

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

cobas

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *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

ZASTOSOWANIE

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, wersja 2.0 (v2.0), jest testem *in vitro* opartym na amplifikacji kwasu nukleinowego, służącym do ilościowego oznaczania RNA ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1 (HIV-1) w ludzkim osoczu z EDTA lub w wysuszonych płamkach osocza na karcie do oddzielenia osocza (**PSC**) **cobas**®, wykorzystującym aparat COBAS® AmpliPrep do automatycznego przetwarzania próbki oraz analizator COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 do automatycznej amplifikacji i detekcji. Za pomocą testu można dokonywać oceny ilościowej RNA wirusa HIV-1 w zakresie stężenia 20–10 000 000 kp/ml (od 33 do $1,67 \times 10^7$ jednostek międzynarodowych [IU]/ml) w ludzkim osoczu z EDTA i 738–10 000 000 kp/ml (od 1230 do $1,67 \times 10^7$ jednostek międzynarodowych [IU]/ml) w wysuszonej płamce osocza (**PSC**). Jedna kopia RNA wirusa HIV-1 odpowiada 1,67 IU według międzynarodowego standardu nr 1 WHO dla RNA HIV-1, a także do monitorowania leczenia przeciwretrowirusowego poprzez pomiar zmian poziomu RNA HIV-1 w trakcie terapii.

Test ten, łącznie z objawami klinicznymi i innymi markerami laboratoryjnymi progresji choroby, znajduje zastosowanie w opiece klinicznej chorych zakażonych wirusem HIV-1 grupy M oraz HIV-1 grupy O. Test może służyć do oceny rokowania w oparciu o pomiar początkowego poziomu RNA HIV-1, a także do monitorowania leczenia przeciwretrowirusowego poprzez pomiar zmian poziomu RNA HIV-1 w trakcie terapii.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, nie jest przeznaczony do przesiewowego badania obecności wirusa HIV-1 we krwi lub produktach krwiopochodnych ani do stosowania jako test diagnostyczny, potwierdzający zakażenie wirusem HIV-1.

PODSUMOWANIE ORAZ OPIS TESTU

Ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV) jest czynnikiem etiologicznym zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS)¹⁻³. Zakażenie HIV może szerzyć się drogą płciową, przez kontakt z zakażoną krwią lub produktami krwiopochodnymi, oraz z zakażonej matki na jej płód⁴. Zwykle w ciągu trzech do sześciu tygodni od narażenia na HIV, u osób zakażonych pojawia się krótkotrwała, ostry zespół w postaci objawów grypopodobnych, związany z wysokimi poziomami wirerii we krwi obwodowej⁵⁻⁸. U większości zakażonych osób dochodzi następnie do rozwoju swoistej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko HIV oraz do spadku wirerii w osoczu, zwykle w ciągu czterech do sześciu tygodni od pojawienia się objawów^{9,10}. Po serokonwersji zakażone osoby wchodzi zazwyczaj w fazę o stabilnym przebiegu klinicznym, bezobjawową, która może trwać wiele lat¹¹⁻¹³. Okres bezobjawowy charakteryzuje się utrwaloną niewielką wirerią w osoczu¹⁴ oraz stopniowym zanikaniem limfocytów T CD4⁺, co prowadzi do ciężkiego niedoboru odporności, mnogich zakażeń oportunistycznych, nowotworów złośliwych i zgonu¹⁵. Pomimo że poziomy wirerii w fazie bezobjawowej zakażenia we krwi obwodowej są stosunkowo małe, replikacja wirusa i jego usuwanie wydają się być procesem dynamicznym, w którym duża produkcja wirusa i zakażanie komórek CD4⁺ jest równoważone przez odpowiednio nasilone usuwanie wirusa, śmierć zakażonych komórek i uzupełnianie komórek CD4⁺. Powoduje to, że poziomy wirerii i komórek CD4⁺ w osoczu są względnie stałe¹⁶⁻¹⁸.

Za pomocą pomiarów ilościowych wirerii HIV we krwi obwodowej wykazano, że większe poziomy wirusa mogą wiązać się ze zwiększonym ryzykiem progresji klinicznej choroby wywołanej przez HIV. Ponadto wykazano, że zmniejszenie poziomów wirusa w osoczu może wiązać się ze zmniejszonym ryzykiem progresji klinicznej¹⁹⁻²¹. Poziom wirusa we krwi obwodowej można oznaczać ilościowo za pomocą pomiaru antygenu p24 HIV w surowicy, ilościowej hodowli HIV z osocza lub przez bezpośredni pomiar wirusowego RNA w osoczu przy użyciu technologii amplifikacji kwasu nukleinowego albo amplifikacji sygnału²²⁻²⁶.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaleca też obecnie korzystanie z próbek w postaci wysuszonej plamki, aby zwiększyć możliwości badania wirerii w warunkach ograniczonej dostępności do zasobów takich jak punkt pobierania krwi na badania laboratoryjne lub sprawne transportowanie próbek osocza z EDTA²⁷. Wysuszone plamki osocza na karcie **PSC** pozwalają stabilizować RNA HIV w wysuszonym osoczu, umożliwiając poszerzenie zakresu wykonywania badań wirerii, dzięki możliwości transportowania próbek na większe odległości i w trudniejszych warunkach niż w przypadku osocza z EDTA.

Antygen p24 jest podstawowym białkiem rdzenia HIV, stwierdzanym w surowicy zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z przeciwciałem anti-p24. Wolny antygen p24 można oznaczać za pomocą komercyjnie dostępnych enzymatycznych testów immunologicznych (EIA, enzyme immunoassay), jednak przydatność antygenu p24 jako markera liczby kopii wirusa we krwi jest ograniczona, ponieważ jest on wykrywany jedynie u 20% chorych bezobjawowych i 40–50% chorych objawowych. Metody mające na celu rozdzielenie kompleksów antygen-przeciwciało poprawiają czułość testów wykrywających antygen p24, jednak cząsteczka wirusa pozostaje niewykrywalna u większości chorych bezobjawowych²².

HIV w osoczu można hodować inokulując nim pobudzone komórki jednokładowe krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) pochodzące od zdrowych dawców. Oznaczenie ilościowe uzyskuje się, inokulując PBMC za pomocą seryjnych rozcieńczeń próbki osocza. Hodowla ilościowa ma ograniczoną użyteczność w monitorowaniu poziomów wirusa u osób zakażonych, ponieważ jedynie niewielka frakcja cząstek wirusa jest zakaźna w warunkach *in vitro*. Zakaźny wirus jest często niewykrywalny u chorych bezobjawowych²².

RNA HIV można oznaczać ilościowo w osoczu przy użyciu technik amplifikacji kwasów nukleinowych, takich jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, Polymerase Chain Reaction)²⁸⁻³⁰. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wykorzystuje technologię reakcji PCR do osiągnięcia maksymalnej czułości i dynamicznego zakresu ilościowych oznaczeń RNA HIV-1 w osoczu z dodatkiem środka przeciwwirycznego EDTA lub w wysuszonej plamce osocza **PSC**.

ZASADY PROCEDURY

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jest testem amplifikacji kwasu nukleinowego, służącym do ilościowego oznaczania RNA ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1 (HIV-1) w ludzkim osoczu z EDTA lub w wysuszonej plamce osocza **PSC**. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jest oparty na trzech głównych procesach: (1) przygotowanie próbki w celu wyizolowania RNA HIV-1; (2) odwrotna transkrypcja docelowego RNA w celu wygenerowania komplementarnego DNA (cDNA), oraz (3) jednoczesna amplifikacja PCR docelowego cDNA i detekcja rozszczepionej podwójnie znakowanej sondy oligonukleotydowej swoistej dla łańcucha docelowego.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, umożliwia automatyczne przygotowanie próbki, a następnie automatyczną odwrotną transkrypcję, amplifikację PCR oraz detekcję docelowego RNA dla HIV-1 i Armored RNA dla standardu oznaczania HIV-1 Quantitation Standard (QS). Odczynnik Master Mix zawiera primery i sondy swoiste zarówno dla RNA HIV-1, jak i RNA HIV-1 QS. Odczynnik Master Mix został opracowany tak, aby zapewnić równoważną ocenę ilościową podtypów grupy M wirusa HIV-1 oraz grupy O HIV-1. Detekcję amplifikowanego DNA przeprowadza się za pomocą podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych swoistych dla DNA docelowego i standardu QS, które umożliwiają niezależną identyfikację amplikonu HIV-1 oraz amplikonu HIV-1 QS.

RNA wirusa HIV-1 oznacza się ilościowo za pomocą standardu ilościowego HIV-1 QS. Rekompensuje to wpływ hamowania oraz kontroluje proces przygotowywania i amplifikacji, pozwalając uzyskać dokładniejsze oznaczenie ilościowe RNA wirusa HIV-1 w każdej próbce. Standard oznaczania HIV-1 QS to niezakaźny konstrukt Armored RNA zawierający sekwencje HIV

o identycznych miejscach wiązania primerów jak docelowy RNA HIV-1 oraz charakterystyczne miejsce wiązania sondy, co umożliwia odróżnienie amplikonu HIV-1 QS od amplikonu HIV-1.

Standard HIV-1 QS jest dodawany do każdej próbki w znanej liczbie kopii i wraz z nią przechodzi przez kolejne procesy przygotowania, odwrotnej transkrypcji oraz jednoczesnej amplifikacji PCR i detekcji rozszczepionej podwójnie znakowanej sondy oligonukleotydowej. Analizator COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 oblicza stężenie RNA HIV-1 w badanych próbkach przez porównywanie sygnału HIV-1 z sygnałem HIV-1 QS w każdej próbce i kontroli.

Wybór sekwencji docelowej

Wybór docelowej sekwencji RNA dla HIV-1 jest uzależniony od identyfikacji regionów w obrębie genomu HIV-1, wykazujących największy konserwatyzm spośród różnych próbek podtypów grupy M wirusa HIV-1 oraz grupy O HIV-1. W związku z wysoką zmiennością genetyczną wirusa celem amplifikacji oraz detekcji za pomocą testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, są jednocześnie dwa regiony genomu HIV.

Dwie podwójnie znakowane sondy oligonukleotydowe swoiste dla sekwencji docelowej oraz jedna swoista dla standardu QS pozwalają na niezależną identyfikację amplikonów HIV-1 oraz QS HIV-1. Dlatego dobór właściwych primerów oraz podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych ma zasadnicze znaczenie dla zdolności testu do amplifikowania i wykrywania grupy podtypów M wirusa HIV-1 oraz grupy O HIV-1. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wykorzystuje odwrotną transkrypcję oraz primery do amplifikacji PCR sekwencji wysoko konserwatywnych regionów genu *gag*³³ wirusa HIV-1 i regionu LTR wirusa HIV-1.

Przygotowanie próbki

W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, zastosowano automatyczne przygotowywanie próbek w aparacie COBAS® AmpliPrep przy użyciu techniki wiązania kwasów nukleinowych na krzemionce. W procedurze używane jest osocze w objętości 850 µl lub ekstrakt z **PSC** z wykorzystaniem odczynnika SPEX. Części wirusa HIV-1 są poddawane lizie poprzez inkubację w podwyższonej temperaturze z proteazą i chaotropowym buforem do lizy/wiązającym, który uwalnia kwasy nukleinowe i chroni uwolniony RNA HIV-1 przed znajdującymi się w osoczu cząsteczkami RNazy. Do każdej próbki wraz z odczynnikami lizującymi i cząsteczkami szkla magnetycznego wprowadzana jest proteaza oraz znana liczba cząsteczek Armored RNA HIV-1 QS. Mieszanina poddawana jest następnie inkubacji, a RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS ulegają wiązaniu na powierzchni cząsteczek szkla magnetycznego. Substancje niezwiązane, takie jak sole, białka i inne zanieczyszczenia pochodzenia komórkowego, ulegają usunięciu przez przepłukiwanie szklanych cząsteczek magnetycznych. Po oddzieleniu szklanych cząstek magnetycznych i zakończeniu procesu przepłukiwania adsorbowane kwasy nukleinowe ulegają wymywaniu przy użyciu roztworu wodnego w podwyższonej temperaturze. Tak przygotowana próbka, zawierająca cząsteczki szkla magnetycznego oraz uwolnione RNA HIV-1 i RNA HIV-1 QS, jest dodawana do mieszaniny do amplifikacji i umieszczana w analizatorze COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48. Docelowy RNA HIV-1 i RNA HIV-1 QS są następnie poddawane odwrotnej transkrypcji, amplifikacji i jednoczesnej detekcji poprzez rozkład podwójnie znakowanej sondy oligonukleotydowej swoistej dla dwóch docelowych RNA oraz dla standardu QS.

Odwrotna transkrypcja oraz amplifikacja PCR

Reakcje odwrotnej transkrypcji i amplifikacji PCR przeprowadza się z użyciem termostabilnego, rekombinowanego enzymu polimerazy DNA Z05 *Thermus specie* (Z05). W obecności manganu (Mn^{2+}) i w odpowiednich warunkach układu buforowego Z05 wykazuje aktywność zarówno odwrotnej transkryptazy, jak i polimerazy DNA^{31,32}. Umożliwia to prowadzenie odwrotnej transkrypcji i amplifikacji PCR równocześnie z detekcją amplikonu w czasie rzeczywistym.

Poddane obróbce próbki dodaje się do mieszaniny amplifikacyjnej w próbkach do amplifikacji (próbki K), gdzie zachodzi zarówno odwrotna transkrypcja, jak i amplifikacja PCR. Mieszanina reakcyjna jest ogrzewana, aby umożliwić primerowi antysensownemu hybrydizację do docelowego RNA wirusa HIV-1 oraz do RNA standardu ilościowego HIV-1 QS. W obecności jonów Mn^{2+} i nadmiaru trifosforanów dezoksyrbonukleotydów (dNTP), do których należą trifosforany dezoksyadenozyny, dezoksyguanozyny, dezoksytydyny i dezoksytymidyny, polimeraza Z05 wydłuża primery zhybrydizowane z nicią RNA, tworząc nici DNA komplementarne do docelowego RNA.

Amplifikacja sekwencji docelowej

Przetworzone próbki dodaje się do mieszaniny amplifikacyjnej w próbkach do amplifikacji (probówka K), gdzie zachodzi amplifikacja PCR. Po zakończeniu odwrotnej transkrypcji docelowego RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS termocyklerek w analizatorze COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 podgrzewa mieszaninę reakcyjną, aby doprowadzić do denaturacji hybryd RNA:cDNA i odsłonięcia docelowych sekwencji swoistych dla primera. Podczas schładzania mieszaniny primery hybrydują do DNA docelowego. Z05, w obecności jonów Mn^{2+} i w nadmiarze trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów (dNTP), do których należą trójfosforany dezoksyadenozyny, dezoksyguanozyny, dezoksytydyny, dezoksyuridy i dezoksytymidyny, wydłuża związane primery na docelowej matrycy, tworząc podwójne nici DNA nazywane amplikonami. Analizator COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 automatycznie powtarza powyższy proces przez określoną liczbę cykli. W każdym z nich dochodzi do podwojenia liczby amplikonów DNA. Wymagana liczba cykli jest wstępnie programowana w analizatorze COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48. Amplifikacja zachodzi wyłącznie w dwóch regionach genomu HIV-1, które znajdują się pomiędzy dwoma primerami; cały genom HIV-1 nie jest amplifikowany.

Amplifikacja wybiórcza

W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, amplifikację wybiórczą docelowego kwasu nukleinowego z próbki osiąga się dzięki zastosowaniu enzymu AmpErase (uracilo-N-glikozylaza) i trifosforanu dezoksyuridy (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje niszczenie nici DNA zawierających dezoksyuridynę³⁴, lecz nie DNA zawierającego dezoksytymidynę.

W DNA występującym w naturze nie ma dezoksyuridy, natomiast jest ona zawsze obecna w amplikonie wskutek zastosowania trójfosforanu dezoksyuridy jako jednego spośród trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów (dNTP) w odczynniku Master Mix. Dlatego dezoksyuridynę zawiera wyłącznie amplikon. Dezoksyuridyna warunkuje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Co więcej, pod wpływem działania enzymu AmpErase niszczeniu ulegają wszelkie nieswoiste produkty reakcji powstałe po wstępnej aktywacji odczynnika Master Mix przez jony manganu. Enzym AmpErase zawarty w odczynniku Master Mix katalizuje rozkład DNA zawierającego dezoksyuridynę w miejscu reszt dezoksyuridyńowych przez otwarcie łańcucha dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym łańcuch amplikonu DNA pęka w miejscu, gdzie znajduje się dezoksyuridyna, w ten sposób wykluczając dalszą amplifikację DNA. Gdy enzym AmpErase zostanie poddany działaniu temperatury powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, ulega inaktywacji i dlatego nie niszczy docelowego amplikonu utworzonego w trakcie amplifikacji.

Detekcja produktów reakcji PCR w teście COBAS® TaqMan®

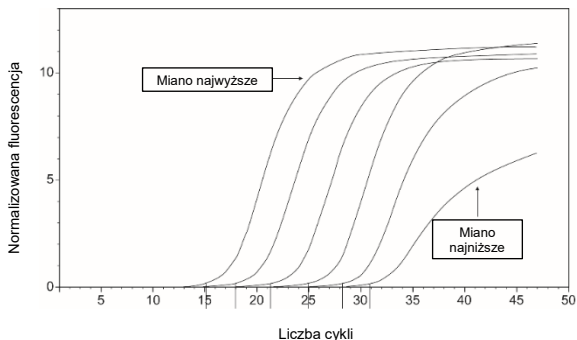
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wykorzystuje technologię reakcji PCR w czasie rzeczywistym^{35,36}. Zastosowanie sond podwójnie znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym pozwala na detekcję w czasie rzeczywistym gromadzenia się produktu reakcji PCR przez monitorowanie intensywności emisji fluorescencyjnych barwników reporterowych uwalnianych w trakcie procesu amplifikacji. Sondy składają się z oligonukleotydów swoistych dla HIV-1 i standardu ilościowego HIV-1 QS, znakowanych barwnikiem reporterowym i wygaszczem. W teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, sondy dla HIV-1 i wzorca HIV-1 QS są oznakowane różnymi fluorescencyjnymi barwnikami reporterowymi. Gdy sondy są nienaruszone, fluorescencja barwnika reporterowego jest tłumiona bliskością wygaszacza na zasadzie efektu przenoszenia energii Förstera. Podczas reakcji PCR sonda ulega hybrydyzacji z sekwencją docelową, a następnie rozszczepieniu pod wpływem posiadanej przez termostabilną polimerazę DNA Z05 aktywności 5' → 3' nukleazy. Od chwili uwolnienia i rozdzielenia reportera i wygaszacza nie zachodzi już zjawisko wygaszania, a aktywność fluorescencyjna barwnika reporterowego nasila się. Amplifikację RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS mierzy się niezależnie od siebie, wykorzystując różne długości fal. Proces ten powtarza się przez określoną liczbę cykli, a w każdym cyklu następuje efektywne zwiększenie intensywności emisji poszczególnych barwników reporterowych, umożliwiające niezależną identyfikację RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS. Cykl PCR, w którym krzywa wzrostu rozpoczyna wzrost wykładniczy, zależy od ilości materiału startowego na początku reakcji PCR.

Podstawy oceny ilościowej w teście COBAS® TaqMan®

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, zapewnia dokładność wyników ilościowych w bardzo szerokim przedziale dynamicznym, ponieważ monitorowanie amplikonu przeprowadza się w fazie wykładniczej amplifikacji. Im wyższe jest miano HIV-1 w badanych próbkach, tym wcześniej fluorescencja barwnika reporterowego sondy HIV-1 wzrasta powyżej wyjściowego poziomu fluorescencji (patrz rysunek 1). Ponieważ ilość RNA HIV-1/QS jest stała we wszystkich próbkach, fluorescencja barwnika reporterowego sondy HIV-1 QS powinna pojawiać się w każdej próbce w podobnym cyklu (patrz rysunek 2). W próbkach, w których fluorescencja standardu QS jest nieprawidłowa, stężenie jest poddawane odpowiedniej modyfikacji. Pojawienie się swoistych sygnałów fluorescencyjnych jest rejestrowane jako krytyczna wartość progowa (Ct). Wartość Ct definiuje się jako liczbę cykli, po której fluorescencja barwnika reporterowego przekracza ustaloną wcześniej wartość progową (ustalony poziom fluorescencji) i zapoczątkowuje fazę wykładniczego wzrostu siły sygnału (patrz rysunek 3). Większa wartość Ct wskazuje na niższe miano początkowe docelowego wirusa HIV-1. Dwukrotny wzrost miana koreluje ze zmniejszeniem wartości Ct do 0,3.

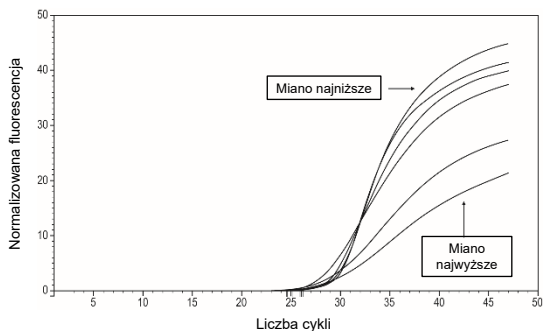
Rysunek 1 przedstawia krzywe wzrostu sekwencji docelowej w serii rozcieńczeń, obejmującej przedział 5-krotnej wartości $\log_{10}$. W miarę wzrostu stężenia wirusów krzywe wzrostu przesuwają się w kierunku wcześniejszych cykli. Zatem krzywa wzrostu leżąca najdalej na lewo odzwierciedla najwyższy poziom miana wirusa, a krzywa wzrostu leżąca najdalej na prawo oznacza najniższy poziom miana wirusa.

Rysunek 1
Krzywe wzrostu docelowego dla serii rozcieńczeń,
obejmującej przedział 5-krotnej wartości $\log_{10}$



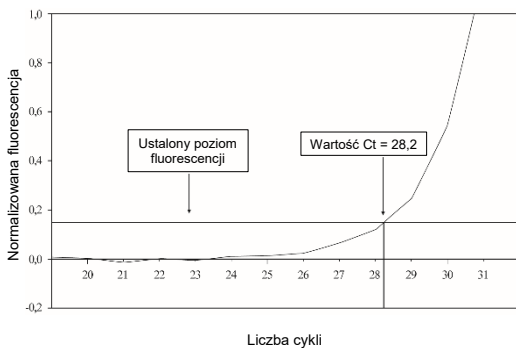
Rysunek 2 przedstawia krzywe wzrostu Quantitation Standard dla próbek z serią rozcieńczeń wirusa, obejmującą przedział 5-krotnej wartości $\log_{10}$. Ilość dodanego do każdej próbki preparatu Quantitation Standard jest stała dla każdej reakcji. Wartość Ct dla preparatu Quantitation Standard jest podobna, niezależnie od miana wirusa.

Rysunek 2
Krzywe wzrostu dla standardu ilościowego w serii rozcieńczeń wirusa obejmującej zakres 5-krotnej wartości $\log_{10}$



Rysunek 3 przedstawia na przykładzie, w jaki sposób wartości fluorescencji w każdym cyklu są normalizowane dla każdej krzywej wzrostu. Liczbę cykli cząstkowych (C_t) oblicza się w chwili, gdy sygnał fluorescencyjny przekracza ustalony poziom fluorescencji.

Rysunek 3
Wartości fluorescencji w każdym cyklu są normalizowane dla każdej krzywej wzrostu



Oznaczanie ilościowe RNA wirusa HIV-1

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, ilościowo oznacza RNA wirusa HIV-1, wykorzystując drugą sekwencję docelową (HIV-1 Quantitation Standard), którą w znanym stężeniu dodaje się do każdej próbki badanej. Preparat HIV-1 QS jest niezakaźnym konstruktom Armored RNA, zawierającym fragmenty sekwencji wirusa HIV-1 z obszarami wiązania primerów, które są identyczne z obszarami wiązania na docelowej sekwencji *gag* wirusa HIV-1. HIV-1 QS zawiera miejsca wiązania primerów HIV-1 i daje produkt amplifikacji o tej samej długości i składzie zasad, jak docelowy RNA genu *gag* HIV-1. Obszar wiązania sondy detekcyjnej w obrębie HIV-1 QS został zmodyfikowany, aby umożliwić odróżnienie amplikonu HIV-1 QS od amplikonu docelowego *gag* HIV-1.

Podczas fazy hybrydyzacji reakcji PCR w analizatorze COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 próbki są oświetlane i wzbudzone światłem przefiltrowanym, a następnie rejestruje się wyniki emisji przefiltrowanej fluorescencji każdej próbki. Odczyty dotyczące poszczególnych próbek poddaje się następnie korekcji w celu wyeliminowania zmienności wywołanej działaniem instrumentów. Aparat wprowadza odczyty fluorescencji do oprogramowania AMPLILINK i zapisuje w bazie danych. Stosuje się metodę odczytów wstępnych dla określenia, czy RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS reprezentują granicach, aparat generuje oflagowania. Po zakończeniu i pomyślnej ocenie odczytów wstępnych odczyty fluorescencji są następnie przetwarzane w celu obliczenia wartości Ct dla RNA HIV-1 i dla RNA HIV-1 QS. Karta swoistych dla danej serii stałych kalibracji, dołączona do testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, służy do obliczania wartości miana próbek i kontroli na podstawie wartości Ct RNA wirusa HIV-1 oraz RNA wzorca HIV-1 QS. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jest zgodny z międzynarodowym standardem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dla RNA wirusa HIV-1. Wyniki oznaczenia miana podaje się jako liczbę kopii/ml (kp/ml) lub jednostek międzynarodowych (IU/ml). Współczynnik konwersji wyniku miana RNA wirusa HIV-1 podanego w kp/ml oraz w IU HIV-1/ml firma Roche Molecular Systems, Inc. określa jako 0,6 kp/IU (1,67 IU/kp).

ODCZYNNIKI

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

HI2CAP

48 testów**HIV-1 v2.0 CS1****1 x 48 testów**

(Kaseta odczynników z cząsteczkami szkła magnetycznego do oznaczeń HIV-1)

Szklane cząstki magnetyczne
93% izopropanolu

HIV-1 v2.0 CS2**1 x 48 testów**

(Kaseta z odczynnikami lizującym do oznaczeń HIV-1)

Cytrynian sodu dwuwodny
42,5% tiocyjanianu guanidyny
< 14% polidokanolu
0,9% ditiotreitolu

HIV-1 v2.0 CS3**1 x 48 testów**

Kaseta wieloodczynnikowa do oznaczeń HIV-1, zawierająca:

Pase**1 x 3,8 ml**

(Roztwór proteinazy)

Bufor Tris
< 0,05% EDTA
Chlorek wapnia
Octan wapnia
≤ 7,8% proteinazy
Glicerol

EB**1 x 7,0 ml**

(Bufor do elucji)

Bufor TRIS base
0,2% metyloparabenu

HIV-1 v2.0 CS4**1 x 48 testów**

Kaseta odczynników swoistych dla testu do oznaczeń HIV-1, zawierająca:

HIV-1 QS**1 x 3,6 ml**

(Standard ilościowy HIV-1)

Bufor Tris-HCl
EDTA
< 0,005% Poli-rA RNA (syntetyczny)
< 0,001% konstrukt Armored RNA wirusa HIV-1,
zawierający sekwencje wiążące primer HIV-1 oraz
niepowtarzalny region wiązania sondy (niezakaźny
RNA obecny w bakteriofagu MS2)
0,05% azodyku sodu

HIV-1 MMX**1 x 2,5 ml**

(Odczynnik Master Mix HIV-1)

Bufor trycynowy
Octan potasu
Wodorotlenek potasu
20% dimetylosulfotlenku
Glicerol
< 0,04% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP
< 0,003% preparatu primerów sensownych i antysensownych
dla regionu *gag* oraz regionu LTR wirusa HIV-1
< 0,003% aptameru oligonukleotydowego

< 0,003% preparatu znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla HIV-1 oraz wzorca HIV-1 Quantitation Standard
 < 0,05% polimerazy DNA Z05 (bakteryjnej)
 < 0,1% enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) (bakteryjnej)
 0,09% azydki sodu

CAP/CTM Mn²⁺

1 x 19,8 ml

(roztwór manganu CAP/CTM)

< 0,5% octanu manganu
 Kwas octowy lodowaty
 0,09% azydki sodu

HIV-1 H(+), v2.0

4 x 1,0 ml

(Kontrola silnie dodatnia dla HIV-1, v2.0)

< 0,001% konstrukt Armored RNA wirusa HIV-1, zawierający sekwencje genomu HIV-1 (niezakaźny RNA obecny w bakteriofagu MS2).

Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenu HIV p24 oraz antygenu HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR
 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300

HIV-1 L(+), v2.0

4 x 1,0 ml

(Kontrola słabo dodatnia dla HIV-1, v2.0)

< 0,001% konstrukt Armored RNA wirusa HIV-1, zawierający sekwencje genomu HIV-1 (niezakaźny RNA obecny w bakteriofagu MS2).

Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenu HIV p24 oraz antygenu HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR
 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300

CTM (-) C

4 x 1,0 ml

[COBAS® TaqMan® ujemna próba kontrolna (osocze ludzkie)]

Ujemne osocze ludzkie, niereaktywne w testach na obecność przeciwciał przeciwko HCV, przeciwciał przeciwko HIV-1/2, antygenu HIV p24 oraz antygenu HBsAg; RNA HIV-1, RNA HCV i DNA HBV niewykrywalne przy użyciu metod PCR
 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300

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

1 x 4 klipsów

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli HIV-1 wysoko dodatniej, v2.0)

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

1 x 4 klipsów

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli HIV-1 nisko dodatniej, v2.0)

HIV-1 (-) C Clip

1 x 4 klipsów

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli ujemnej HIV-1, v2.0)

PG WR

(Odczynnik płuczący COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)
Cytrynian sodu dwuwodny
< 0,1% N-metyloizotiazolon-HCl

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen
Pre-Extraction Reagent**
(P/N: 06989861190)

SPEX

5 x 78 ml

SPEX

(cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent)
42,5% tiocyjanianu guanidyny
0,79% azydru sodu
0,01% kwasu cytrynowego
3,6% polidokanol
1,8% ditiotritolu

Uwaga: Niniejszy odczynnik jest opcjonalny i przeznaczony wyłącznie do stosowania w połączeniu z PSC do uzyskania próbek w postaci wysuszonej plamki osocza. Patrz dokument PSC Method Sheet ms_07963084190.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- A. **DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *IN VITRO*.**
- B. Test ten jest przeznaczony do stosowania z osoczem ludzkim pobranym na antykoagulant EDTA lub w postaci wysuszonej plamki osocza **PSC**.
- C. Nie należy pipetować za pomocą ust.
- D. Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium. Posługując się próbkami i odczynnikami z zestawów, należy stosować jednorazowe rękawice, fartuchy laboratoryjne oraz odpowiednią ochronę oczu. Trzeba dokładnie umyć ręce po pracy z próbkami i odczynnikami testowymi.
- E. **Przy pobieraniu materiałów z fiolek z kontrolą unikać skażenia bakteryjnego odczynników lub rybonukleazą.**
- F. **Zaleca się używanie jałowych jednorazowych pipet oraz końcówek pipet wolnych od RNaz.**
- G. Nie mieszać kontroli pochodzących z różnych serii lub z różnych butelek tej samej serii.
- H. Nie mieszać ze sobą kaset odczynników lub kontroli pochodzących z różnych zestawów.
- I. Nie otwierać kaset COBAS® AmpliPrep; nie wymieniać, nie mieszać, nie usuwać ani nie dodawać butelek do kasety.
- J. Wyrzucić wszystkie nieużyte odczynniki, odpady i próbki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.
- K. Nie używać zestawu po upływie daty ważności.
- L. Karty charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- M. Z próbkami i kontrolami należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując laboratoryjne procedury bezpieczeństwa, takie jak określone w dokumentach *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ oraz CLSI Document M29-A3³⁹. Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie dejonizowanej lub destylowanej.

Uwaga: Dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

Uwaga: W przypadku rozlania próbek w postaci wysuszonej plamki osocza PSC w odczynniku cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPEX) (który zawiera tiocyjanian guanidyny), nie wolno dopuścić do zetknięcia z środkami dezynfekującymi zawierającymi podchloryn sodu, takimi jak wybielacz. Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.

- N. **PRZESTROGA:** Odczynniki **CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0**, oraz **HIV-1 H(+)C, v2.0**, zawierają ludzkie osocze otrzymane z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy został przebadany i uznany za niereaktywny pod względem obecności antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg), przeciwciał przeciwko wirusowi HIV-1/2 oraz HCV, a także antygenu HIV p24. Badanie ujemnego osocza ludzkiego przy zastosowaniu metod PCR nie wykazało wykrywalnej obecności RNA wirusa HIV-1, RNA wirusa HCV ani DNA wirusa HBV. Nie są znane metody testowe mogące dać całkowitą pewność, że produkty pochodzące z krwi ludzkiej nie przenoszą czynników zakaźnych. Dlatego każdy materiał pochodzenia ludzkiego należy traktować jako potencjalnie zakaźny. Z odczynnikiemi **CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0** oraz **HIV1 H(+)C, v2.0**, należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując bezpieczne procedury laboratoryjne, jak przedstawione w wytycznych *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ i CLSI Document M29-A3³⁹. Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie dejonizowanej lub destylowanej.
- O. Odczynniki **HIV-1 QS, CAP/CTM Mn²⁺** i **HIV-1 MMX** zawierają azydek sodu. Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy spłukać rury dużą objętością wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- P. Podczas pracy z jakimkolwiek odczynnikiem należy używać osłon na oczy oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce jego wystąpienia należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania wspomnianych odczynników należy przed wytarciem plam rozcieńczyć je wodą.
- Q. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników **HIV-1 v2.0 CS2, SPEX** (stosowanych w przygotowaniu próbek w postaci wysuszonej plamki osocza **PSC**) i odpadów płynnych z aparatu COBAS® AmpliPrep zawierających tiocyjanian guanidyny z roztworem podchlorynu sodu (wybielacz). Takie mieszaniny mogą spowodować powstanie silnie toksycznego gazu.
- R. Odczynnik **SPEX** jest wrażliwy na światło i wysyłany w butelkach chroniących przed światłem.
- S. Podczas utylizacji zużytych jednostek do przetwarzania próbek COBAS® AmpliPrep Sample Processing Units (SPU) zawierających tiocyjanian guanidyny należy unikać ich kontaktu z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Takie mieszaniny mogą spowodować powstanie silnie toksycznego gazu.
- T. Dalsze ostrzeżenia i środki ostrożności opisano w dokumencie **PSC Method Sheet ms_07963084190**.

WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- A. **Nie zamrażać odczynników ani kontroli.**
- B. Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą kasotę z odczynnikami oraz fiolet, aby upewnić się, że nie ma żadnych oznak wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.
- C. Odczynniki **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 i HIV-1 v2.0 CS4** należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nieużywane odczynniki zachowują stabilność do momentu upływu wskazanej daty ważności. Po otwarciu odczynniki zachowują stabilność przez 28 dni w temperaturze 2–8°C lub do upływu daty ważności, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej. Odczynniki **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3** oraz **HIV-1 v2.0 CS4** mogą być stosowane przez maksymalnie 4 cykle urządzenia, łącznie przez okres 64 godzin pracy w aparacie COBAS® AmpliPrep. Pomiedzy kolejnymi cyklami pracy odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8°C.
- D. Odczynniki **HIV-1 H(+), HIV-1 L(+), HIV-1 L(+)C, v2.0 i CTM (–) C** należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Kontrole są stabilne aż do upływu podanej daty ważności. Po otwarciu opakowania niewykorzystane do badania odczynniki należy wyrzucić.
- E. Klipsy z kodem kreskowym [**HIV-1 H(+), HIV-1 L(+), HIV-1 L(+)C, v2.0 Clip i HIV-1 (–) C Clip**] należy przechowywać w temperaturze 2–30°C.
- F. Odczynnik **PG WR** należy przechowywać w temperaturze 2–30°C. Odczynnik **PG WR** zachowuje stabilność do upływu podanej daty ważności. Po otwarciu odczynnik zachowuje stabilność przez 28 dni w temperaturze 2–30°C lub do upływu daty ważności, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej.
- G. Odczynnik **SPEX** (stosowany w przygotowaniu próbek w postaci wysuszonej plamki osocza **PSC**) należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Odczynnik **SPEX** zachowuje stabilność do podanej daty ważności. Po otwarciu odczynnik zachowuje stabilność przez 28 dni w temperaturze 2–30°C lub do upływu daty ważności, zależnie od tego, co nastąpi wcześniej.
- H. Wymogi dotyczące przechowywania i stosowania odczynnika **PSC** zawarto w dokumencie **PSC Method Sheet ms_07963084190**.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

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

HI2CAP

HIV-1 v2.0 CS1

(Kaseta odczynników z cząsteczkami szkła magnetycznego do oznaczeń HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS2

(Kaseta z odczynnikiem lizującym do oznaczeń HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS3

(Kaseta wieloodczynnikowa do oznaczeń HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS4

(Kaseta odczynników swoistych dla testu do oznaczeń HIV-1)

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

(Kontrola HIV-1 silnie dodatnia, v2.0)

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

(Kontrola HIV-1 słabo dodatnia, v2.0)

CTM (-) C

[kontrola ujemna COBAS® TaqMan® (osocze ludzkie)]

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

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli HIV-1 silnie dodatniej, v2.0)

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

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli HIV-1 słabo dodatniej, v2.0)

HIV-1 (-) C Clip

(Klips z kodem kreskowym dla kontroli ujemnej HIV-1)

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

PG WR

- C. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen
Pre-Extraction Reagent**
(P/N: 06989861190)

SPEX

MATERIAŁY WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZANE

Urządzenia i oprogramowanie

- Urządzenie COBAS® AmpliPrep
 - Analizator COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48
 - Opcjonalnie: Aparat **cobas p 630**
 - Opcjonalnie: Stacja dokująca
 - Oprogramowanie AMPLILINK w wersji serii 3.3 lub 3.4
 - Jednostka sterująca z oprogramowaniem AMPLILINK, wyposażona w drukarkę
 - Podręczniki obsługi urządzeń i oprogramowania:
 - Instrukcja obsługi urządzenia COBAS® AmpliPrep do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® 48 do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4
 - Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.3 do użytku z urządzeniem COBAS® AmpliPrep, analizatorem COBAS® TaqMan®, analizatorem COBAS® Taqman® 48, analizatorem COBAS® AMPLICOR® i urządzeniem **cobas p 630**
- lub
- Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.4
 - Opcjonalnie: Podręcznik użytkownika aparatu **cobas p 630** z oprogramowaniem w wersji 2.2
- Plik definicji testu (Test Definition File, TDF). Nazwa i numer bieżącej wersji TDF znajdują się na karcie informacyjnej produktu, dołączonej do opakowania zestawu.

Materiały jednorazowe

- Jednostki do przygotowywania próbek: SPU
- Probówki wejściowe na próbki (probówki S) z klipsami z kodem kreskowym
- Statywy z końcówkami K
- Opakowanie zawierające probówki K 12 x 96

INNE MATERIAŁY WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZANE (TYLKO DO PRÓBEK OSOCZA Z EDTA)

- Statyw na próbki (statyw SK24)
- Statyw na odczynniki
- Statyw na jednostki SPU
- Urządzenie do mocowania korka w probówkach K, zawierające silnik
- Urządzenie do mocowania korka w probówkach K
- Nośnik K
- Transporter do nośnika K
- Statyw na nośnik K
- Pipetory z wolnymi od RNaz końcówkami z barierą aerozolową lub dodatnim wypieraniem (pojemność 1000 µl)*
- Rękawice jednorazowe bezpudrowe
- Mieszadło wibracyjne

* Dokładność pipetorów musi mieścić się w zakresie 3% podanej objętości. Tam gdzie wymagane, należy używać pozbawionych RNazy końcówek z filtrem lub barierą dodatniego wypierania w celu zapobieżenia skażeniu krzyżowemu między próbką i amplikonem.

INNE MATERIAŁY I MATERIAŁY EKSPLOATACYJNE WYMAGANE, LECZ NIEDOSTARCZANE (TYLKO DO PRÓBEK W POSTACI WYSUSZONEJ PŁAMKI OSOCZA PSC)

- Karta do oddzielenia osocza (PSC) **cobas**®*
- Jałowa lub jednorazowa pinceta bądź szczypczyki**
- Kapilara 140 µl (np. rurka z tworzywa Vitrex) ze zgodnym podajnikiem (np. uchwytem na pipety Vitrex)*
- Jednorazowy nakłuwacz (np. Greiner Bio-one: MiniCollect® Safety Lancet, głębokość penetracji: 2,00 mm)*
- Torba na próbki (przezroczysta torebka strunowa z tworzywa) i saszetki krzemionkowego środka osuszającego (łącznie 4 gramy. Więcej informacji na temat przechowywania i dostarczania **PSC** zamieszczono w dokumencie **PSC** Method Sheet ms_07963084190).
- Torba transportowa (np. Wicoseal 180 x 60 x 240 mm)
- Pipeta (np. pipeta Multistep®)
- Eppendorf Thermomixer® (np. model R 5355 lub C, lub odpowiednik) z termoblokiem na 24 krioprobówki

* Więcej informacji na temat pobierania próbek do **PSC** zamieszczono w dokumencie **PSC** Method Sheet ms_07963084190.

** Aby zapobiec zakażeniu krzyżowemu, stosować wyłącznie jedną pincetę na pacjenta! Zaleca się stosowanie pincet metalowych i sterylizowanie ich w autoklawie po każdym użyciu.

POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK OSOCZA Z EDTA

Uwaga: *Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.*

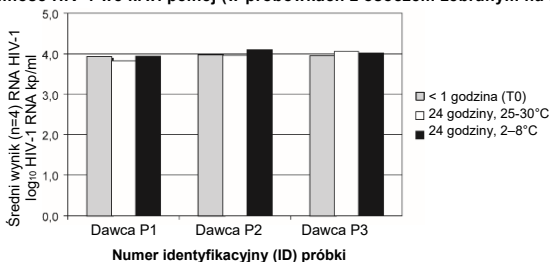
Uwaga: *Ten test został zatwierdzony wyłącznie do badania próbek ludzkiego osocza pobranego na EDTA jako antykoagulant lub w postaci wysuszonej płamki osocza PSC. Badanie innych rodzajów próbek może dawać nieprawidłowe wyniki.*

A. Pobieranie próbek

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jest przeznaczony do stosowania z próbkami osocza. Krew należy pobierać do jałowych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant, a następnie mieszać zgodnie z zaleceniami producenta probówki.

Krew pełną należy przechowywać w temperaturze 2–25°C nie dłużej niż przez 24 godziny. Oddzielić osocze od pełnej krwi w ciągu 24 godzin od pobrania, odwirowując (800–1600 x g przez 20 minut) w temperaturze pokojowej. Osocze należy przenieść do jałowych probówek polipropylenowych. Rysunek 4 przedstawia dane dotyczące stabilności próbek pochodzące z badań nad stabilnością próbek przeprowadzonych z użyciem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

Rysunek 4
Stabilność HIV-1 we krwi pełnej w próbkach z osoczem zebrany na EDTA)



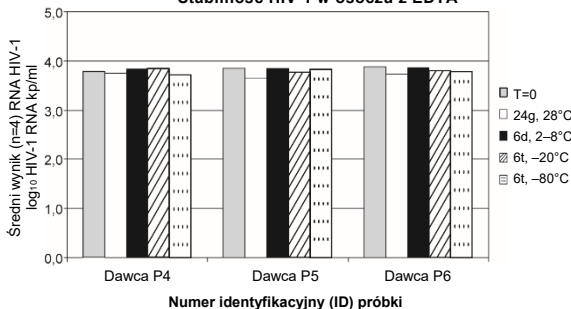
B. Transport próbek

Krew pełna lub osocze należy transportować zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi dotyczącymi transportu czynników etiologicznych⁴⁰. Krew pełną należy transportować w temperaturze 2–25°C i odwirować w ciągu 24 godzin od pobrania. Osocze należy transportować w temp. 2–8°C lub zamrozić w temp. –20°C do –80°C.

C. Przechowywanie próbek

Probówki osocza można przechowywać w temperaturze pokojowej (25–30°C) przez 1 dzień lub w temperaturze 2–8°C przez 6 dni. Zamrożone próbki osocza wykazują stabilność przez sześć tygodni w temperaturze od –20°C do –80°C. Zaleca się przechowywanie próbek w porcjach o objętości 1100–1200 µl w sterylnych polipropylenowych probówkach o pojemności 2,0 ml, z nakrętką (takich jak Sarstedt 72.694.006). Rysunek 5 przedstawia dane dotyczące stabilności próbek pochodzące z badań nad przechowywaniem próbek przeprowadzonych z użyciem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

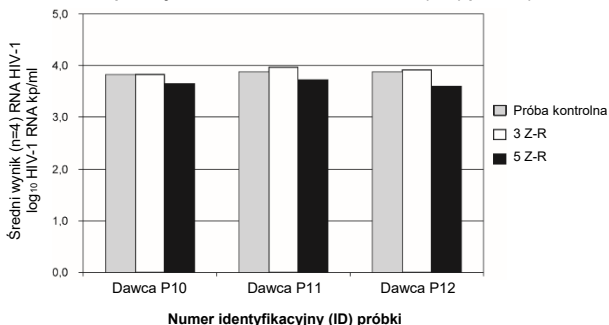
Rysunek 5
Stabilność HIV-1 w osoczu z EDTA



Próbki surowicy i osocza można zamrażać i rozmrażać do 5 razy bez znaczącej utraty RNA HIV-1. Rysunek 6 przedstawia dane pochodzące z badania dotyczącego zamrażania i rozmrażania przeprowadzonego z użyciem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N: 03543005 190).

Rysunek 6

Wyniki dla HIV-1 po 5 cyklach zamrażania-rozmrażania (Z-R) próbki (osocze z EDTA)



POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECZYSZCZANIE PRÓBEK W POSTACI WYSUSZONEJ PLAMKI OSOCZA PSC

Uwaga: Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

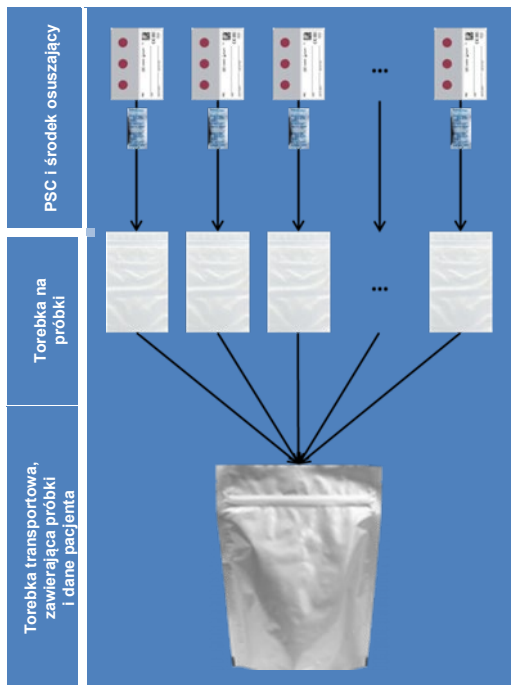
Uwaga: Ten test został zatwierdzony wyłącznie do badania próbek ludzkiego osocza pobranego na EDTA jako antykoagulant lub w postaci wysuszonej plamki osocza PSC. Badanie innych rodzajów próbek może dawać nieprawidłowe wyniki.

A. Pobieranie próbek

Podczas pobierania próbek w postaci wysuszonej plamki osocza **PSC** należy przestrzegać odpowiednich procedur klinicznych. Należy sprawdzić datę ważności karty **PSC** przed użyciem. Kartę **PSC** wolno zastosować wyłącznie wtedy, jeśli data ważności jeszcze nie upłynęła i jeśli torebka z **PSC** jest szczelnie zamknięta i nienaruszona. Oznaczyć kartę **PSC** imieniem i nazwiskiem pacjenta, datą urodzenia oraz datą i godziną pobrania próbki. Nanieść 140 µl krwi pełnej na każde kółko membrany karty **PSC** poprzez okienko w warstwie ochronnej, stosując odpowiednią kapilare i podajnik. Zaleca się nanieść próbki na wszystkie trzy miejsca na karcie **PSC**, aby umożliwić powtórzenie testu. Nie nanosić próbek pochodzących od różnych pacjentów na tę samą kartę **PSC**. Upewnić się, że OBIE strony okienek **PSC** (przód: membrana z krwią; tył: plamka osocza) są wysuszone po 5 minutach. Skontrolować tylną stronę przez przezroczystą warstwę tylną. Nie dopuścić do zetknięcia membrany z rękawiczkami, narzędziami ani innymi potencjalnie zakażonymi powierzchniami.

Odstawić kartę **PSC** do wyschnięcia w temperaturze pokojowej na co najmniej 4 godziny (maksymalnie na noc), chroniąc przed bezpośrednim światłem słonecznym. Nie usuwać warstwy ochronnej. Zostanie to wykonane w laboratorium. Po wysuszeniu przechowywać karty **PSC** w osobnych, szczelnie zamkniętych torebkach na próbkę z 4 gramami środka osuszającego (Rysunek 7). Torebki z próbkami należy umieścić razem w torebce transportowej wraz z odośną kartą danych pacjenta. Zaleca się pakować maksymalnie po 25 **PSC** na torebkę transportową.

Rysunek 7
Pakowanie kart PSC na potrzeby transportu



B. Transport próbek

Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i (lub) międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników etiologicznych. Torby transportowe zawierające karty **PSC** należy przetransportować w ciągu 28 dni, utrzymując temperaturę 18–45°C i wilgotność do 85%.

C. Przechowywanie próbek

Karty **PSC** w osobnych torebkach na próbkę z 4 gramami środka osuszającego, w torebce transportowej można po przetransportowaniu przechowywać w temperaturze pokojowej (18–30°C), w temperaturze 2–8°C lub w temperaturze $\leq -10^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 56 dni (niezależnie od oddzielenia warstw).

INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

Uwaga: Szczegółowe instrukcje obsługi, dokładny opis możliwych konfiguracji, drukowania wyników oraz interpretacji znaczników, komentarzy i komunikatów o błędach zawierają: (1) Instrukcja obsługi urządzenia COBAS® AmpliPrep do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4; (2) Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4; (3) Instrukcja obsługi analizatora COBAS® TaqMan® 48 do użytku z oprogramowaniem AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4; (4) Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.3 do użytku z urządzeniem COBAS® AmpliPrep, analizatorem COBAS® TaqMan®, analizatorem COBAS® TaqMan® 48, analizatorem COBAS® AMPLICOR® i aparatem cobas p 630 lub Podręcznik oprogramowania AMPLILINK w wersji serii 3.4; (5) opcjonalnie: Podręcznik użytkownika aparatu cobas p 630 z oprogramowaniem w wersji 2.2.

Informacje zawarte w częściach A–C i F–J dotyczą obu typów próbek (osocza z EDTA lub w wysuszonej płamce na karcie PSC). Część D zawiera informacje dotyczące tworzenia zleceń i wkładania próbek, odnoszące się tylko do osocza z EDTA. Część E zawiera informacje dotyczące tworzenia zleceń i wkładania próbek, odnoszące się tylko do osocza w wysuszonej płamce na karcie PSC.

Wielkość serii

Każdy zestaw zawiera odczynniki wystarczające do 48 testów, które można przeprowadzać w seriach od 12 do 24 testów. Każda seria musi obejmować co najmniej jedną kontrolę [CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 i HIV-1 H(+)C, v2.0] (patrz rozdział „Kontrola jakości”).

Przebieg pracy

Przebieg pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 należy rozpocząć w ciągu 120 minut od zakończenia przygotowania próbki i kontroli.

Uwaga: *Próbki i kontrole po obróbce nie zamrażać ani nie przechowywać w temperaturze 2–8°C.*

Przygotowanie próbki i kontroli

Uwaga: *W przypadku stosowania próbek zamrożonych należy je pozostawić w temperaturze pokojowej do całkowitego rozmrożenia i przed użyciem wymieszać na mieszadle wibracyjnym przez 3–5 sekund. Kontrole przed użyciem należy wyciągnąć z miejsca przechowywania o temperaturze 2–8°C i pozostawić do ogrzania do temperatury otoczenia.*

Przygotowanie urządzenia COBAS® AmpliPrep

Część A. Konserwacja i płukanie

- A1. Urządzenie COBAS® AmpliPrep w trybie oczekiwania (stand-by) jest gotowe do pracy.
- A2. Włącz jednostkę sterującą z oprogramowaniem AMPLILINK za pomocą przycisku **ON**. Przygotuj jednostkę sterującą w następujący sposób:
 1. Zaloguj się do systemu operacyjnego Microsoft Windows.
 2. Dwukrotnie kliknij ikonę oprogramowania AMPLILINK.
 3. Zaloguj się do programu AMPLILINK, wprowadzając przydzielony identyfikator użytkownika i hasło.
- A3. Skontroluj zapas odczynnika **PG WR** na ekranie **Status** i w razie potrzeby wymień go.
- A4. Wykonaj wszystkie czynności konserwacyjne wyszczególnione w zakładce Due. Urządzenie COBAS® AmpliPrep automatycznie przepłucze system.

Część B. Wkładanie kaset z odczynnikami

Uwaga: *Wszystkie kasety odczynników należy wyjąć z miejsca przechowywania w temperaturze 2–8°C, natychmiast włożyć do urządzenia COBAS® AmpliPrep i pozostawić do ogrzania się do temperatury otoczenia wewnątrz urządzenia co najmniej przez 30 minut przed rozpoczęciem przetwarzania pierwszej próbki. Nie dopuszczać do ogrzania się kaset z odczynnikami do temperatury otoczenia poza urządzeniem ze względu na możliwość skraplania pary na etykietach z kodem kreskowym. W przypadku pojawienia się skroplonej pary nie ścierać jej z etykiet z kodem kreskowym.*

- B1. Umieścić kasety **HIV-1 v2.0 CS1** w statywie na odczynniki. Umieścić kasety **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** oraz **HIV-1 v2.0 CS4** na osobnych statywach na odczynniki.
- B2. Włożyć statyw na odczynniki zawierający **HIV-1 v2.0 CS1** w miejsce **A** w aparacie COBAS® AmpliPrep.
- B3. Włożyć statyw na odczynniki zawierający **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** i **HIV-1 v2.0 CS4** w miejsce **B**, **C**, **D** lub **E** w aparacie COBAS® AmpliPrep. (Dodatkowe informacje przedstawiono w tabeli 1).

Część C. Wkładanie materiałów jednorazowych

Uwaga: *Należy określić liczbę potrzebnych kaset odczynnikowych COBAS® AmpliPrep, jednostek przetwarzania próbki (SPU), próbek wejściowych próbki (próbek S), końcówek K oraz próbek K. Każda próbka lub kontrola wymaga użycia jednej jednostki przetwarzania próbki SPU, jednej próbki wejściowej S, jednej końcówki K i jednej próbki K.*

Urządzenie COBAS® AmpliPrep współpracujące z analizatorem COBAS® TaqMan® lub analizatorem COBAS® TaqMan® 48 charakteryzuje się wieloma możliwościami ustawień przebiegu pracy. Szczegółowe informacje — patrz tabela 1, poniżej. W zależności od wybranego ustawienia przebiegu pracy załaduj odpowiednią liczbę statywów z kasetami odczynników, statywów na próbki z próbkami wejściowymi S, statywów na jednostki SPU, statywów z końcówkami K, statywów z próbkami K oraz nośników w statywach na nośniki K na odpowiednie pozycje w aparacie COBAS® AmpliPrep (dodatkowe informacje podano w Tabeli 1).

- C1. Umieścić jednostki SPU w statywach i załaduj statywy na odpowiednie pozycje **J**, **K** lub **L** w aparacie COBAS® AmpliPrep.
- C2. W zależności od wybranego ustawienia przebiegu pracy włożyć pełne statywy próbek K w pozycje **M**, **N**, **O** lub **P** w aparacie COBAS® AmpliPrep.
- C3. Włożyć pełne statywy z końcówkami K w pozycje **M**, **N**, **O** lub **P** w urządzeniu COBAS® AmpliPrep.
- C4. W przypadku wybrania przebiegu pracy nr 3 analizatora COBAS® TaqMan® 48 włożyć nośniki K do statywu na nośniki K w miejsca **M** i **N** lub **O** i **P** w aparacie COBAS® AmpliPrep.

Tabela 1
Możliwości ustawień przebiegu pracy aparatu COBAS® AmpliPrep
z analizatorem COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48

Przebieg pracy		Sposób przeniesienia do analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48	Statywy, zasobniki i materiały jednorazowe	Pozycja w aparacie COBAS® AmpliPrep
1	Aparat COBAS® AmpliPrep plus stacja dokująca plus analizator COBAS® TaqMan®	Automatyczne przenoszenie nośnika K	Probówki K w pełnych statywach na probówki K	M–P
			Końcówki K w pełnych statywach na końcówki K	M–P
			Probówki wejściowe S-tubes zawierające próbki oraz kontrole w statywach na próbki	F–H
			Jednostki SPU w statywach na zestawy SPU	J–L
			Odczytnik CS1 w statywie na kasety	A
			Odczytniki CS2, CS3, CS4 w statywie na kasety	B–E
2	Aparat COBAS® AmpliPrep plus analizator COBAS® TaqMan®	Ręczne przenoszenie próbek K w statywie(-ach) na próbki do analizatora COBAS® TaqMan®	Probówki K w pełnych statywach na probówki K	M–P
			Końcówki K w pełnych statywach na końcówki K	M–P
			Probówki wejściowe S-tubes zawierające próbki oraz kontrole w statywach na próbki	F–H
			Jednostki SPU w statywach na zestawy SPU	J–L
			Odczytnik CS1 w statywie na kasety	A
			Odczytniki CS2, CS3, CS4 w statywie na kasety	B–E
			<u>Po zakończeniu przetwarzania próbki:</u> Probówki K w statywach na próbki (gotowe do przeniesienia ręcznego)	Jak powyżej (F–H)
3	Aparat COBAS® AmpliPrep plus analizator(y) COBAS® TaqMan® 48	Ręczne przenoszenie nośnika K za pomocą statywów na nośniki K do analizatora COBAS® TaqMan® 48	Probówki K w statywach na próbki	F–H
			Końcówki K w pełnych statywach na końcówki K	M–P
			Probówki wejściowe S-tubes zawierające próbki oraz kontrole w statywach na próbki	F–H
			Jednostki SPU w statywach na zestawy SPU	J–L
			Odczytnik CS1 w statywie na kasety	A
			Odczytniki CS2, CS3, CS4 w statywie na kasety	B–E
			Puste nośniki K z kodem kreskowym w statywie na nośniki K	M–P
			<u>Po zakończeniu przetwarzania próbki:</u> Probówki K w nośniku K w statywie na zasobniki	Jak powyżej (M–P)

Część D. Tworzenie zleceń i wkładanie próbek: Próbkę osocza pobranego na EDTA

- D1. Przygotuj statywy na próbki w następujący sposób: Do każdej pozycji statywu próbek, gdzie zostanie umieszczony materiał próbki (probówka S-tube), włóż klips opatrzony etykietą z kodem kreskowym. Do każdej pozycji statywu próbek, gdzie zostanie umieszczony materiał kontroli (probówka S-tube), włóż odpowiedni klips opatrzony etykietą z kodem kreskowym dla danej kontroli [CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 i HIV-1 H(+)C, v2.0]. Klipsy z kodami kreskowymi dla kontroli powinny mieć takie same numery serii, jak numery serii fiolek kontroli w zestawie. Zwróć uwagę, aby odpowiednie kontrole umieścić w pozycjach z odpowiednim klipsem z kodem kreskowym kontroli. Na każdej pozycji oznaczonej klipsem z kodem kreskowym umieścić jedną probówkę wejściową S-tube.
- D2. Wybierz w oprogramowaniu AMPLILINK plik definicji testu (HI2CAP96 dla aparatu COBAS® AmpliPrep z analizatorem COBAS® TaqMan®, HI2CAP48 dla aparatu COBAS® AmpliPrep z analizatorem COBAS® TaqMan® 48), utwórz zlecenia dla poszczególnych próbek i kontroli w oknie **Orders**, w zakładce **Sample** i zakończ procedurę zapisem.
- D3. W oknie **Orders**, w zakładce **Sample Rack** przypisz zlecenia dla próbek i kontroli do pozycji statywów na próbki. Należy wprowadzić numer statywu próbek dla statywu przygotowanego w punkcie D1.
- D4. Wydrukuj raport **Sample Rack Order**, który będzie służyć jako arkusz roboczy.
- D5. Przygotuj statywy na próbki i kontrole w miejscu pracy wyznaczonym do dodawania próbek i kontroli, jak opisano poniżej. Umieść każdą próbkę i kontrolę [CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 i HIV-1 H(+)C, v2.0] na 3–5 sekund na mieszadle wibracyjnym. Unikaj zanieczyszczenia rękawic przy posługiwaniu się próbkami i kontrolami.
- D6. Przenieś 1000–1050 µl każdej próbki i kontroli [CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 i HIV-1 H(+)C, v2.0] do odpowiedniej, oznaczonej kodem kreskowym probówki wejściowej S-tube za pomocą mikropipetora z barierą aerozolu lub końcówkami dodatniego wypierania wolnymi od RNazy. **Unikaj przenoszenia cząstek stałych i/lub skręplin fibrynowych z oryginalnej próbki do probówki wejściowej S-tube.** Próbkę i kontrolę należy przenieść na pozycję probówek zgodnie z przygotowanym i zapisanym w punkcie D4 arkuszem roboczym. Klipsy z kodami kreskowymi dla kontroli powinny mieć takie same numery serii, jak numery serii fiolek kontroli w zestawie. Przypisz odpowiednie kontrole do właściwych pozycji z odpowiednim klipsem z kodem kreskowym kontroli. **Unikaj zanieczyszczenia górnej części probówek S materiałem próbki lub kontroli.** W przypadku używania aparatu **cobas p 630** informacje na temat przygotowywania próbek można znaleźć w podręczniku użytkownika aparatu **cobas p 630**.
- D7. W przypadku przebiegów pracy 1 i 2 statywy na próbki wypełnione probówkami wejściowymi S-tubes umieść na pozycjach **F**, **G** lub **H** w aparacie COBAS® AmpliPrep.
- D8. W przypadku przebiegu pracy 3 z użyciem analizatora COBAS® TaqMan® 48 statywy na próbki z probówkami wejściowymi S-tubes oraz probówkami K-tubes (po jednej dla każdej z probówek wejściowych S-tubes, umieszczonych w prawym położeniu i sąsiadującej z probówką wejściową S-tube) umieść na pozycjach **F**, **G** lub **H** w aparacie COBAS® AmpliPrep.

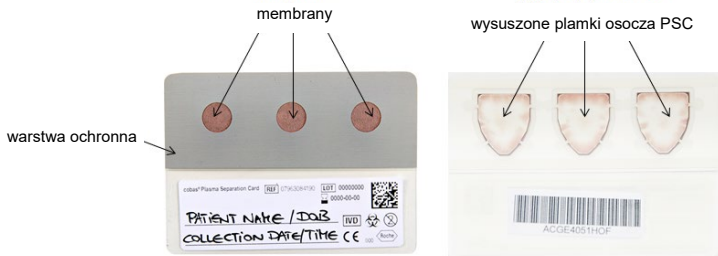
Część E. Tworzenie zleceń i wkładanie próbek: Próbkę w postaci wysuszonej plamki osocza PSC

- E1. Przed otwarciem sprawdzić, czy worek transportowy jest nienaruszony. Kontynuować jedynie, gdy worek transportowy jest całkowicie szczelny.

Otwórz torbę transportową i kontynuuj pracę z poszczególnymi torebkami na próbkę, wyłącznie jeśli:

- Laboratoryjny formularz zamówienia jest całkowicie wypełniony.
- Kod kreskowy na laboratoryjnym formularzu zamówienia odpowiada kodowi kreskowemu na karcie **PSC**.
- Torba na próbki jest szczelnie zamknięta i zawiera jedną kartę **PSC** oraz 4 gramy środka osuszającego.
- Wskazano datę pobrania próbki i mieści się ona w ostatnich 28 dniach oraz przed datą ważności karty **PSC**.
- Data ważności karty **PSC** nie została przekroczona.
- Wysuszona plamka osocza **PSC** wygląda na homogeniczną, gdy ogląda się ją z przodu, i całkowicie pokrytą osoczem z tyłu (patrz Rysunek 8).

Rysunek 8
Wysuszone plamki osocza PSC do przetwarzania
(po lewej: strona przednia. Po prawej: strona tylna)



- E2. Wysuszone plamki osocza **PSC** należy oznaczyć i odrzucić jeśli:

- widoczne są ślady rozlania krwi (Rysunek 9a) i/lub membrana nie jest całkowicie pokryta krwią (Rysunek 9b), przez co okienko **PSC** jest niehomogeniczne z przodu i/lub niecałkowicie pokryte osoczem z tyłu (co jest widoczne przez nośnik);
- membrana jest uszkodzona (Rysunek 9c), przez co okienko **PSC** jest niehomogeniczne z przodu i ciemnoczerwone lub brązowawe z tyłu (co jest widoczne przez nośnik).

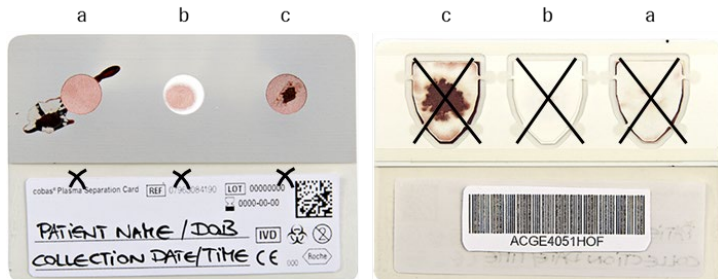
Uwaga: Karta zawiera trzy okienka, aby umożliwić testy w powtórzeniach. Jeśli nawet jedno z okienek karty PSC jest nieprawidłowe, pozostałe mogą zawierać odpowiednie do badań próbki. Należy oznaczyć odpowiednio nieprawidłowe próbki, aby były łatwo rozpoznawalne. Nie powinno się oznaczać ich na warstwie ochronnej. Należy zawsze porównywać między sobą trzy plamki, aby ocenić ich jakość.

Rysunek 9

Kryteria odrzucenia PSC (po lewej: strona przednia. Po prawej: strona tylna).

Nie przetwarzać okienek z wyciekaniem krwi (a), niezakrytą membraną (b) lub widocznym uszkodzeniem membrany (c).

Okienka powinny być wyraźnie oznaczone w przypadku odrzucenia.



- E3. Przygotuj statywy na próbki w następujący sposób: Do każdej pozycji statywu próbek, gdzie zostanie umieszczony materiał próbki (probówka S-tube), włóż klips opatrzony etykietą z kodem kreskowym. Do każdej pozycji statywu próbek, gdzie zostanie umieszczony materiał kontroli (probówka S-tube), włóż odpowiedni klips opatrzony etykietą z kodem kreskowym dla danej kontroli [CTM (-) C, HIV-1 L(+), v2.0 i HIV-1 H(+), v2.0]. Klipsy z kodami kreskowymi dla kontroli powinny mieć takie same numery serii, jak numery serii fiolek kontroli w zestawie. Zwróć uwagę, aby odpowiednie kontrole umieścić w pozycjach z odpowiednim klipsem z kodem kreskowym kontroli. Na każdej pozycji oznaczonej klipsem z kodem kreskowym umieścić jedną probówkę wejściową S-tube.
- E4. Wybierz w oprogramowaniu AMPLILINK odpowiedni plik definicji testu (HI2PSC96 dla aparatu COBAS® AmpliPrep z analizatorem COBAS® TaqMan®, HI2PSC48 dla aparatu COBAS® AmpliPrep z analizatorem COBAS® TaqMan® 48), utwórz zlecenia dla poszczególnych próbek i kontroli w oknie **Orders**, w zakładce **Sample** i zakończ procedurę zapisem.
- E5. W oknie **Orders**, w zakładce **Sample Rack** przypisz zlecenia dla próbek i kontroli do pozycji statywów na próbki. Należy wprowadzić numer statywu próbek dla statywu przygotowanego w punkcie E1. Kod kreskowy pacjenta z tyłu karty **PSC** można zeskanować poprzez torebkę na próbkę (Rysunek 10). Nie należy w tym celu otwierać torebki na próbkę. Zakończ procedurę zapisem.

Rysunek 10
Skanowanie kodu kreskowego próbki w celu zlecenia oznaczenia próbek
w postaci wysuszonej plamki osocza PSC



- E6. Wydrukuj raport **Sample Rack Order**, który będzie służyć jako arkusz roboczy, i sprawdź ponownie, czy zastosowano odpowiedni plik definicji testu.
- E7. Wykonaj czynności w punktach E7–E11 w komorze bezpieczeństwa. Otwórz torebkę na próbkę z wybraną kartą **PSC** i zdejmij warstwę ochronną (Rysunek 11). Delikatnie zagnij kartę **PSC** i zdejmij jedną wysuszoną plamkę osocza jałowymi szczypcami lub pincetą, pociągając ją ku górze. Zagnij zdjętą wysuszoną plamkę osocza na karcie **PSC**, aby ułatwić wprowadzenie do próbówki (Rysunek 12).

Rysunek 11
Zdejmowanie warstwy ochronnej



Rysunek 12
Zdejmowanie i zaginanie wysuszonej plamki osocza PSC

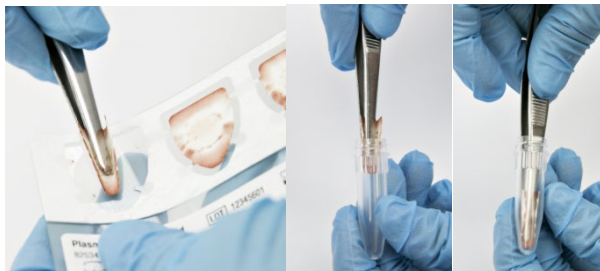


Uwaga: Stosować wyłącznie jedną pincetę na pacjenta.

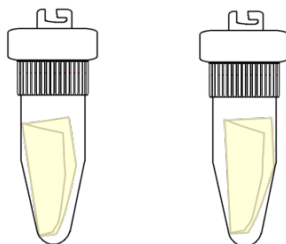
- E8. Przenieś jedną wstępnie zagiętą wysuszoną plamkę osocza **PSC** do odpowiedniej próbówki wejściowej S-tube, tak aby dolny róg plamki **PSC** sięgał dna próbówki, a jej krawędź była przyczepiona do ścianki próbówki, co zapobiegnie błędom pipetowania (Rysunek 13 i Rysunek 14).

Uwaga: Wysuszone plamki osocza po przechowywaniu mogą stać się kruche. Patrz wymagania dotyczące przechowywania PSC. Podczas umieszczania ich w próbówce należy postępować z nimi ostrożnie.

Rysunek 13
Przenoszenie wysuszonej plamki osocza PSC do próbówki



Rysunek 14
Optymalne położenie wysuszonej plamki osocza PSC w próbówce S-tube



Ważne

Potencjalne ryzyko skrzepu

Uwaga: *Należy się upewnić, że numer pozycji próbówki wejściowej S-tube w raporcie Sample Rack Order odpowiada pozycji w statywie SK24.*

- E9. W razie potrzeby umieść kartę **PSC** z pozostałymi wysuszonymi plamkami osocza w jej oryginalnej torebce na próbkę, zawierającej 4 gramy środka osuszającego (Rysunek 15). Karty **PSC** można przechowywać przez 56 dni po transporcie, niezależnie od oddzielenia warstw (w temperaturze 18–30°C lub 2–8°C, lub $\leq -10^{\circ}\text{C}$).

Rysunek 15
PSC w torebce na próbkę, do ewentualnego ponownego badania



- E10. Zamknij probówkę wejściową S-tube i przenieś próbkę zawierającą wysuszoną plamkę osocza **PSC** na statyw SK24, na pozycję 4-24 (dalsze informacje zawarto w tabeli 2). Powtórz czynności do momentu przygotowania wszystkich próbek.

Uwaga: *Przed użyciem odczynnika **SPEX** odczekać, aż ogrzeje się do temperatury otoczenia.*

- E11. Otwieraj po kolei probówki wejściowe S-tubes, zatyczki pozostaw w strefie czystej i dodaj 1100 µl odczynnika **SPEX** do każdej z próbek (Rysunek 16). Ponownie zamknij probówki wejściowe S-tube. Powtórz czynności do momentu przygotowania wszystkich próbek.

Rysunek 16
Dodanie 1100 µl odczynnika **SPEX do każdej z wysuszonych plamek osocza PSC**



Uwaga: *Należy zapobiegać zanieczyszczeniu górnej części probówek wejściowych S-tubes próbką i upewnić się, że probówki są szczelnie zamknięte, aby przeciwdziałać parowaniu.*

- E12. Przenieś przygotowane probówki wejściowe S-tubes do aparatu Eppendorf Thermomixer i prowadź ich inkubację w temperaturze 56°C i przy ciągłym wytrząsaniu z prędkością 1000 obr./min przez 10 minut, aby ekstrahować wirusa z osuszonego osocza (Rysunek 17).

Rysunek 17
Prowadzenie inkubacji przez 10 minut.



Uwaga: *Rozpocznij inkubację bezpośrednio po dodaniu odczynnika SPEX.*

E13. Podczas inkubacji przygotuj kontrole w opisany poniżej sposób.

Uwaga: *Nie należy inkubować kontroli.*

Na każdej pozycji przygotowanego statywu SK24, oznaczonej klipsem z kodem kreskowym kontroli (1–3), umieść jedną probówkę wejściową S-tube.

Mieszaj dokładnie 1 fiolkę z **CTM (–) C** przez 20 sekund na mieszadło wibracyjnym. Przenieś 1000 µl **CTM (–) C** do probówki wejściowej S-tube na pozycji 1 w statywie SK24. Niezwłocznie zamknij ponownie tę probówkę wejściową S-tube.

Mieszaj dokładnie 1 fiolkę z **HIV-1 L(+)C, v2.0** przez 20 sekund na mieszadło wibracyjne. Przenieś 1000 µl **HIV-1 L(+)C, v2.0** do probówki wejściowej S-tube na pozycji 2 w statywie SK24. Niezwłocznie zamknij ponownie tę probówkę wejściową S-tube.

Mieszaj dokładnie 1 fiolkę z **HIV-1 H(+)C, v2.0** przez 20 sekund na mieszadło wibracyjne. Przenieś 1000 µl **HIV-1 H(+)C, v2.0** do probówki wejściowej S-tube na pozycji 3 w statywie SK24. Niezwłocznie zamknij ponownie tę probówkę wejściową S-tube.

Tabela 2
Tworzenie zleceń i wkładanie próbek w postaci wysuszonych płamek osocza PSC

Próbka	Pozycja w zleceniu AMPLILINK	Pozycja w statywie Eppendorf IsoRack	Pozycja w statywie SK24
Próbka	Probówka wejściowa S-tube	Probówka wejściowa S-tube	Probówka wejściowa S-tube
CTM(-)C	1	Pusta	1
HIV-1 L(+)C, v2.0	2	Pusta	2
HIV-1 H(+)C, v2.0	3	Pusta	3
Wysuszona plamka osocza PSC + 1100 µl odczynnika SPEX	4-24	4-24	4-24

E14. Po inkubacji przenieś próbki we właściwej kolejności na statyw SK24 zawierający kontrole (punkt E13) (dalsze informacje zawarto w tabeli 2).

Uwaga: *Upewnij się, że pozycja wysuszonej płamki osocza PSC w próbówce jest nadal poprawna (Rysunek 14) i w razie potrzeby skoryguj ją jałową końcówką pipety. Jeśli pojawią się pęcherzyki powietrza, usuń je jałową końcówką pipety.*

E15. Statywy na próbki wypełnione próbkami wejściowymi S-tubes umieść na pozycjach **F**, **G** lub **H** w aparacie COBAS® AmpliPrep.

Część F. Rozpoczęcie przebiegu pracy urządzenia COBAS® AmpliPrep

F1. Przy użyciu oprogramowania AMPLILINK uruchom urządzenie COBAS® AmpliPrep.

Część G. Zakończenie przebiegu pracy urządzenia COBAS® AmpliPrep i transfer do analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 (dotyczy wyłącznie przebiegu pracy 2 i 3 w Tabeli 1)

G1. Sprawdź, czy nie pojawiły się oflagowania lub komunikaty o błędzie.

G2. Usuń z urządzenia COBAS® AmpliPrep przetworzone próbki i kontrole znajdujące się w statywach na próbki (w przypadku analizatora COBAS® TaqMan® bez stacji dokującej) lub w statywach na nośnik K (w przypadku analizatora COBAS® TaqMan® 48), w zależności od przebiegu pracy (szczegółowe informacje przedstawiono w części G).

G3. Usuń odpady z urządzenia COBAS® AmpliPrep.

Uwaga: *Przygotowanych próbek i kontroli nie należy wystawiać na działanie światła.*

Amplifikacja i detekcja

Przygotowanie analizatora COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48

Przebieg pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48 należy rozpocząć w ciągu 120 minut od zakończenia przygotowania próbki i kontroli.

Uwaga: *Próbki i kontroli po obróbce nie zamrażać ani nie przechowywać w temperaturze 2–8°C.*

Część H. Ładowanie przygotowanych próbek

H1. W zależności od wybranej konfiguracji przebiegu pracy aparatu wykonaj odpowiednie czynności w celu przeniesienia próbek-K do analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48.

Przebieg pracy 1: Automatyczne przenoszenie nośnika K przez stację dokującą do analizatora COBAS® TaqMan®. Interwencja ręczna jest niepotrzebna.

Przebieg pracy 2: Ręczne przenoszenie próbek K w statywach na próbki do analizatora COBAS® TaqMan®.

Przebieg pracy 3: Ręczne przenoszenie nośnika K na statywie do nośników K do analizatora COBAS® TaqMan® 48. Ręczne przenoszenie nośników K do analizatora COBAS® TaqMan® 48 przy użyciu transportera nośników K.

Część I. Rozpoczęcie przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48

- I1. Uruchom analizator COBAS® TaqMan® lub analizator COBAS® TaqMan® 48 przy użyciu jednej z poniższych opcji, zależnie od wybranych konfiguracji przebiegu pracy.

Przebieg pracy 1: Żadna interwencja nie jest potrzebna.

Przebieg pracy 2: Automatyczny start pracy analizatora COBAS® TaqMan® po załadowaniu statyw/-ów próbek.

Przebieg pracy 3: Jeśli w nośniku K jest mniej niż 6 próbek K, wypełnij nośnik pustymi próbkami K. Wypełnianiem steruje oprogramowanie AMPLILINK. Otwórz pokrywę termocyklera, załaduj nośnik K i zamknij pokrywę. Rozpocznij przebieg pracy analizatora COBAS® TaqMan® 48.

Część J. Zakończenie przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48

- J1. Po zakończeniu przebiegu pracy analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48 wydrukuj raport wyników. Upewnij się, że zastosowano prawidłowy plik definicji testu i sprawdź, czy w raporcie wyników nie pojawiły się oflagowania lub komunikaty o błędzie. Próbkę oflagowaną i opatrzone komentarzami należy interpretować zgodnie z opisem podanym w części „Wyniki”. Po zatwierdzeniu dane ulegają archiwizacji.
- J2. Usuń zużyte próbki K z analizatora COBAS® TaqMan® lub analizatora COBAS® TaqMan® 48.

WYNIKI

Analizatory COBAS® TaqMan® i COBAS® TaqMan® 48 automatycznie oznaczają stężenie RNA wirusa HIV-1 w próbkach i kontrolach. **Stężenie RNA wirusa HIV-1 jest wyrażane w kp/ml lub IU/ml, w zależności od zainstalowanego TDF. Współczynnik konwersji stężenia RNA wirusa HIV-1 wyrażanego w kp/ml na stężenie w IU HIV-1/ml wynosi 0,6 kp/IU wg wytycznych międzynarodowego standardu nr 1 WHO dla RNA HIV-1 dla technik opartych na detekcji kwasów nukleinowych (WHO 1st International Standard for HIV-1 RNA for Nucleic Acid-Based Techniques [NAT]) (NIBSC 97/656)³⁷. Wspomniany współczynnik konwersji został określony z użyciem testów COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 oraz COBAS® TaqMan® HIV-1 do stosowania z zestawem High Pure System.**

Oprogramowanie AMPLILINK:

- Określa wartość progową liczby cykli (Ct) dla RNA HIV-1 oraz RNA HIV-1 QS.
- Określa stężenie RNA HIV-1 na podstawie wartości Ct dla RNA HIV-1 i RNA HIV-1 QS oraz swoistych dla danej serii współczynników kalibracji, zapisanych w kodach kreskowych kasety.
- Określa, czy obliczone i wyrażone w kp/ml wartości dla kontroli **HIV-1 L(+)**C**, v2.0**, oraz **HIV-1 H(+)**C**, v2.0**, mieszczą się w przypisanych im przedziałach.

Walidacja serii testowej — oprogramowanie AMPLILINK w wersji serii 3.3 i 3.4

Sprawdź okno wyników oprogramowania AMPLILINK lub wydruk pod kątem występowania oflagowań i komentarzy, aby się upewnić, że dana seria badań jest ważna. W przypadku zleceń dla próbek kontroli przeprowadzana jest kontrola w celu określenia, czy wartość podana w kopiach/ml lub IU/ml mieści się w określonym przedziale. Jeśli wartość podana w kopiach/ml lub IU/ml dla próbki kontroli nie mieści się w odpowiednim zakresie, generowany jest ZNACZNIK sygnalizujący błąd kontroli.

Seria testowa jest uważana za ważną, jeśli żadna z kontroli [HIV-1 L(+)C, v2.0; HIV-1 H(+)C, v2.0 i CTM (–) C] nie została opatrzona znacznikiem błęd.

Seria testowa jest nieważna, jeżeli kontrole dla testu HIV-1 zostały opatrzone którymkolwiek z poniższych oznaczeń:

Kontrola ujemna

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
NC_INVALID	Invalid	Wynik nieważny albo „ważny”, lecz nie ujemny w kierunku obecności docelowego HIV-1

Kontrola słabo dodatnia dla HIV-1, v2.0

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
LPCINVALID	Invalid	Wynik nieważny lub kontrola poza zakresem wartości.

Kontrola silnie dodatnia dla HIV-1, v2.0

Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
HPCINVALID	Invalid	Wynik nieważny lub kontrola poza zakresem wartości.

Jeśli seria testowa jest nieważna, należy ją w całości powtórzyć, łącznie z przygotowaniem próbek i kontroli oraz amplifikacją i detekcją.

Interpretacja wyników

Jeśli seria testowa jest ważna, należy sprawdzić poszczególne próbki na wydruku z wynikami w poszukiwaniu oflagowań lub komentarzy. Wyniki należy zinterpretować następująco:

- Ważna seria testowa może zawierać zarówno ważne, jak i nieważne próbki, zależnie od tego, czy poszczególne próbki zostały opatrzone oznaczeniami i/lub komentarzami.

Wyniki badania próbek interpretuje się w następujący sposób:

Wynik (miano)		Interpretacja
Target Not Detected		Wartość Ct dla HIV-1 powyżej granicy testu lub nie otrzymano wartości Ct dla HIV-1. Podać wynik jako „Nie wykryto RNA HIV-1”.
Kopie/ml	< 2.00E+01 cp/mL (osocze)	Obliczone wartości w kopiach/ml są poniżej granicy wykrywalności testu. Podać wyniki jako „Wykryto RNA HIV-1, mniej niż 20 kopii/ml RNA HIV-1” dla osocza i „Wykryto RNA HIV-1, mniej niż 738 kopii/ml RNA HIV-1” dla PSC .
	< 738 cp/mL (PSC)	
	≥ 2.00E+01 cp/mL i ≤ 1.00E+07 cp/mL (osocze)	Obliczone wyniki o wartości 20 kopii/ml lub wyższej albo o wartości 1,00E+07 kopii/ml lub niższej mieszczą się w zakresie liniowym testu w przypadku osocza.
	≥ 738 cp/mL i ≤ 1.00E+07 cp/mL (PSC)	Obliczone wyniki o wartości 738 kopii/ml lub wyższej albo o wartości 1,00E+07 kopii/ml lub niższej mieszczą się w zakresie liniowym testu w przypadku PSC .
Jednostki międzynarodowe/ml	> 1.00E+07 cp/mL (osocze i PSC)	Obliczone wartości w kopiach/ml są powyżej zakresu testu. Podać wyniki jako „Powyżej 1,00E+07 kopii RNA HIV-1/ml”. Jeśli żądane są wyniki ilościowe, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć w proporcji 1:100 ludzkim osoczem ujemnym dla HIV-1 z dodatkiem EDTA, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.
	< 3.34E+01 IU/ml (osocze)	Obliczone wartości IU/ml są poniżej granicy wykrywalności testu. Podać wyniki jako „Wykryto RNA HIV-1, mniej niż 33,4 IU RNA HIV-1/ml” w przypadku osocza.
	≥ 3.34E+01 IU/ml i ≤ 1.67E+07 IU/ml (osocze)	Obliczone wyniki o wartości 33,4 IU/ml lub wyższej albo o wartości 1,67E+07 IU/ml lub niższej mieszczą się w zakresie liniowym testu w przypadku osocza.
Jednostki międzynarodowe/ml	> 1.67E+07 IU/ml (osocze)	Obliczona wartość IU/ml przewyższa zakres testu. Podać wyniki jako „Powyżej 1,67E+07 IU RNA HIV-1/ml”. Jeśli żądane są wyniki ilościowe, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć w proporcji 1:100 ludzkim osoczem ujemnym dla HIV-1 z dodatkiem EDTA, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Uwaga: *Próbki o wynikach powyżej zakresu wartości testu, dające wynik nieważny, opatrzone oznaczeniem „QS_INVALID”, także nie powinny być opisywane jako > 1,00E+07 kp/ml lub 1,67E+07 IU/ml. Oryginalną próbkę należy rozcieńczyć HIV-1-ujemnym ludzkim osoczem z dodatkiem EDTA w stosunku 1:100, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.*

Uwaga: Wynik miana „Failed”. Interpretacja: Próbkę przygotowana w aparacie COBAS® AmpliPrep nie została przetworzona właściwie.

Uwaga: Wynik miana „Invalid”. Interpretacja: Wynik nieważny.

KONTROLA JAKOŚCI

Każda seria testowa musi zawierać jedną kontrolę **CTM (-) C**, jedną kontrolę **HIV-1 L(+)C, v2.0** oraz jedną kontrolę **HIV-1 H(+)C, v2.0**. Seria testowa jest uważana za ważną, jeśli żadna z kontroli [**HIV-1 L(+)C, v2.0**; **HIV-1 H(+)C, v2.0** i **CTM (-) C**] nie została opatrzona znacznikiem błędu.

Sprawdź, czy na wydruku znajdują się oflagowania i komentarze, aby się upewnić, że seria jest ważna.

Kontrola ujemna

Kontrola **CTM (-) C** musi dawać wynik „Target Not Detected”. Jeśli kontrola **CTM (-) C** jest oflagowana jako nieważna, cała seria testowa jest także nieważna. Należy powtórzyć cały proces (przygotowanie próbek i kontroli, amplifikację oraz detekcję). Jeśli wyniki kontroli **CTM (-) C** w powtarzanych seriach są stale nieważne, skontaktuj się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche celem uzyskania pomocy technicznej.

Kontrole dodatnie

Przypisane zakresy wartości miana kontroli **HIV-1 L(+)C, v2.0**, oraz **HIV-1 H(+)C, v2.0**, są swoiste dla każdej serii odczynników i są zapisane w kodach kreskowych kasety odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Stężenia HIV-1 RNA w kopiach/ml dla kontroli **HIV-1 L(+)C, v2.0**, oraz **HIV-1 H(+)C, v2.0**, powinny mieścić się w przypisanych im zakresach wartości miana. Jeśli jedna lub obie kontrole dodatnie są oflagowane jako nieważne, to cała seria testowa jest także nieważna. Należy powtórzyć cały proces (przygotowanie próbek i kontroli, amplifikację oraz detekcję). Jeżeli miano RNA HIV-1 dla jednej lub obu kontroli dodatnich stale mieści się poza zakresem w powtórzonych seriach, należy zwrócić się do regionalnego przedstawicielstwa firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE PROCEDURY

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.

OGRANICZENIA METODY

1. Ten test został zatwierdzony wyłącznie do badania ludzkiego osocza pobranego na EDTA jako antykoagulant. Badanie innych rodzajów próbek może dawać nieprawidłowe wyniki.
2. Poprawność działania testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, nie została sprawdzona dla próbek zawierających grupę N wirusa HIV-1 ani dla próbek zawierających wirus HIV-2.
3. Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od właściwego pobrania próbki, transportu, przechowywania oraz procedur przetwarzania.
4. Obecność enzymu AmpErase w odczynniku testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 Master Mix, zmniejsza ryzyko skażenia amplikonu. Jednak zanieczyszczenia materiałem pochodzącym z HIV-1-dodatnich kontroli i próbek klinicznych można uniknąć jedynie dzięki stosowaniu zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i uważnemu wykonywaniu procedur opisanych w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania zestawu.
5. Tego produktu powinny używać wyłącznie osoby wykwalifikowane w technikach PCR.
6. Produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku w urządzeniu COBAS® AmpliPrep oraz analizatorze COBAS® TaqMan® lub analizatorze COBAS® TaqMan® 48.
7. Mutacje w obrębie wysoko konserwatywnych regionów genomu wirusa, z którymi wiążą się primery i/lub sondy używane w teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, chociaż rzadkie, mogą spowodować niedoszacowanie ilości lub niewykrycie wirusa.
8. Detekcja RNA HIV-1 zależy od liczby obecnych w próbce cząsteczek wirusa, na którą mogą wpływać metody pobierania próbek oraz czynniki związane z pacjentem (tj. wiek, obecność objawów i/lub faza zakażenia). Chociaż swoistość kliniczna testu wynosi 99,3% (95% CI = od 98,2% do 99,8%), u osób HIV-ujemnych odnotowano pewne wyniki fałszywie dodatnie dla próbek o niskich stężeniach cząsteczek wirusa.
9. Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badanie korelacji stosowanych metod w celu określenia ilościowych różnic występujących pomiędzy nimi.

SUBSTANCJE WPŁYWAJĄCE NA WYNIK TESTU

Wykazano, że podwyższone poziomy trójglicerydów (do 3500 mg/dl), bilirubiny (do 28 mg/dl), albuminy (do 8900 mg/dl), hemoglobiny (do 900 mg/dl) i ludzkiego DNA (do 0,4 mg/dl) w próbkach, a także obecność chorób autoimmunizacyjnych lub odpowiadających im markerów immunologicznych, takich jak np. toczeń rumieniowaty układowy (SLE), reumatoidalne zapalenie stawów (RA), oraz obecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) nie wpływają na wyniki oznaczeń ilościowych RNA wirusa HIV-1 ani nie zaburzają swoistości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP7-A2, z użyciem jednego zestawu odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Wykazano, że przedstawione poniżej związki chemiczne, przebadane w stężeniach 3-krotnie wyższych niż maksymalne stężenie w osoczu (C_{max}) nie wpływają na wyniki oznaczeń ilościowych RNA HIV-1 ani nie zaburzają swoistości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Leki stosowane w zakażeniu HIV:	
Inhibitory proteazy Atazanawir Darunawir Fosamprenawir Lopinawir/Ritonawir Metanosulfonian nelfinawiru Ritonawir Sakwinawir Tipranawir	Analogi nukleozydów, inhibitory odwrotnej transkryptazy Siarczan abakawiru Didanozyna, ddI Emtrycytabina Lamiwudyna, 3TC Stawudyna, 4dT Tenofovir DF Zydowudyna
Inhibitor integrazy Raltegrawir	Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy Efawirenz Newirapina
Inhibitor wejścia Marawirok	Inhibitory fuzji Enfuvirtyd
Leki stosowane w zakażeniu HBV i/lub HCV:	
Analog nukleotydowy Dipiwoksyl adefowiru	Analog nukleozydowy Entekawir Telbiwudyna
Immunomodulatory Peginterferon α-2a Peginterferon α-2b Rybawiryna	
Preparaty do leczenia zakażeń wirusami opryszczki (Herpes):	
Analog nukleotydowy Acyklowir	Pochodna nukleotydowa Gancyklowir Chlorowodorek walgancyklowiru

OCENA SKUTECZNOŚCI W BADANIACH NIEKLINICZNYCH

Najważniejsze parametry działania testu — próbki osocza z EDTA

A. Granica wykrywalności

Granica wykrywalności dla testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, została określona przez międzynarodowy standard WHO nr 2 dla RNA HIV-1, NIBSC Code 97/650⁴², podtyp B wirusa HIV-1, rozcieńczonego w ludzkim osoczu ujemnym dla HIV-1 z dodatkiem EDTA. Granica detekcji została określona dla trzech zestawów odczynników. Dla każdego z zestawów odczynników analizie poddano po trzy serie rozcieńczeń. Łącznie przebadano około 126 powtórzeń na każde rozcieńczenie. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP17-A.

Stężenie RNA HIV-1, jakie można oznaczyć ze wskaźnikiem dodatniości powyżej 95% określonym na podstawie analizy PROBITOWEJ, wynosi 20 kp/ml lub 33 IU/ml. Wyniki dla poszczególnych zestawów wynosiły 17,7 kp/ml (95% przedział ufności: 13,7–26,9 kp/ml) dla zestawu 1, 17,0 kp/ml (95% przedział ufności: 14,0–22,6 kp/ml) dla zestawu 2 oraz 14,2 kp/ml (95% przedział ufności: 11,2–22,1 kp/ml) dla zestawu 3. Łączne wyniki dla wszystkich trzech zestawów odczynników przedstawia Tabela 3. **Współczynnik przeliczania IU/ml na kp/ml został określony z użyciem testów COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 i COBAS® TaqMan® HIV-1 do stosowania z High Pure System.**

Tabela 3
Granica wykrywalności testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Nominalne stężenie wyjściowe (RNA HIV-1 IU/ml)	Nominalne stężenie wyjściowe (kp RNA HIV-1/ml)	Liczba powtórzeń	Liczba wyników dodatnich	Odsetek wyników dodatnich
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% odsetka trafień		27,5 IU/ml (95% przedział ufności: 23,8–33,0 IU/ml) 16,5 kp/ml (95% przedział ufności: 14,3–19,8 kp/ml)		

Ponadto rozcieńczone nadsączy z hodowli komórkowych przedstawicieli podtypów A-H grupy M wirusa HIV-1 w ludzkim osoczu ujemnym dla HIV-1 z dodatkiem EDTA zostały przeanalizowane z użyciem dwóch zestawów odczynników. Dla każdego izolatu podtypu wirusa HIV-1 przebadano kilka poziomów stężeń (nominalne miana w zakresie od 10 do 75 kp/ml) w 24 powtórzeniach dla każdego zestawu odczynników. Oznaczenie stężeń nominalnych dla nadsączy z hodowli komórkowej przeprowadzono przez uśrednienie mian testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, miana testu VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) oraz testu Abbott RealTime HIV-1. Analiza odsetka trafień przedstawia odsetek wyników dodatnich powyżej 95% dla wszystkich podtypów występujących w ilości 20 kp/ml lub niższej. Łączne wyniki dla dwóch zestawów odczynników przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Weryfikacja granicy wykrywalności testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Podtyp	Oznaczenie izolatu	Najniższy poziom stężenia ≥ 95% odsetek trafień (kp/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. Precyzja

Dokładność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, określono na podstawie analizy seryjnych rozcieńczeń próbki zawierającej supernatant z hodowli komórkowej wirusa HIV-1 (podtyp B wirusa HIV-1) w ludzkim osoczu ujemnym dla HIV-1 z dodatkiem EDTA. Oznaczenie miana nadsączy z hodowli komórkowych (stężenia roztworu podstawowego) przeprowadzono metodą gwarantującą zgodność z międzynarodowym standardem WHO nr 1 dla RNA HIV-1, NIBSC Code 97/656³⁶. Przeanalizowano trzy zestawy odczynników, po 15 przebiegów pracy dla każdego z zestawu, z 6 poziomami rozcieńczeń dla każdej z prób oraz 3 powtórzeniami dla każdego z poziomów. Każda próbka przeszła pełną procedurę testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wliczając w to przygotowanie próbki, amplifikację i detekcję. Dlatego podana dokładność odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki dla każdego z zestawów odczynników oraz łączne wyniki dla trzech zestawów przedstawia Tabela 5.

Tabela 5

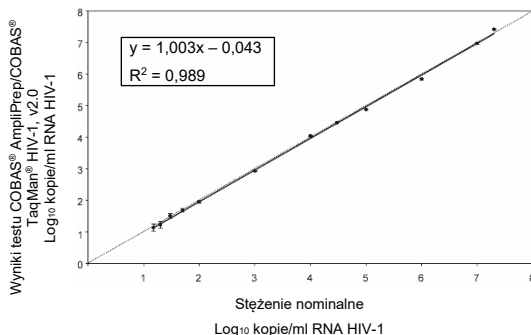
Precyzja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Miano (kp/ml)	Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie trzy serie połączone	
	Całkowite SD jako log	Całkowite SD jako log	Całkowite SD jako log	Całkowite SD jako log	Całkowity CV dla rozkładu lognormalnego (%)
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. Zakres liniowy

Stwierdzono, że test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wykazuje liniowość od 20 ($\log_{10} = 1,30$) HIV-1 RNA kp/ml do $1,0E+07$ ($\log_{10} = 7,00$) HIV-1 RNA kp/ml. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP6-A, z użyciem dwóch zestawów odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, oraz seryjnych rozcieńczeń wysokiej wartości miana próbki zawierającej nadsącz z hodowli komórkowej HIV-1 RNA (+). Przeanalizowano dwa zestawy odczynników, po 15 przebiegów pracy dla każdego z zestawu, z 12 poziomami rozcieńczeń dla każdej z prób oraz 3 powtórzeniami dla każdego z poziomów. Wyniki dla jednego z zestawów odczynników przedstawiono na rysunku 18.

Rysunek 18
Liniowość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



D. Zawartość grupy M wirusa HIV-1

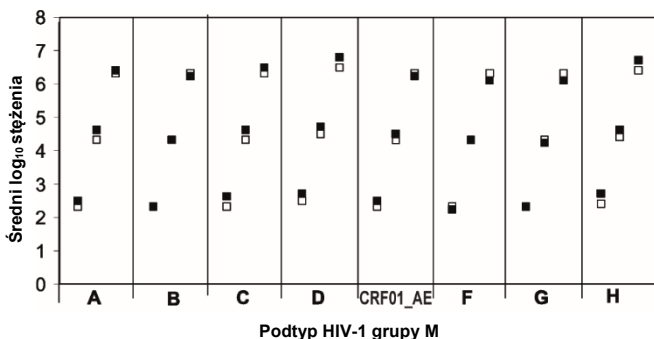
Na podstawie dywergencji nukleotydów dla grupy M wirusa HIV-1 zaproponowano podział na osiem podtypów. Podtypy te oznaczono wielkimi literami alfabetu od A do H⁴¹.

Skuteczność działania testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, dla podtypów wirusa HIV-1 oceniono na podstawie analizy materiału z hodowli przedstawicieli poszczególnych podtypów od A do H grupy M wirusa HIV-1. Oznaczenie stężeń nominalnych dla nadsączy z hodowli komórkowej przeprowadzono przez uśrednienie mian testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, miana testu VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) oraz testu Abbott RealTime HIV-1. Każdy z nadsączy z hodowli komórkowej został rozcieńczony do uzyskania stężeń nominalnych o wartościach około $2,00E+02$, $2,00E+04$ oraz $2,00E+06$ kp/ml w osoczu z dodatkiem EDTA. Uzyskane stężenia zostały poddane analizie w 10 powtórzeniach za pomocą testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, przy użyciu jednego zestawu odczynników. Średnie wartości $\log_{10}$ miana wszystkich rozcieńczeń oraz podtypów zostały porównane z odpowiednimi wartościami $\log_{10}$ nominalnego miana.

Badanie izolatów 8 podtypów wirusa HIV-1 testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wykazało równoważne wyniki dla wszystkich badanych przedstawicieli podtypów grupy M wirusa HIV-1 (Rysunek 19). Średnia wartość $\log_{10}$ stężenia wyników dla wszystkich podtypów znajdowała się w przedziale $\pm 0,3 \log_{10}$ oznaczonego stężenia wyjściowego.

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

□ Stężenie nominalne ■ Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

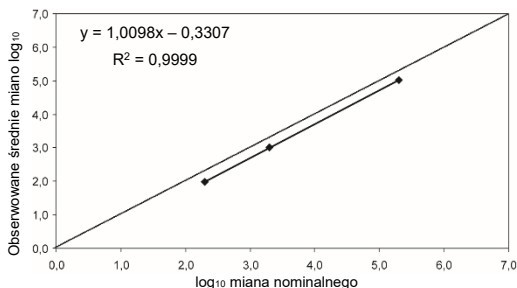


E. Wykrywalność grupy O wirusa HIV-1

Rozcieńczenia nadsącza z hodowli komórkowych przedstawicieli grupy O wirusa HIV-1 (oznaczenie izolowania MVP5180) w ludzkim osoczu z dodatkiem EDTA zostały przeanalizowane z użyciem dwóch zestawów odczynników. Przebadano kilka poziomów stężeń (nominalne miana w zakresie od 10 do 75 kp/ml) w 24 powtórzeniach dla każdego zestawu odczynników. Oznaczenie stężenia nominalnego dla nadsącza z hodowli komórkowej przeprowadzono za pomocą testu Abbott RealTime HIV-1. Analiza odsetka trafień przedstawia odsetek wyników dodatnich powyżej 95% dla wartości 20 kp/ml.

Nadsącz z hodowli komórkowej grupy O wirusa HIV-1 został rozcieńczony do uzyskania stężeń nominalnych o wartościach około 2,00E+02, 2,00E+03 i 2,00E+05 kp/ml w osoczu z dodatkiem EDTA. Uzyskane stężenia zostały poddane analizie w 10 powtórzeniach za pomocą testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, przy użyciu jednego zestawu odczynników. Średnie wartości log₁₀ miana wszystkich rozcieńczeń układały się liniowo w przedziale wartości $\pm 0,3 \log_{10}$ odpowiednich wartości log₁₀ nominalnego miana (patrz Rysunek 20).

Rysunek 20
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
Zakres liniowości podtypu O (MVP5180)



Ponadto przy użyciu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, i testu Abbott RealTime HIV-1 równolegle przetestowano 10 hodowli komórkowych oraz jedną rozcieńczoną próbkę jednego z pacjentów (11613), zawierające przedstawicieli grupy O wirusa HIV-1. Uzyskano wyniki dodatnie dla wszystkich 11 prób przeprowadzonych przy użyciu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (patrz Tabela 6). Oba testy wykazały średnią wartość $\log_{10}$ miana dla 11 próbek w przedziale wartości 0,1 $\log_{10}$.

Tabela 6
Rozpoznanie grupy O wirusa HIV-1 izolowanego
przez test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Oznaczenie izolatu	Logarytm ₁₀ miana COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0	Logarytm ₁₀ miana 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
Średnia wartość logarytmu₁₀ miana	3,78	3,69

F. Swoistość

Swoistość kliniczną testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, określono na podstawie analizy próbek osocza ujemnego dla HIV-1 z dodatkiem EDTA, pobranych od krwiodawców, przy użyciu dwóch zestawów odczynników. Łącznie przebadano 660 różnych próbek osocza z EDTA i wszystkie uzyskały ważne wyniki, ujemne wobec RNA HIV-1 w teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Na podstawie tych wyników swoistość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, wynosi 100% (dolna granica jednostronnego 95% przedziału ufności: $\geq 99,6\%$).

G. Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, określono przez dodanie do ujemnego dla HIV-1 osocza ludzkiego z dodatkiem EDTA oraz dodatniego dla HIV-1 osocza ludzkiego z dodatkiem EDTA o stężeniu $1,5E+02$ kp HIV-1/ml mikroorganizmów z hodowli (wirusy, bakterie, drożdże) lub DNA (HTLV-2) o stężeniu wyjściowym $5E+04$ kp/ml (patrz Tabela 7).

Żaden z badanych mikroorganizmów nie wykazał występowania reakcji krzyżowej z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Próbkę zawierającą HIV-1 dały wyniki miana w granicach $\pm 0,5 \log_{10}$ z kontroli dodatniej HIV-1.

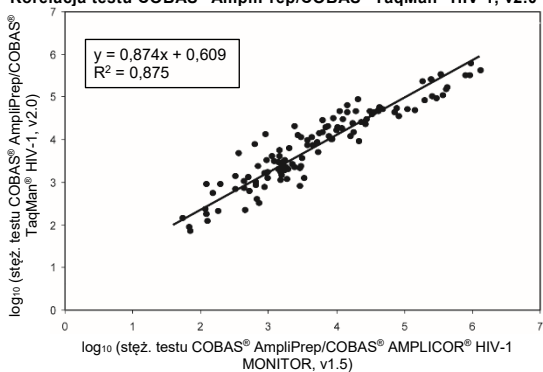
Tabela 7
Swoistość analityczna próbek

Wirus	Bakterie
<i>Adenowirus typ 5</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Wirus cytomegalii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Wirus Epsteina-Barr</i>	
<i>Ludzki wirus opryszczki typu 6</i>	
<i>Wirus opryszczki zwykłej typu 1</i>	
<i>Wirus opryszczki zwykłej typu 2</i>	
<i>Ludzki wirus T-limfotropowy typu 1</i>	
<i>Ludzki wirus T-limfotropowy typu 2</i>	
<i>Wirus grypy A</i>	
<i>Wirus zapalenia wątroby typu A</i>	
<i>Wirus zapalenia wątroby typu B</i>	
<i>Wirus zapalenia wątroby typu C</i>	

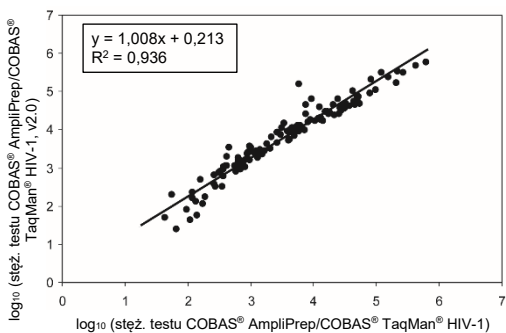
H. Korelacja metody

Działanie testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, porównano z testami COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 oraz Abbott RealTime HIV-1 poprzez analizę 92 zebranych prospektywnie, nierozcieńczonych próbek klinicznych osocza dodatniego dla HIV-1 i poprzez analizę 34 rozcieńczonych nadsączy z hodowli komórkowych wirusa. Próbkę zawierającą podtypy od A do H grupy M wirusa HIV-1, a także krążące formy rekombinacyjne (CRF) wirusa zostały przeanalizowane w dwóch odrębnych laboratoriach zewnętrznych. Za pomocą czterech testów oznaczono łącznie 126 próbek z zakresu dynamicznego testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Spośród obu wartości liniowych dwóch porównywanych testów do analizy regresji Deminga brano pod uwagę jedynie ważne pary mian (patrz rysunki od 21 do 23).

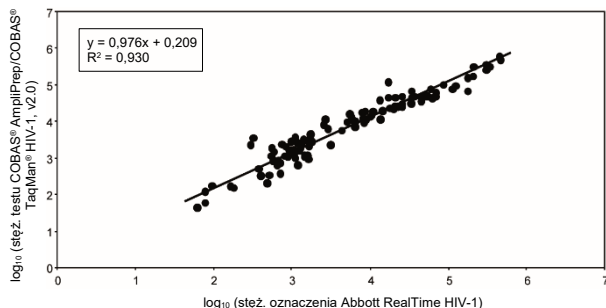
Rysunek 21
Korelacja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



Rysunek 22
Korelacja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



Rysunek 23
Korelacja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



I. Błąd systemowy

Częstość występowania błędu systemowego dla dwóch zestawów testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2 określono badając w 113 powtórzeniach z zestawem 1 i w 114 powtórzeniach z zestawem 2 próbki osocza z EDTA z dodanym wirusem HIV-1, grupa M, podtyp B. Te próbki badano przy stężeniu docelowym około 3 x granica wykrywania. Łącznie w tym badaniu (zestawy 1 i 2) uzyskano w jednym powtórzeniu ujemny wynik względem docelowego HIV-1, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0,4%.

Najważniejsze parametry działania testu — próbki w postaci wysuszonych plamek osocza PSC

A. Granica wykrywalności w osoczu na karcie do oddzielenia osocza

Granice wykrywalności w osoczu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, stosowanego z **PSC**, określono na podstawie analizy seryjnych rozcieńczeń próbki zawierającej supernatant z hodowli komórkowej wirusa HIV-1, grupa M, w ludzkiej krwi pełnej ujemnej dla wirusa HIV. Panel składający się z pięciu poziomów stężeń i kontroli ujemnej był testowany na trzech seriach **PSC** i trzech seriach odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach. Część elementu panelu o najwyższym mianie odwirowano i oznaczono miano osocza metodą bracketingu kalibratora (CBM) z użyciem testu **cobas® HIV-1** (z systemami **cobas® 6800/8800**) w międzynarodowym standardzie WHO nr 3 dla wirusa HIV-1, podtyp B grupy M wirusa HIV-1, dotyczącym przygotowania kalibratora o wysokim i niskim mianie.

Wyniki dla **PSC** przedstawia Tabela 8. Badanie wykazało, że test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 w połączeniu z kartą **PSC** pozwala wykryć RNA HIV-1 w stężeniu 737,9 kp/ml, z odsetkiem trafień wynoszącym 95% wg Probit.

Tabela 8
Granica wykrywalności testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Oznaczenie stężenia wirusa HIV-1 grupy M (kp/ml) w osoczu	Liczba wyników reaktywnych	Liczba ważnych powtórzeń testu	% wyników reaktywnych
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% odsetka trafień		737,9 kp/ml (95% przedział ufności: 614,3–938,5 kp/ml) 1230 IU/ml (1023,8–1564,2 IU/ml)	

Szacowana granica wykrywania w krwi pełnej:

Nie da się dokładnie określić odpowiadających danej próbce mian w krwi pełnej, ponieważ nie jest ona typem próbki stosowanym do oznaczania wirusii. Nie prowadzono oznaczeń próbek krwi pełnej z dodatkiem RNA HIV-1 w celu oszacowania granicy wykrywalności, ponieważ ilość RNA dodanego do takich próbek może nie odpowiadać ilości RNA w osoczu. Nawet po odwirowaniu RNA może pozostawać w kożuszku lub we frakcji komórkowej krwi pełnej. Jednak zważywszy że inne technologie, w tym wysuszone plamki krwi, korzystają z mian krwi pełnej z dodatkiem wirusa do szacowania granicy wykrywalności w krwi pełnej, można oszacować LoD w krwi pełnej dla **PSC** na podstawie przelicznika empirycznego, który uznano za uzależniony od średniego hematokrytu (45%) próbek (Tabela 9).

Wartości LOD dla krwi pełnej szacuje się na podstawie następującej zależności:

Szacunkowa LOD dla krwi pełnej = LOD dla osocza **PSC** / 1,8

Tabela 9
Szacunkowe wartości LOD dla krwi pełnej

LoD w analizie PROBIT (95% odsetek trafień)	439,0 kp/ml
95% przedział ufności	366,1–557,6 kp/ml

B. Precyzja oznaczenia na karcie do oddzielenia osocza

Precyzję testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, stosowanego z **PSC**, określono na podstawie analizy seryjnych rozcieńczeń próbki silnie dodatniej wobec HIV-1 (supernatant o wysokim mianie z hodowli komórkowej dodatniej dla RNA wirusa HIV-1) w ludzkiej krwi pełnej ujemnej dla wirusa HIV, pobranej na EDTA. Pięć poziomów rozcieńczeń zbadano w 48 powtórzeniach dla każdego poziomu i objętość przetwarzania w dwóch seriach **PSC** i w dwóch seriach odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 z dwoma systemami CAP/CTM i w wykonaniu dwóch operatorów na przestrzeni 12 dni. Każda próbka przeszła pełną procedurę przygotowania na **PSC** i testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Podana precyzja odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 10.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, w połączeniu z **PSC** wykazuje dobrą precyzję dla dwóch serii **PSC** i odczynników w zakresie stężeń od 7,38E+02 kp/ml do 1,00E+07 kp/ml.

Tabela 10
Wewnątrzlaboratoryjna precyzja testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, w połączeniu z PSC

Zmierzone stężenie (kopie/ml)	Materiał źródłowy	Pulowane SD
6,31E+06	Hodowla komórkowa	0,08
1,05E+06	Hodowla komórkowa	0,09
1,02E+05	Hodowla komórkowa	0,12
1,05E+04	Hodowla komórkowa	0,19
2,29E+03	Hodowla komórkowa	0,25

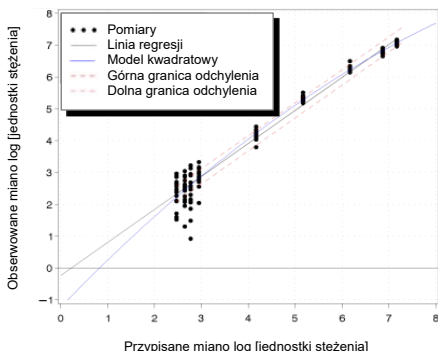
C. Zakres liniowy oznaczenia na karcie do oddzielenia osocza

Badanie liniowości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, stosowanego z **PSC**, przeprowadzono na serii rozcieńczeń, stanowiącej panel 9 elementów w zakresie liniowym stężeń HIV-1, głównie z grupy M i subtypu B. Elementy panelu przygotowano z próbki supernatantu hodowli komórek dodatnich pod względem RNA HIV-1 o wysokim mianie. Ocenę przeprowadzono według wytycznych CLSI Guideline EP06-A²⁰. Dwa zestawy **PSC** i dwa zestawy odczynników poddało analizie trzech operatorów na dwóch systemach CAP/CTM w łącznie 20 powtórzeniach na każdy poziom stężenia.

Część jednego elementu panelu odwirowano i oznaczono miano osocza metodą bracketingu kalibratora (CBM) z użyciem testu **cobas®** HIV-1 (z systemami **cobas®** 6800/8800) w międzynarodowym standardzie WHO nr 3 dla wirusa HIV-1, podtyp B grupy M wirusa HIV-1, dotyczącym przygotowania kalibratora o wysokim i niskim mianie.

W połączeniu z **PSC** test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, ma przebieg liniowy w zakresie od 7,38E+02 kp/ml do 1,00E+07 kp/ml i wykazuje bezwzględne odchylenie od lepiej pasującej regresji nieliniowej poniżej $\pm 0,16 \log_{10}$ wraz z **PSC** (parz Rysunek 24). W zakresie liniowym dokładność testu mieściła się w granicach $\pm 0,3 \log_{10}$.

Rysunek 24
Liniiowość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0,
w połączeniu z kartą do oddzielenia osocza



D. Weryfikacja podtypów dla karty do oddzielenia osocza

Wprowadzie podtyp HIV nie powinien wpływać na działanie **PSC**, jednak przeprowadzono odrębne badanie, rozcieńczając w krwi pełnej próbki hodowli HIV-1 o częstych podtypach HIV-1M (A, C i D) do uzyskania tego samego stężenia. Precyzję i dokładność określano w 12 powtórzeniach dla każdej próbki. Badanie przeprowadzono z użyciem 1 zestawu **PSC** i 1 zestawu odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Każdą próbkę krwi pełnej odwirowano i oznaczono miano osocza metodą bracketingu kalibratora (CBM) z użyciem testu **cobas®** HIV-1 (z systemami **cobas®** 6800/8800) w międzynarodowym standardzie WHO nr 3 dla wirusa HIV-1, podtyp B grupy M wirusa HIV-1, dotyczącym przygotowania kalibratora o wysokim i niskim mianie.

Wyniki przedstawia Tabela 11. Wyniki te potwierdzają, że test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, w połączeniu z **PSC** umożliwia wykrywanie wirusa HIV o podtypach HIV-1M (A, C i D).

Tabela 11
Weryfikacja testu z zastosowaniem HIV-1 z grupy M, o subtypach A, C i D

Podtyp HIV-1 grupy M	Liczba ważnych powtórzeń testu	Dokładność	Precyzja	Równoważność osocza z osoczem na PSC
Podtyp A	12	-0,02	0,09	0,17
Podtyp C	12	0,13	0,16	0,06
Podtyp D	12	0,07	0,15	0,05

E. Swoistość oznaczenia na karcie do oddzielenia osocza

Swoistość kliniczną testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, w połączeniu z **PSC**, określono na podstawie analizy próbek krwi pełnej, ujemnych dla wirusa HIV, pobranych od różnych krwiodawców na EDTA. Badanie 160 odrębnych próbek krwi pełnej pobranych na EDTA przeprowadzono z użyciem dwóch zestawów **PSC** i dwóch zestawów odczynników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Dla jednej próbki uzyskano wynik dodatni, a dla pozostałych 159 — ujemny pod względem RNA HIV-1. Na podstawie tego panelu swoistość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, w połączeniu z **PSC** wynosi 99,4% (95% przedział ufności: $\geq 97,07\%$).

F. Wskaźnik błędu systemowego przy stosowaniu karty do oddzielania osocza

Częstość występowania błędu systemowego dla testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 połączeniu z **PSC** określono badając w 100 powtórzeniach osocze z EDTA z dodanym wirusem HIV-1, grupa M podtyp B. Te próbki badano przy stężeniu docelowym około 3 x granica wykrywania. W tym badaniu nie uzyskano w żadnym powtórzeniu ujemnego wyniku względem docelowego HIV-1, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0%.

Najważniejsze parametry działania testu — próbki osocza z EDTA

Odtwarzalność

Odtwarzalność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oceniano na osoczu EDTA przy użyciu 2 różnych przebiegów pracy (systemy analizatorów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48). Badanie przeprowadzono przy użyciu paneli skonstruowanych z hodowli podstawowych dobrze scharakteryzowanego wirusa HIV-1 grupa M, podtyp B oraz osocza z EDTA, które było ujemne wobec RNA wirusa HIV-1 i przeciwciał skierowanych przeciwko wirusom HIV-1/2. Panel obejmował zakres dynamiczny testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz kluczowe punkty decyzji medycznych dotyczące przeznaczenia, opisane w dokumencie „2008 Department of Health and Human Services Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents”¹³ (Wytyczne dla wydziału zdrowia i usług zdrowotnych dotyczące stosowania preparatów przeciwretrowirusowych u dorosłych i nastolatków zakażonych wirusem HIV-1). Badanie opracowano w celu oceny kluczowych zmiennych przyczyniających się do całkowitej zmienności precyzji, w tym precyzji w ramach serii, ośrodka/aparatu, operatora, dnia/przebiegu i w obrębie przebiegu. Przeprowadzono dodatkowe analizy w celu porównania charakterystyki działania i porównawczej zmienności precyzji pomiędzy dwoma przebiegami pracy. Dwóch operatorów z każdego z 3 ośrodków wykonywało badania przez 5 dni z każdą z 3 serii zestawów odczynników przy użyciu każdego przebiegu pracy. Każdy cykl obejmował jeden zestaw kontroli (1 wysoko dodatnia, 1 nisko dodatnia i 1 ujemna) oraz 7-elementowy panel przebadany w trzech powtórzeniach (21 próbek) na aparacie COBAS® AmpliPrep. Przygotowane próbki i kontrole poddawano amplifikacji i detekcji za pomocą analizatorów COBAS® TaqMan® lub COBAS® TaqMan® 48.

Odtwarzalność oceniano wykorzystując model efektów losowych w warunkach dla (a) serii, (b) ośrodka/aparatu, (c) operatora w obrębie ośrodka/aparatu, (d) dnia/cyklu w obrębie serii, ośrodka/aparatu lub operatora; oraz (e) porcji składników w obrębie przebiegu wykorzystując analizę wyników za pomocą metody PROC MIXED i transformacji $\log_{10}$. Obliczono odsetek zmienności spowodowanej przez każdy składnik oraz współczynnik zmienności stężenia RNA wirusa HIV-1 po transformacji $\log_{10}$. Badano jedynie dane w zakresie oznaczenia ($2,00E+01$ do $1,00E+07$ kopii/ml).

Tabela 12 przedstawia zmienność oraz odchylenie standardowe precyzji całkowitej uzyskane w analizatorze COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® podczas oznaczania zmienności. Ogólnie składnik wewnątrz przebiegu powodował większą zmienność niż inne składniki.

Tabela 12

Możliwy do przypisania odsetek zmienności całkowitej,
odchylenie standardowe zmienności całkowitej oraz CV dla rozkładu normalnego
stężenia RNA wirusa HIV-1 ($\log_{10}$ kp/ml) z testów w zakresie oznaczenia

Stężenie RNA wirusa HIV-1 ($\log_{10}$ kp/ml)			Udział w zmienności całkowitej (%)					Precyzja całkowita
Oczeki- wane	Obserwo- wane (średnia)	Liczba praw- idłowych testów ¹	Seria	Ośrodek/ aparat	Operator	Dzień/ Przebieg	W obrębie przebiegu	Odchylenie standardowe (%CV dla rozkładu normalnego)
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%)

Uwaga: Wyniki w zakresie oznaczenia wynoszą od 20 kp/ml do 1,00E+07 kp/ml (1,30 $\log_{10}$ kp/ml do 7,00 $\log_{10}$ kp/ml) włącznie.

¹ Liczba testów w zakresie oznaczenia.

Wyniki uzyskane w przebiegu pracy systemu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 podsumowuje Tabela 13. Ogólnie składnik w obrębie przebiegu powodował większą zmienność niż inne składniki z wyjątkiem elementu panelu o najwyższym mianie.

Tabela 13

Możliwy do przypisania odsetek zmienności całkowitej,
odchylenie standardowe zmienności całkowitej oraz CV dla rozkładu normalnego
stężenia RNA wirusa HIV-1 ($\log_{10}$ kp/ml) z testów w zakresie oznaczenia

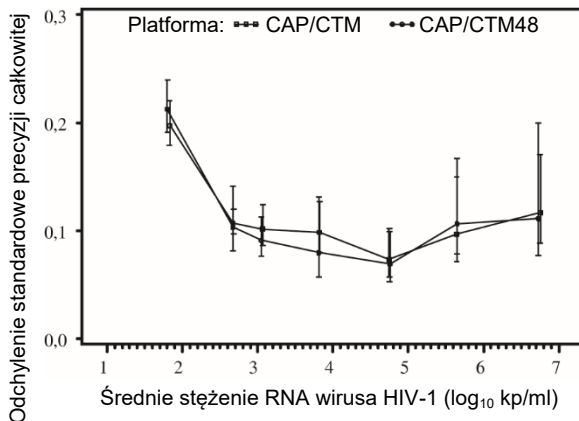
Stężenie RNA wirusa HIV-1 ($\log_{10}$ kp/ml)			Udział w zmienności całkowitej (%)					Precyzja całkowita
Oczeki- wane	Obserwo- wane (średnia)	Liczba praw- idłowych testów ¹	Seria	Ośrodek/ aparat	Operator	Dzień/ Przebieg	W obrębie przebiegu	Odchylenie standardowe (%CV dla rozkładu normalnego)
1,699	1,804	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%)

Uwaga: Wyniki w zakresie oznaczenia wynoszą od 20 kp/ml do 1,00E+07 kp/ml (1,30 $\log_{10}$ kp/ml do 7,00 $\log_{10}$ kp/ml) włącznie.

¹ Liczba testów w zakresie oznaczenia.

Wyniki przedstawione na Rysunku 25 to wykres odchylenia standardowego precyzji całkowitej z odpowiednimi przybliżonymi 95% przedziałami ufności wobec średnich $\log_{10}$ stężeń RNA wirusa HIV-1. Wyniki te wskazują porównywalną charakterystykę precyzji pomiędzy konfiguracjami systemów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) oraz COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 (CAP/CTM48).

Rysunek 25
Odchylenie standardowe precyzji całkowitej (przybliżony 95% przedział ufności)



Uwaga: Przybliżony 95% przedział ufności dla odchylenia standardowego precyzji całkowitej obliczono wyciągając pierwiastek kwadratowy z granic 95% przedziału ufności zmienności precyzji całkowitej.

Czułość kliniczna, swoistość i porównanie metod

Metodologia

Głównym celem niniejszego badania była ocena swoistości i czułości klinicznej testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 w przypadku próbek pochodzących od pacjentów HIV-ujemnych i HIV-1-dodatnich. W ramach każdej z ocen badano zarówno świeże (nigdy nie zamrażane), jak i zamrażane próbki osocza EDTA. Celami dodatkowymi było porównanie wyników i ocena zgodności procentowej wyników dodatnich oraz procentowej zgodności wyników ujemnych wyników testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 w porównaniu z wynikami uzyskanymi w testach zatwierdzonych przez FDA: COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 i COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5.

Swoistość kliniczną oceniono testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 badając 148 świeżych (nigdy nie zamrażanych) i 418 mrożonych próbek pobranych od krwiodawców mających ujemne wyniki badania przeciwciał skierowanych przeciwko wirusom HIV-1/2. Czułość kliniczna testu została oceniona za pomocą testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 dzięki badaniu 117 świeżych i 301 mrożonych próbek osocza EDTA pobranych od pacjentów zakażonych wirusem HIV-1 (próbki zamrożone wykazywały losowy rozkład pomiędzy ośrodkami badawczymi według kategorii liczby komórek CD4). Wyniki testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 porównano z uzyskanymi w testach COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 i COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5. Badania przeprowadzono w 3 ośrodkach badawczych przy użyciu 1 systemu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® na ośrodek. Użyto trzech serii odczynnika testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Metody statystyczne

Świeże i zamrożone próbki od pacjentów HIV-ujemnych i HIV-1-dodatnich badano za pomocą testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 oraz COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5. Pacjentów HIV-ujemnych można było ocenić w analizach statystycznych swoistości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jeżeli generowali oni prawidłowe wyniki testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Pacjentów HIV-1-dodatnich można było ocenić w analizach statystycznych czułości testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, jeżeli generowali oni prawidłowe wyniki testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i mieli prawidłowe wyniki testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 w zakresie liniowym oznaczenia.

Swoistość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 została obliczona jako odsetek ocenianych pacjentów HIV-ujemnych, którzy mieli wyniki Target Not Detected w teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Określono także powiązany 95% ścisły przedział ufności (CI). Czułość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 została obliczona jako odsetek ocenianych pacjentów HIV-1-dodatnich, którzy mieli wykrywalne obciążenie wirusem HIV-1 w teście COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Określono także powiązany 95% ścisły przedział ufności (CI). Porównanie metod pozwoliło ocenić wyniki testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oddzielnie na obu porównywanych platformach (testy COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 oraz COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5). Procentowe zgodności wyników dodatnich i ujemnych obliczono pomiędzy testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i każdą z porównywanych platform. Parowane próbki pacjentów HIV-1-dodatnich mieszczące się w liniowym zakresie wyników dla testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 porównywano przy użyciu wykresów rozproszenia i analizowano za pomocą regresji Deminga.

Wyniki

Do analiz swoistości i czułości klinicznej włączono łącznie 566 możliwych do oceny HIV-ujemnych i 418 HIV-1-dodatnich próbek pochodzących od pacjentów. Około 75% próbek pochodzących od pacjentów było zamrożonych, a 25% było świeżych. Podsumowanie rozkładu swoistości dla każdej platformy zawiera Tabela 14.

Tabela 14
Oceniani pacjenci HIV-1-ujemni i dodatni według typu próbki

Rodzaj próbki	Próbki ujemne wobec HIV	Próbki dodatnie wobec HIV-1
Świeże	148 (26,1%)	117 (28,0%)
Mrożone	418 (73,9%)	301 (72,0%)
Ogółem	566	418

Podsumowanie charakterystyki demograficznej 418 ocenianych próbek HIV-1 dodatnich zawiera Tabela 15. Liczby komórek CD4 u pacjentów wykazywały w przybliżeniu równomierny rozkład w kategoriach liczby komórek CD4 (< 200, 200–500, > 500 komórek/ μ l). Większość pacjentów była mężczyznami (74,2%) i w wieku od 30 do 49 lat (72,5%). Dystrybucja etniczna była porównywalna do obserwowanej dla grupy HIV-1 w Stanach Zjednoczonych³².

Tabela 15
Charakterystyka demograficzna ocenianych pacjentów HIV-1-dodatnich

Charakterystyka demograficzna	Kategoria	Pacjenci HIV-1-dodatni
Ogółem	Ogółem	418
Liczba komórek CD4 (komórki/ μ l)	<200	130 (31,1%)
	200–500	152 (36,4%)
	>500	136 (32,5%)
Rodzaj próbki	Świeże	117 (28,0%)
	Mrożone	301 (72,0%)
Płeć	Mężczyzna	310 (74,2%)
	Kobieta	108 (25,8%)
Wiek (lata)	18-29	23 (5,5%)
	30-39	100 (23,9%)
	40-49	203 (48,6%)
	50-59	74 (17,7%)
	≥ 60	18 (4,3%)
Pochodzenie etniczne	Rasa biała	129 (30,9%)
	Latynosi	46 (11,0%)
	Rasa czarna	223 (53,3%)
	Azjatyckie / Mieszkańcy wysp Pacyfiku	3 (0,7%)
	Inne	17 (4,1%)
Poddawani leczeniu przeciwretrowirusowemu	Tak	240 (57,4%)
	Nie	178 (42,6%)

Swoistość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (Tabela 16) wynosiła 99,3% (562/566; 95% CI = od 98,2% do 99,8%), 4 próbki sklasyfikowano jako fałszywie dodatnie. Trzy z tych próbek zgłoszono jako <20 kopii/ml, poniżej dolnej granicy oznaczalności testu. Pozostała jedna próbka spośród 566 zbadanych mieściła się w zakresie liniowym, ale przy bardzo

niskim mianie (28,8 kp/ml). Swoistość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 była podobna zarówno dla próbek świeżych (99,3% [147/148; 95% CI = od 96,3% do 100%]), jak i zamrożonych (99,3% [415/418; 95% CI = od 97,9% do 99,9%]).

Tabela 16
Swoistość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0

Grupa pacjentów	Test CAP/CTM HIV-1, v2.0		Całkowita liczba	Swoistość kliniczna (95% ścisły przedział ufności)
	Dodatni	Ujemny		
HIV-ujemne	4 (0,7%)	562 (99,3%)	566	99,3% (98,2%, 99,8%)

Czułość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 została zdefiniowana jako odsetek ocenianych pacjentów HIV-1-dodatnich, którzy mieli dodatni wynik testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i jest podsumowana w Tabeli 17. Czułość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wynosiła 100% (418/418; 95% CI = od 99,1% do 100%). Nie było pacjentów mających wyniki fałszywie ujemne testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Czułość kliniczną zbadano w grupie pacjentów zakażonych wirusem HIV odzwierciedlających Stany Zjednoczone pod względem płci, wieku, grupy etnicznej oraz poddawanie terapii przeciwwirusowej²⁹. Test wykazywał 100% czułość kliniczną niezależnie od wyżej wymienionych danych demograficznych, liczby komórek CD4 lub rodzaju próbki (świeża wobec zamrożonej).

Tabela 17
Czułość kliniczna testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Grupa pacjentów	Test CAP/CTM HIV-1, v2.0		Całkowita liczba	Czułość kliniczna (95% ścisły przedział ufności)
	Dodatni	Ujemny		
Dodatnie wobec HIV-1	418 (100,0%)	0 (0,0%)	418	100,0% (99,1%, 100,0%)

Porównanie metod klinicznych

Porównanie testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Porównanie wyników testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 dla 950 pacjentów kwalifikujących się do analizy zebrano w Tabeli 18. Zgodność procentowa wyników dodatnich testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wobec testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 wynosiła 99,5% (427/429; 95% CI = od 98,3% do 99,9%). Zgodność procentowa wyników ujemnych testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wobec testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 wynosiła 98,1% (511/521; 95% CI = od 96,5% do 99,1%). Występowało 10 próbek z dodatnim wynikiem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz ujemnym wynikiem testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Trzy próbki miały miana poniżej dolnej granicy oznaczalności testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, co najprawdopodobniej odzwierciedla wyższą czułość testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Trzy próbki były wynikami fałszywie dodatnimi testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 u pacjentów HIV-ujemnych zidentyfikowanych w analizie swoistości klinicznej, które także były poniżej dolnej granicy oznaczalności testu. Cztery próbki miały miana w zakresie od 24,9 kopii/ml do 158 kopii/ml i najprawdopodobniej odzwierciedlały znaną zmienność związaną z oceną ilościową niskiego miana.

Tabela 18
Porównanie testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Test CAP/CTM HIV-1, v2.0	Test CAP/CTM HIV-1		Ogółem
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	427	10	437
Ujemny	2	511	513
Ogółem	429	521	950
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% ścisłego CI)	99,5% (98,3%, 99,9%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% ścisłego CI)		98,1% (96,5%, 99,1%)	

CI = przedział ufności; 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.

Uwaga: W tej tabeli podsumowującej uwzględniono pacjentów HIV-ujemnych i HIV-1-dodatnich dających prawidłowe wyniki testów CAP/CTM HIV-1, v2.0 oraz CAP/CTM HIV-1.

Łącznie 417 sparowanych próbek HIV-1-dodatnich miało wyniki w zakresie liniowym obu oznaczeń i były oceniane w analizie porównania metod. Tabela 19 przedstawia średnią różnicę i 95% CI dla odchylenia systematycznego pomiędzy testami COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 generuje wyższe miana niż test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, z wyjątkiem wyższego ($> 5 \log_{10}$ kp/ml) i niższego zakresu ($< 2 \log_{10}$ kp/ml), gdzie generuje niższe miana (patrz tabela 19). Całkowite odchylenie systematyczne oszacowano jako 0,2591 $\log_{10}$ kopii/ml.

Tabela 19
Średnia różnica i 95% CI dla odchylenia systematycznego pomiędzy testami
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
oraz COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

Liczba sparowanych próbek HIV-1-dodatnich w zakresie liniowym obu oznaczeń = 417		
Średnia różnica ($\log_{10}$ kp/ml)	Błąd standardowy	95% CI
0,2591	0,0122	(0,235; 0,283)

CI = przedział ufności; 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.

Uwaga: W tej tabeli podsumowującej uwzględniono pacjentów HIV-1-dodatnich dających prawidłowe wyniki testów CAP/CTM HIV-1 oraz CAP/CTM HIV-1, v2.0 w zakresie liniowym każdego oznaczenia.

Wyniki analizy regresji Deminga pomiędzy wynikami testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 dla sparowanych próbek HIV-1-dodatnich w zakresie liniowym obu oznaczeń zawiera Tabela 20, a graficznie zostały przedstawione na Rysunku 26 (na tym rysunku linia przerywana wskazuje idealną zgodność pomiędzy dwoma metodami badania, tj., $y = x$).

Tabela 20

Szacunkowe wartości parametrów z analizy regresji Deminga pomiędzy testami COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

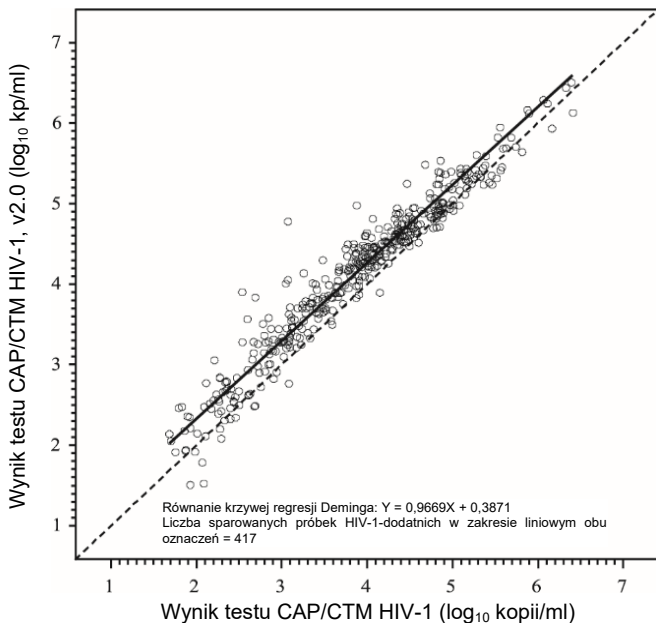
Liczba sparowanych próbek HIV-1-dodatnich w zakresie liniowym obu oznaczeń = 417				
Parametr	Szacunkowe wartości parametrów $\log_{10}$ kp/ml	Błąd standardowy	95% CI	r^2
Przecięcie	0,3871	0,0488	(0,291; 0,483)	0,9375
Nachylenie	0,9669	0,0122	(0,943; 0,991)	

CI = przedział ufności; 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.

Uwaga: W tej tabeli podsumowującej uwzględniono pacjentów HIV-1-dodatnich dających prawidłowe wyniki testów CAP/CTM HIV-1 oraz CAP/CTM HIV-1, v2.0 w zakresie liniowym każdego oznaczenia.

Rysunek 26

Analiza regresji Deminga pomiędzy testami COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1



Porównanie testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

Tabela 21 przedstawia porównanie wyników testów COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 i CA HIV-1 MONITOR, v1.5 dla 991 pacjentów kwalifikujących się do analizy. Zgodność procentowa wyników dodatnich testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wobec testu COBAS® AMPLICOR® (CA) HIV-1 MONITOR, v1.5 wynosiła 100% (419/419; 95% CI = od 99,1% do 100%). Zgodność procentowa wyników ujemnych testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wobec testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 wynosiła 97,4% (557/572; 95% CI = od 95,7% do 98,5%). Spośród 15 pacjentów z dodatnimi wynikami testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 oraz ujemnymi wynikami testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, 4 było wynikami fałszywie dodatnimi testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 od pacjentów HIV-ujemnych zidentyfikowanych w analizie swoistości klinicznej, które ponownie były poniżej dolnej granicy oznaczalności testu. Jedenaście pochodziło od pacjentów HIV-1-dodatnich z wynikami testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wahającymi się od poniżej dolnej granicy oznaczalności testu do 223 kopii/ml i ujemnymi w teście COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5.

Tabela 21
Porównanie testów CAP/CTM HIV-1, v2.0 i COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

Test CAP/CTM HIV-1, v2.0	Test CA HIV-1 MONITOR, v1.5		Ogółem
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	419	15	434
Ujemny	0	557	557
Ogółem	419	572	991
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% ścisłego CI)	100,0% (99,1%, 100,0%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% ścisłego CI)	97,4% (95,7%, 98,5%)		

CI = przedział ufności; 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.

Uwaga: W tej tabeli podsumowującej uwzględniono pacjentów HIV-ujemnych i HIV-1-dodatnich dających prawidłowe wyniki testów CAP/CTM HIV-1, v2.0 oraz CA HIV-1 MONITOR, v1.5.

Wnioski

Osocze pobrane na EDTA

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wykazuje wysokie poziomy zgodności z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 w analizach ilościowych ($r^2 = 0,9375$) oraz analizach zgodności (zgodność procentowa wyników dodatnich = 99,5%; zgodność procentowa wyników ujemnych = 98,1%). Ocenia on pod względem ilościowym próbki kliniczne 0,2591 log₁₀ kp/ml wyżej niż test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, z niższym wynikiem ilościowym przy górnym zakresie (> 5 log₁₀ kp/ml) i dolnym zakresie (< 2 log₁₀ kp/ml).

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 wykazuje wysokie poziomy zgodności z testem COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 w analizach zgodności (zgodność procentowa wyników dodatnich = 100,0%; zgodność procentowa wyników ujemnych = 97,4%).

Te wyniki testu potwierdzają użyteczność testu w zamierzonym zastosowaniu w celu oceny postępu choroby i monitorowania terapii przeciwretrowirusowej u pacjentów zakażonych wirusem HIV-1.

Porównanie próbek osocza w postaci wysuszonej plamki osocza PSC z próbkami osocza z EDTA

Porównano działanie testu przeprowadzanego na wysuszonej plamce osocza **PSC** i odwirowanym osoczu z EDTA poprzez oznaczenie 325 próbek od pacjentów zakażonych HIV-1 i 2 próbek krwi pełnej ujemnej wobec HIV z dodatkiem supernatantów kultur komórkowych. Przeanalizowano 85 próbek o mierzalnym mianie zarówno w osoczu, jak i na **PSC**. Były to próbki zawierające HIV-1 M (FP= prospektywnie zebrana krew żylna i włóscinkowa, VL= rutynowe testy wirerii, CD= próbki pozostałe po oznaczeniu CD4+, SP = próbki z dodanym wirusem), z których każdą (**PSC** i osocze) oznaczono w jednym powtórzeniu w zewnętrznym ośrodku. Miana poniżej zakresu oznaczenia ilościowego wyłączono z analizy. Regresję Deminga przeprowadzono z uwzględnieniem mian przekształconych logarytmicznie.

Rysunek 27 zawiera wyniki regresji Deminga. Symbole * i • (Rysunek 27) oznaczają pojedyncze oznaczenie.

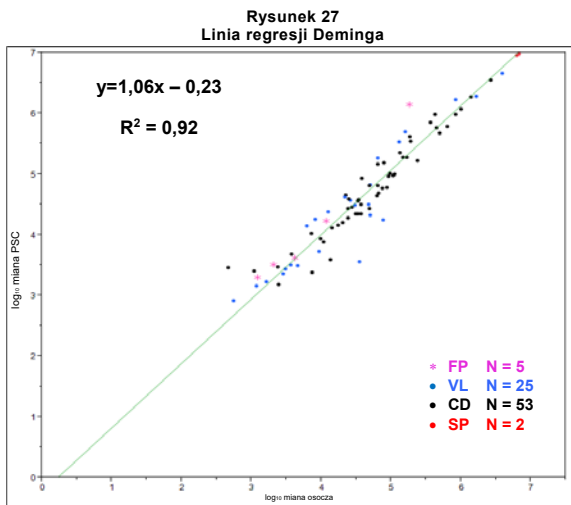


Tabela 22
Podsumowanie wyników badań równoważności matrycy

Równoważność matrycy (typu osocza)	Liczba próbek z ważnym mianem	Analiza Blanda-Altmana		Analiza regresji Deminga		
		Średnia różnica $\log_{10}$	95% CI [dolny/górny]	Nachylenie	Przecięcie	R do kwadratu
Porównanie PSC i płynnego osocza	85	0,05	[-0,01; 0,11]	1,06	-0,23	0,92

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., Lvnat, 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. Imprial. 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.

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 17.0 02/2019	Zaktualizowano numer notyfikowanej jednostki pod znakiem CE. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.
Doc Rev. 18.0 09/2019	Zaktualizowano rozdział WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA , aby uczulić użytkownika na konieczność wzrokowej oceny produktu pod kątem oznak wycieku przed użyciem i nieużywanie produktu w przypadku stwierdzenia oznak wycieku. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

Znaki towarowe i patenty

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

09/2019
Doc Rev. 18.0

(05328268001-18ENGL)
05447976001-17



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się obecnie następujące oznaczenia.



Oprogramowanie pomocnicze



Autoryzowany Przedstawiciel
we Wspólnocie Europejskiej



Arkusze kodów kreskowych



Kod partii



Zagrożenie biologiczne



Numer katalogowy



Sprawdź w instrukcji obsługi



Zawartość zestawu



Dystrybucja



Wyłącznie do oceny działania
w badaniach IVD

Rx Only

Tylko Stany Zjednoczone: prawo
federalne zezwala na sprzedaż
tego urządzenia wyłącznie
lekarzom lub na zamówienie
takiego lekarza.



Niniejszy produkt spełnia wymogi dyrektywy Wspólnoty Europejskiej 98/79/WE
dotyczącej diagnostycznych urządzeń medycznych do stosowania *in vitro*.



Wyrób do diagnostyki *in vitro*



Dolna granica przypisanego
zakresu



Wytwórca



Przechowywać z dala od światła



Zawartość wystarczająca
na $<n>$ testów



Przestrzegać zakresu temperatury



Plik definicji testów



Górna granica przypisanego
zakresu



Termin ważności



Numer pozycji handlu globalnego



Data produkcji

Linia pomocy technicznej dla klientów w Stanach Zjednoczonych 1-800-526-1247