1.

Celkem 417 párovaných HIV-1 pozitivních vzorků mělo výsledky v lineárním rozmezí obou analýz a byly vyhodnotitelné srovnávací analýzou. V tabulce 19 je uveden průměrný rozdíl párovaných vzorků a 95% CI pro odchylku mezi testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vykazuje vyšší titry než test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, s výjimkou vyššího rozsahu ($> 5 \log_{10}$ kopií/ml) a nižšího rozsahu ($< 2 \log_{10}$ kopií/ml), kde vykazuje nižší titry (viz tabulka 19). Celková systematická odchylka se odhaduje na $0,2591 \log_{10}$ kopií/ml.

Tabulka 19
Průměrný rozdíl párovaných vzorků a 95% CI pro odchylku mezi testem
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
a testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Počet párových HIV-1 pozitivních vzorků v obou lineárních rozmezích dvou porovnávaných testů = 417		
Průměrný rozdíl ($\log_{10}$ kopií/ml)	Standardní chyba	95% CI
0,2591	0,0122	(0,235, 0,283)

CI=interval spolehlivosti; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Pozn.: Do této shrnující tabulky byly zařazeni HIV-1 pozitivní pacienti s výsledky v lineárním rozmezí, jejichž vzorky byly součástí obou platných testů CAP/CTM HIV-1 a CAP/CTM HIV-1, v2.0.

Výsledky Demingovy regresní analýzy mezi výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 pro spárované HIV-1 pozitivní vzorky v lineárním rozmezí obou analýz jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 20) a graficky jsou zobrazeny na obr. 26 (na tomto obrázku přerušovaná čára ukazuje dokonalou shodu mezi těmito dvěma testovacími metodami, tj. $y = x$).

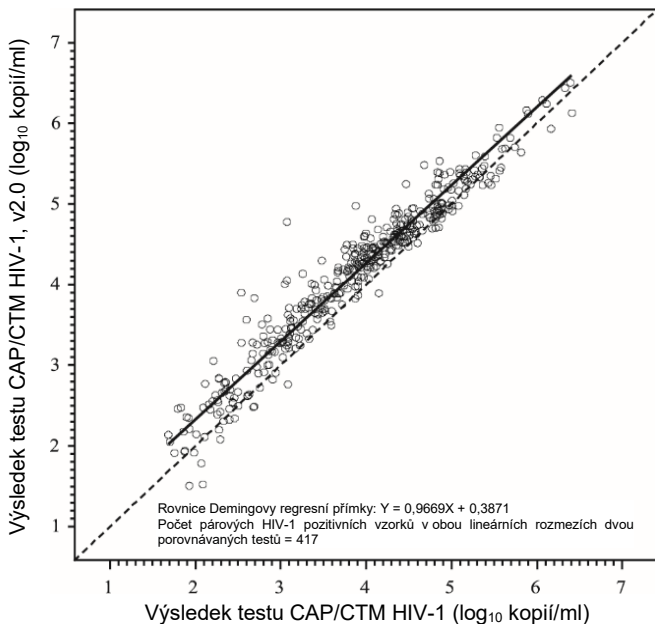
Tabulka 20
Odhad parametrů na základě Demingovy regrese mezi testem
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testem
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Počet párových HIV-1 pozitivních vzorků v obou lineárních rozmezích dvou porovnávaných testů = 417				
Parametr	Odhad parametru log ₁₀ kopií/ml	Standardní chyba	95% CI	r ²
Úsek	0,3871	0,0488	(0,291, 0,483)	0,9375
Křivka	0,9669	0,0122	(0,943, 0,991)	

CI=interval spolehlivosti; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Pozn.: Do této shrnující tabulky byly zařazeny HIV-1 pozitivní pacienti s výsledky v lineárním rozmezí, jejichž vzorky byly součástí obou platných testů CAP/CTM HIV-1 a CAP/CTM HIV-1, v2.0.

Obrázek 26
Demingova regrese mezi testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1,
v2.0 a testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1



Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vs. test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

Tabulka 21 srovnává výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu CA HIV-1 MONITOR, v1.5 u 991 pacientů vhodných pro analýzu. Procentní shoda pozitivních vzorků testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AMPLICOR® (CA) HIV-1 MONITOR, v1.5 byla 100% (419/419; 95% CI = 99,1 % až 100 %). Procentní shoda negativních vzorků testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 byla 97,4% (557/572; 95% CI = 95,7 % až 98,5 %). Z 15 pacientů s pozitivními výsledky v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a negativními výsledky v testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, byly 4 falešně pozitivní výsledky v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pocházející od HIV negativních pacientů identifikovaných v analýze klinické specifity, které byly opět pod LLoQ. Jedenáct vzorků bylo od HIV-1 pozitivních pacientů s výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 v rozmezí od nižšího než LLoQ až po 223 kopií/ml a negativními výsledky podle testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5.

Tabulka 21
Srovnání testu CAP/CTM HIV-1, v2.0 s testem COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

Test CAP/CTM HIV-1, v2.0	Test CA HIV-1 MONITOR, v1.5		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
Pozitivní	419	15	434
Negativní	0	557	557
Celkem	419	572	991
Procentní shoda pozitivních (95% přesný CI)	100,0 % (99,1 %, 100,0 %)		
Procentní shoda negativních (95% přesný CI)		97,4 % (95,7 %, 98,5 %)	

CI=interval spolehlivosti; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Pozn.: Do této shrnující tabulky byly zařazeni HIV negativní a HIV-1 pozitivní pacienti, jejichž vzorky byly součástí obou platných testů CAP/CTM HIV-1, v2.0 a CA HIV-1 MONITOR, v1.5.

Závěr

EDTA plazma

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vykazuje vysokou hladinu shody s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v kvantitativní analýze ($r^2 = 0,9375$) a v konkordančních analýzách (procento pozitivní shody = 99,5 %; procento negativní shody = 98,1 %). Test kvantifikuje klinické vzorky o 0,2591 log₁₀ kopií/ml celkově výše než test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, s nižší kvantifikací ve vyšším rozmezí (> 5 log₁₀ kopií/ml) a nižším rozmezí (< 2 log₁₀ kopií/ml).

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vykazuje rovněž vysokou hladinu shody s testem COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 v konkordančních analýzách (procento pozitivní shody = 100 %; procento negativní shody = 97,4 %).

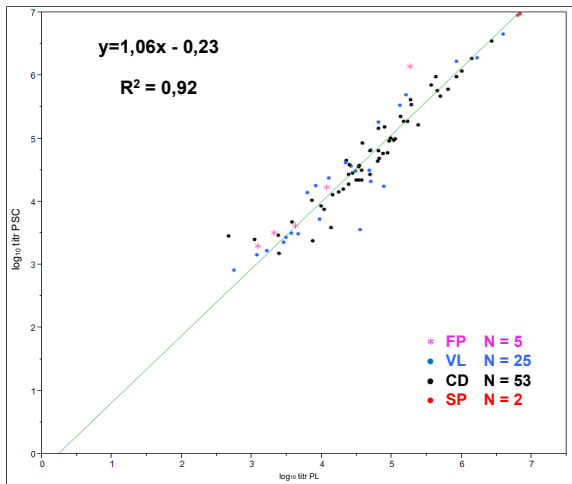
Tyto výsledky testování podporují použití testu pro daný účel použití při vyhodnocování progresu onemocnění a monitorování antiretrovirální léčby u pacientů infikovaných HIV-1.

Funkční charakteristiky vzorků suché kapky plazmy PSC v porovnání se vzorky EDTA plazmy

Funkční charakteristiky vzorků suché kapky plazmy **PSC** byly porovnány se vzorky centrifugované EDTA plazmy testováním 325 vzorků od pacientů infikovaných HIV-1 a 2 HIV negativních vzorků plné krve s přidávanými supernatanty buněčné kultivace. Bylo analyzováno 85 vzorků, které měly měřitelný titr u plazmy i **PSC**. Vzorky zahrnovaly vzorky HIV-1 M (FP= prospektivní odběr venepunkcí a z kapilární krve, VL= rutinní testování virové nálože, CD= počet buněk CD4+ ve zbývajících vzorcích, SP = vzorky s přidáním titrem) a byly testovány vždy s jedním replikátem (**PSC** a plazma) na externím pracovišti. Titry pod kvantifikačním rozmezím byly z analýzy vyloučeny. Regrese dle Deminga byla provedena s logaritmy titrů.

Výsledky regrese dle Deminga uvádí Obrázek 27. Symboly * a • (Obrázek 27) znázorňují jednotlivá stanovení.

Obrázek 27
Demingova regrese



Tabulka 22
Souhrn výsledků pro ekvivalenci matice

Ekvivalence matice (typ plazmy)	Počet vzorků s platným titrem	Analýza Bland-Altman		Demingova regresní přímka		
		Průměrný rozdíl $\log_{10}$	95% CI [dolní/horní]	Křivka	Úsek	R na druhou
PSC vs. kapalná plazma	85	0,05	[-0,01; 0,11]	1,06	-0,23	0,92

LITERATURA

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. 1983. Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.
3. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
4. Curran, J.W., Jaffe, H.W., Hardy, A.M., Morgan, W.M., Selik, R.M., Dondero, T.J. 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610-616.
5. Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995-999.
6. Tindall, B., and Cooper, D.A. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1-14.
7. Daar, E.S., Moudgil, T, Meyer. R.D., Ho, D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:961-964.
8. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:954-960.
9. Albert J., Abrahamsson B., Nagy K., Aurelius E., Gaines H., Nystrom G., Fenyo E.M. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107-112.
10. Horsburgh, C.R. Jr., Ou, C.Y., Jason, J., Holmberg, S.D., Longini, I.M. Jr., Schable, C., Mayer, K.H., Lifson, A.R., Schochetman, G., Ward, J.W, et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637-640.
11. Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-308. Erratum in: *Science* 1989 **245**, preceding 694.
12. Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Psallidopoulos, M.C., Baseler, M., Salzman, N.P., Fauci, A.S., Lane, H.C. 1990. Increasing viral burden in CD4⁺ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* **113**:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* **328**:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* **114**:678-693.
16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-489.

17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-122.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* **334**:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* **174**:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* **174**:704-712.
22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T., Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* **170**:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknanan, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* **43**:177-187.
27. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection – Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. 2016.
28. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354.
29. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
30. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.

31. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (8):2937-2945.
32. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.
33. Kwok, S., Sninsky, J.J. 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: *Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*. eds. Persing, D.H., Smith, T.F., Smith, F.C., et al. ASM, Washington, D.C.
34. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
35. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.
36. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
37. Holmes, H., Davis, C., Heath, A., Hewlett, I. and Lelie, N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *Journal of Virological Methods* **92**:141-150.
38. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
40. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
41. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, and Korber B: HIV-1 Nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. In: *Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Kuiken C, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1999, pp. 492-505.
42. Davis, C., Berry, N., Heath, A. and Holmes, H. 2008. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sanguinis* **95**: 218-225.

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 19.0 01/2022	Byly aktualizovány reference na metodický list PSC ms_09411763190, aby odrážely nové číslo M/N PSC karty. Byl aktualizován obrázek 8 a obrázek 9, aby odpovídal PSC ms_09411763190. Na první stranu byl přidán symbol „Rx Only“. Přidána část Technická podpora. Přidán výrok „Vyrobeno v“. Odstraněny adresy distributorů. Přidána adresa dovozce. Byl aktualizován oddíl Ochranné známky a patenty. Aktualizovaná stránka s harmonizovanými symboly. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.

Technická podpora

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



Roche Molecular Systems, Inc.
 1080 US Highway 202 South
 Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com

Vyrobeno v USA



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany

Ochranné známky a patenty

Tento produkt je chráněn jedním nebo více patenty US č. 8097717, 8192958 a 6727067 a jejich příslušnými zahraničními ekvivalenty.

COBAS, COBAS P, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLIPREP a TAQMAN jsou obchodní známky společnosti Roche.

Ochranná známka „Armored RNA[®]“ je vlastní společnost Asuragen, Inc. a Cenetron Diagnostics, Ltd.

ProC[®]lin je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

THERMOMIXER[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Eppendorf AG, Hamburg, Německo.

Všechny ostatní názvy produktů a ochranné známky jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

Technika prevence přenosu v enzymu AmpErase[®] je kryta patentem USA č. 7,687,247, který je vlastnictvím společnosti Life Technologies, a je licencována společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

Některé části tohoto výrobku jsou chráněny jedním nebo více patenty US a jejich zahraničními ekvivalenty, které vlastní Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. a jsou licencovány společnosti Roche Molecular Systems, Inc. a F. Hoffman-La Roche Ltd.

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

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

01/2022

(05328268001-19ENGL)
 05447933001-19

Doc Rev. 19.0



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Str. 116
 68305 Mannheim
 Germany



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

Age/DOB Věk nebo datum narození



Pomocný software

Assigned Range [copies/mL] Přřazené rozmezí (kopie/ml)

Assigned Range [IU/mL] Přřazené rozmezí (IU/ml)



Zplnomocnění zástupce pro evropské společenství



Datový list s čárovými kódy

LOT Číslo šarže



Biologická rizika



Katalogové číslo



Značka shody CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro značku shody CE pro diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*

Collect Date Datum odběru



Čtete návod k použití



Obsah vystačí pro <n> testů



Obsah soupravy



Kontrola



Datum výroby



Prostředek pro testování u lůžka pacienta



Prostředek pro samotestování



Prostředek není pro testování u lůžka pacienta



Prostředek není určen pro samotestování



Distributor (Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.)



Nepoužívejte opakovaně



Žena



Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD



Globální číslo obchodní položky



Dovozce



Zdravotnický prostředek pro *in vitro* diagnostiku



Dolní mez přřazeného rozmezí



Muž



Výrobce



Negativní kontrola



Nesterilní



Jméno pacienta



Číslo pacienta



Zde odlopnout



Pozitivní kontrola



Kopie QS na reakci PCR, použijte kopie QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.



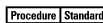
Kopie IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (IU) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.



Sériové číslo



Pracoviště



Standardní postup



Sterilizováno ethylenoxidem



Uchovávejte v temnu



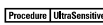
Omezení teploty



Definiční soubor testu



Neklopit



Ultracitlivý postup



Jedinečná identifikace prostředku



Horní mez přřazeného rozmezí



Hladina pro naplnění moči



Pouze pro USA: podle federálního zákona smí být tento přístroj prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.



Datum expirace