

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test	CMV CAP	72 Tests	P/N: 04902068 190
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent	PG WR	5.1 Liters	P/N: 03587797 190

ÚČEL POUŽITÍ

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci DNA cytomegaloviru v EDTA lidské plazmě s použitím zařízení COBAS® AmpliPrep pro automatizované zpracování vzorků a analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Test může stanovit množství CMV DNA v rozsahu 150–10 000 000 kopií/ml. Jedna kopie CMV DNA (v souladu s definicí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV) je ekvivalentní 0,91 mezinárodní jednotce (IU) [1,1 kopie/IU] v souladu s První mezinárodní normou WHO pro lidský cytomegalovirus pro amplifikační metody nukleové kyseliny (NIBSC 09/162)⁴⁰.

Test je určen pro použití ve spojení s klinickými příznaky a jinými laboratorními znaky při diagnóze a léčbě CMV infekcí u pacientů s rizikem CMV chorob.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV ani není určen k plošnému vyšetřování krve či krvních derivátů na přítomnost CMV, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem CMV. Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů.

SOUHRN A PRINCIP TESTU

Lidský cytomegalovirus (HCMV nebo CMV) je lidský virový patogen ze skupiny herpetických virů, které se nacházejí v rozvinutých průmyslových společnostech i v izolovaných primitivních skupinách.^{1,2} Může se přenášet krví, orofaryngeální sekrecí, močí, cervikální a vaginální exkrecí, spermatem, mateřským mlékem, slizami a stolici.³⁻⁹ Primární infekce s CMV v imunokompetentních jedincích jsou obvykle bez symptomů a vedou k nedetekovaným latentním infekcím. Má se za to, že hlavními místy infekce jsou periferní mononukleární krvinky a endotelové buňky. U lidí zůstává vir CMV v latentních stádiích v monocytech / makrofázích.² Latentně nakažení jednotlivci mohou virus přechodně vydávat s tělesnými tekutinami, a tak nakazit ostatní. Imunokompromitovaní jedinci, včetně novorozenců, pacientů po transplantaci a pacientů s AIDS, mají vyšší riziko vývoje vážných CMV infekcí, které mohou vést k výrazně vyšší nemocnosti a úmrtnosti.¹⁰ Vážné klinické symptomy CMV choroby zahrnují CMV syndrom, retinitidu, gastroenteritidu, hepatitidu, encefalitidu, esofagitidu, enterokolitidu, pankreatitidu a pneumonii.¹⁻¹³

Laboratorní metody diagnózy rozptýlené infekce a aktivní choroby koncových orgánů následkem lidského cytomegaloviru zahrnují izolaci viru kultivací z periferních krvních leukocytů (PBL), histologii biopsií, sérologická vyšetření, měření hodnot antigenu pp65 a detekci CMV DNA s pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).¹⁴ Metody založené na testech kultur mají předpokládané špatné výsledky, doba provedení se pohybuje od 48 hodin do 3 týdnů a mají omezené použití zvláště u imunokompromitovaných pacientů. Testy antigenu pp65 jsou pracné a kvůli snižování antigenu při skladování si vyžadují zpracování krve do šesti hodin od odběru.^{15,22} Testy pp65 lze také obtížně provádět u pacientů se závažnou neutropenií.

Bylo prokázáno, že pozitivní výsledky detekce CMV DNA v plazmě za použití PCR jsou spojeny s pozitivními výsledky detekce kultur PBL a se zvýšeným rizikem vývoje systémové CMV choroby. Řada studií ukázala spojení mezi přítomností viru CMV a rizikem vývoje CMV choroby.¹⁶⁻¹⁹

Riziko CMV choroby je jasně definováno vysokou virovou náloží, což zdůrazňuje důležitou roli virových titrů při patogenezi choroby.^{18,27,30,31} Studie na pacientech po transplantaci a na pacientech s AIDS ukázaly, že PCR detekce CMV DNA je velice dobrým indikátorem dalšího vývoje choroby a klinických výsledků.^{17,23-26} Kvantifikační hodnocení CMV DNA ukázala, že vysoká virová nálož či postupně zvýšená virová nálož jsou spojeny s horší klinickou prognózou v řadě rizikových situací CMV.^{18,27,28} Kvantitativní PCR testy navíc umožňují sledování účinnosti antivirové léčby a vyhodnocení odolnosti vůči viru.^{26,29,30,32}

Použití virové nálože CMV se doporučuje v současných pokynech pro léčbu pacientů po transplantaci pro monitorování rizika vývoje CMV choroby a potřeby preventivní léčby i pro monitorování pacientů s aktivní CMV chorobou a jejich reakci na léčbu.^{21,22} Doporučuje se také jako součást diagnostických postupů pro identifikaci CMV choroby v příjemcích transplantovaných hematopoetických kmenových buněk.³³

PRINCIPY POSTUPU

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci DNA cytomegaloviru (CMV) v lidské plazmě. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV je založen na dvou hlavních procesech: (1) přípravě vzorku k izolaci CMV DNA a (2) simultánní PCR amplifikaci cílové DNA a detekci pomocí cílově specifických dvojitě značených oligonukleotidových sond.

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV umožňuje automatizovanou přípravu vzorku následovanou automatizovanou PCR amplifikací a detekcí cílové DNA a kvantifikačního standardu (QS) CMV DNA. Činidlo Master Mix obsahuje primery a sondy specifické pro CMV DNA a CMV QS DNA. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a QS specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci amplikonu CMV a CMV QS.

Stanovení množství virové CMV DNA se provádí pomocí kvantifikačního standardu CMV. Kompenzuje účinky inhibitorů a kontroluje přípravné a amplifikační procesy, čímž umožňuje přesnější kvantifikaci CMV DNA v každém vzorku. CMV QS je neinfekční DNA konstrukce, která obsahuje CMV sekvence s identickými vazebnými místy pro primer jako cílovou CMV DNA a unikátní vazebnou oblast pro sondu, která umožňuje odlišení CMV QS amplikonu od CMV cílového amplikonu.

CMV QS se přidává do každého vzorku o známém počtu kopií a prochází následujícími kroky přípravy vzorku, simultánní PCR amplifikací a detekcí štěpených, dvojitě značených oligonukleotidových detekčních sond. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vypočítává koncentraci CMV DNA v testovaném vzorku srovnáním signálu CMV se signálem CMV QS u každého vzorku a kontroly.

Volba cílové sekvence

Generická příprava vzorku založená na křemíku je používána pro zachycení CMV DNA a CMV QS DNA a definované oligonukleotidy jsou použity jako primery při amplifikaci CMV DNA a CMV QS DNA. Cílově specifická a QS specifická, dvojitě značená oligonukleotidová sonda umožňuje nezávislou identifikaci amplikonu CMV a CMV QS. Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV používá pro PCR dva amplifikační primery. Signální, dvojitě značená sonda hybridizuje s komplementárním jednoduchým či dvojitým vláknem a je rozštěpena Z05 DNA polymerázou při polymerizaci primerů.

Příprava vzorku

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV využívá automatizovanou přípravu vzorku na zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí generické vychytávací technologie založené na křemíku. Procedura zpracovává 500 μ l plazmy. CMV virové částice jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropním lytickým/vazebným pufrům, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou CMV DNA před působením DNáz v plazmě. Proteáza a známý počet molekul CMV QS DNA jsou přidány do každého vzorku spolu s lytickým činidlem a magnetickými skleněnými částicemi. Následně je směs inkubována a CMV DNA a CMV QS DNA jsou navázány na povrch skleněných částic. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny propláchnutím magnetických skleněných částic. Po separaci magnetických skleněných částic a dokončení oplachování jsou absorbované nukleové kyseliny eluovány při zvýšené teplotě pomocí vodného roztoku. Zpracovaný vzorek, obsahující uvolněnou CMV DNA a CMV QS DNA, je přidán do amplifikační směsi a přemístěn do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48.

PCR amplifikace

Amplifikační PCR reakce je prováděna pomocí termostabilního rekombinantního enzymu *druhu Thermus* Z05 DNA polymerázy (Z05). Za přítomnosti hořčičku (Mg^{2+}) a za vhodných podmínek pufru má Z05 vlastnosti DNA polymerázy.³⁴ To umožňuje amplifikační PCR reakci společně s detekcí ampikonu v reálném čase.

Zpracované vzorky se přidají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách), ve kterých probíhá PCR amplifikace. V přítomnosti Mg^{2+} a nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin-trifosfáty, polymerizuje Z05 polymeráza hybridizované primery za vzniku vlákna DNA.

Amplifikace cíle

Termocyklyer v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 zahřívá reakční směs k denaturování dvouvláknové DNA a k expozici cílové sekvence specifického primeru. Při chlazení směsi se primery připojí k cílové DNA. Z05 za přítomnosti Mg^{2+} a nadbytku deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs) prodlužuje napojené primery podél cílových templátů a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA, která se nazývá ampikon. Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství ampikonové DNA. Požadovaný počet cyklů je předem naprogramovaný v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu CMV mezi primery, celý genom CMV amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje destrukci vláken DNA obsahujících deoxyuridin,³⁵ ale přitom vynechává DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v ampikonu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze ampikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný ampikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix hořčičkem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozvětvením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec ampikonové DNA v prvním tepelném cyklickačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55 °C, tzn. v průběhu kroků tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový ampikon vzniklý během amplifikace.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®

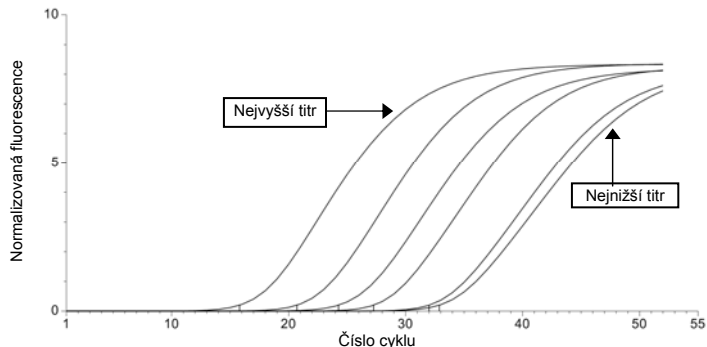
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV využívá v reálném čase běžící^{36,37} PCR technologii. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. Sonden se skládají z CMV a CMV QS-specifických oligonukleotidových sond s oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV jsou CMV a CMV QS sondy značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumícího barviva kvůli vlivu Försterova přenosu energie. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' → 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumící barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvyšuje. Amplifikace CMV DNA a CMV QS DNA je měřena nezávisle při různých vlnových délkách. Tento proces je opakován po předem určeném počtu cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci CMV DNA a CMV QS DNA. PCR cyklus, při němž růstová křivka začíná exponenciální růst, souvisí s množstvím počátečního materiálu na začátku PCR reakce.

Základy kvantifikace v testu COBAS® TaqMan®

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

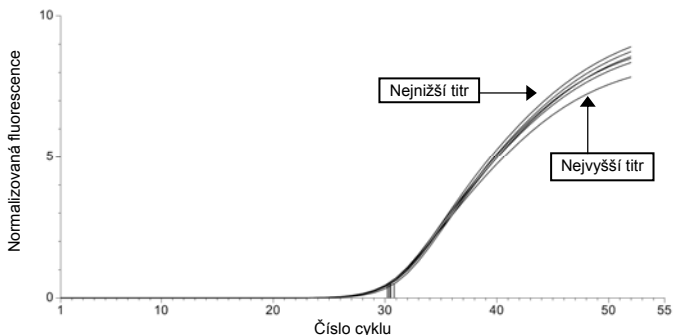
Obrázek 1 ukazuje příklad cílové růstové křivky pro sérii ředění v rozsahu 5- \log_{10} . Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

Obrázek 1
Cílové růstové křivky pro sérii ředění viru v rozsahu 5- \log_{10}



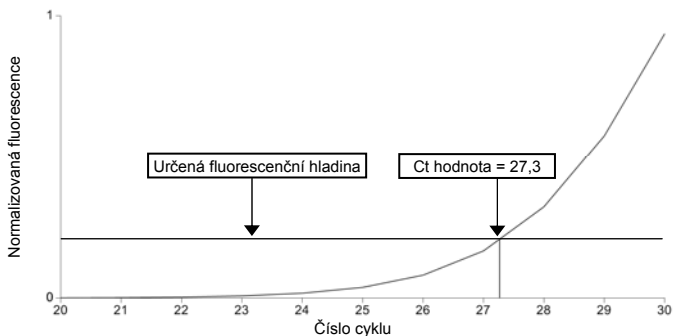
Obrázek 2 ukazuje příklad růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze sérií ředění viru zaujímající rozsah 5-log_{10} . Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je stejná bez ohledu na titer viru.

Obrázek 2
Růstové křivky kvantifikačního standardu pro sérii ředění viru v rozsahu 5-Log_{10}



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

Obrázek 3
Hodnoty fluorescence v každém cyklu jsou normalizovány pro každou růstovou křivku



Kvantifikace CMV DNA

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV stanovuje množství virové CMV DNA pomocí druhé cílové sekvence (kvantifikační standard CMV), který je do testovaného vzorku přidán o známé koncentraci. CMV QS je neinfekční DNA konstrukce, která obsahuje fragmenty CMV sekvencí s vazebnými oblastmi pro primer identickými s cílovými sekvencemi CMV. CMV QS obsahuje vazebné oblasti pro CMV primer a vytváří amplifikační produkt stejné délky a základního složení jako cílová CMV DNA. Vazebná oblast pro detekční sondu pro CMV QS byla modifikována pro odlišení amplikonu CMV QS od cílového amplikonu CMV.

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Hodnoty pro každý vzorek jsou poté korigovány na kolísání hodnot zařízením. Tyto hodnoty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Předběžné kontroly se používají pro stanovení, zda údaje CMV DNA a CMV QS DNA reprezentují sady, které jsou platné a jsou vytvářeny příznaky v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech předběžných kontrol jsou hodnoty fluorescence zpracovány pro vytvoření Ct hodnot pro CMV DNA a CMV QS DNA. Kalibrační konstanty specifické pro šarži poskytované spolu s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách CMV DNA a CMV QS DNA. Výsledné titry jsou udávány v kopiích/ml.

ČINIDLA

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test
(P/N: 04902068 190)

CMVCAP

72 testů

CMV CS1

1 x 72 testů

(Kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

Magnetické skleněné částice

Třibázový puf

0,09% azid sodný

0,1% Methylparaben

CMV CS2

1 x 72 testů

(CMV kazeta s lytickým činidlem)

Dihydrát citrátu sodného

42,5% Guanidinthiokyanát

3,6% Polydokanol

1,8% Dithiothreitol

Xn 42,5% (hm.) Guanidinthiokyanát



Zdraví škodlivý

R20/21/22-R52/53-R32: Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití. Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

S24/25-S36/37/39-S61: Zamezte styku s kůží a očima. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Viz speciální pokyny nebo bezpečnostní list.

CMV CS3**1 x 72 testů**

CMV multičinnidlová kazeta obsahuje:

Pase

1 x 3,8 ml

(Roztok proteinázy)

Tris pufr


< 0,05% EDTA

Chlorid vápenatý

Octan vápenatý

≤ 7,8% Proteináza

Glycerol

Xn  ≤ 7,8% (hm.) Proteináza

Zdraví škodlivý

R36-R42: Dráždí oči. Může vyvolat senzibilizaci při vdechování.

S23-S45: Nevdechujte páry. V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

EB

1 x 8,1 ml

(Eluční pufr)

Třibázový pufr

Hydroxid sodný

0,09% azid sodný

CMV CS4**1 x 72 testů**

CMV kazeta na činidla specifická pro test obsahuje:

CMV QS

1 x 6,2 ml

(Kvantifikační standard CMV)

Pufr Tris-HCl

EDTA

< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)

< 0,001 % neinfekční (mikrobiální) DNA plazmid s obsahem primeru

vzájícího sekvence CMV a specifickou oblast pro vazbu sondy

0,05% azid sodný

CMV MMX

1 x 3,2 ml

(CMV Master Mix)

Tricinový pufr

Octan draselný

Hydroxid draselný

< 20% dimethyl sulfoxid

Glycerol

< 0,05% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP

< 0,01% Upstream a downstream CMV primery

< 0,01 % oligonukleotidový aptamer

< 0,01% Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro

CMV a kvantifikační standard CMV

< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)

< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)

0,09% azid sodný

MgCl₂

1 x 9,8 ml

(CAP/CTM roztok hořčiku)

< 0,6% chlorid hořečnatý

0,09% azid sodný

CMV H(+)

6 x 0,65 ml

(CMV Vysoce pozitivní kontrola)

< 0,001% bakteriofág Lambda obsahující CMV DNA

Lidská plazma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2 a HIV p24 antigen nebo HIV-1 RNA, HBsAg, CMV DNA nedetekovatelné PCR metodou.

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi (3:1) směs 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu



Dráždivý

S24-S37: Zamezte styku s kůží. Používejte vhodné ochranné rukavice.

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CMV H(+)

6 x 0,65 ml

(CMV Nízce pozitivní kontrola)

< 0,001% bakteriofág Lambda obsahující CMV DNA s průměrnou koncentrací přibližně stokrát nižší než průměrná koncentrace CMV DNA v CMV H(+)

Lidská plazma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2 a HIV p24 antigen nebo HIV-1 RNA, HBsAg, CMV DNA nedetekovatelné PCR metodou.

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi (3:1) směs 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu



Dráždivý

S24-S37: Zamezte styku s kůží. Používejte vhodné ochranné rukavice.

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CMV (-) C

6 x 0,65 ml

(CMV Negativní kontrola)

Lidská plazma, nereagující podle US FDA licenčního testu na protilátky proti HCV, protilátky proti HIV-1/2 a HIV p24 antigen nebo HIV-1 RNA, HBsAg, CMV DNA nedetekovatelné PCR metodou.

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi (3:1) směs 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu



Dráždivý

S24-S37: Zamezte styku s kůží. Používejte vhodné ochranné rukavice.

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

CMV H(+) C Clip

1 x 6 klipů

(CMV Klipy s čárovým kódem pro vysoce pozitivní kontrolu)

CMV L(+) C Clip

1 x 6 klipů

(CMV Klipy s čárovým kódem pro nízce pozitivní kontrolu)

CMV (-) C Clip

1 x 6 klipů

(CMV Klipy s čárovým kódem pro negativní kontrolu)

PG WR

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

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test je určen pro použití s lidskou plazmou odebranou do antikoagulačního činidla EDTA.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V laboratorních prostorech nejzte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředek pro ochranu očí. Po manipulaci se vzorky a činidly si pečlivě umyjte ruce.
- E. **Při odebírání alikvotních podílů z kontrolních lahvíček dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální nebo nukleázové kontaminaci.**
- F. **Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a hroty na pipety bez DNázy.**
- G. Nemíchejte dohromady kontroly z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- H. Nesmíchejte kazety na činidla ani kontroly z různých souprav.
- I. Neotevírejte kazety COBAS® AmpliPrep ani nevyměňujte, nemíchejte, neodstraňujte ani nepřidávejte láhve.
- J. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu se státními a místními předpisy.
- K. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- L. Materiálové bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets, MSDS) jsou na požádání k dispozici u místního zastoupení firmy Roche.
- M. Se vzorky a kontrolami je nutno zacházet, jako by šlo o infekční materiál, za použití bezpečných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v dokumentu *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ a v dokumentu CLSI M29-A3.³⁹ Veškeré pracovní povrchy důkladně čistěte a dezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chloranu sodného v deionizované či destilované vodě.

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

- N. **POZOR: CMV (-) C, CMV L(+)**C** a CMV H(+)**C**** obsahují lidskou plazmu pocházející z lidské krve. Zdrojový materiál byl testován a byl shledán nereaktivním na přítomnost povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), protilátek proti HIV-1/2 a HCV a antigenu HIV p24 a HIV-1 RNA. Testy negativní lidské plazmy pomocí PCR metody neukázaly detekovatelnou CMV DNA. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaká infekční agens. Proto je třeba považovat všechny materiál lidského původu za potenciálně infekční. S **CMV (-) C, CMV L(+)**C** a CMV H(+)**C**** je nutno zacházet, jako by šlo o infekční materiál, za použití bezpečných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v dokumentu *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ a v dokumentu CLSI M29-A3.³⁹ Veškeré pracovní povrchy důkladně čistěte a dezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chloranu sodného v deionizované či destilované vodě.
- O. **MGP, EB, CMV QS, MgCl₂ a CMV MMX** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.

- P. Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některé činidlo rozlije, před vytřením dosucha je zředte vodou.
- Q. Dbejte na to, aby **CMV CS2** a tekutý odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep, který obsahuje guanidin thiokyanát, nepřišel do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.
- R. Při likvidaci jednotek pro zpracování vzorku (SPU – Sample Processing Unit) ze zařízení COBAS® AmpliPrep, které obsahují guanidinthiokyanát, zabraňte jakémukoli kontaktu s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Ze směsi by se mohl uvolňovat vysoce toxický plyn.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. **CMV CS1, CMV CS2, CMV CS3 a CMV CS4** uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C. Pokud jsou nepoužitá, jsou tato činidla stabilní až do vyznačeného data expirace. Po použití jsou při teplotě 2–8 °C stálá ještě 70 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší. **CMV CS1, CMV CS2, CMV CS3 a CMV CS4** je možné použít maximálně v 6 cyklech zařízení až do maximální kumulativní doby 100 hodin v zařízení COBAS® AmpliPrep. Činidla musí být mezi jednotlivými cykly uchována při teplotě 2–8 °C.
- C. **CMV H(+), CMV L(+), C a CMV (-) C** uschovávejte při teplotě 2–8 °C. Kontroly jsou stabilní až do vyznačeného data expirace. Po otevření je nutné nespotřebovanou část zlikvidovat.
- D. Skladujte klipy s čárovým kódem [**CMV H(+), C Clip, CMV L(+), C Clip a CMV (-) C Clip**] při teplotě 2–30 °C.
- E. Skladujte **PG WR** při teplotě 2–30 °C. **PG WR** je stálý až do vypršení vyznačené doby expirace. Po otevření je toto činidlo stabilní při teplotě 2–30 °C po dobu 28 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.

DODÁVANÝ MATERIÁL

- A. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test**
(P/N: 04902068 190)

CMV CAP

CMV CS1

(CMV kazeta s činidly pro magnetické skleněné částice)

CMV CS2

(CMV kazeta s lytickým činidlem)

CMV CS3

(CMV multičinidlová kazeta)

CMV CS4

(Kazeta s činidly specifickými pro test CMV)

CMV H(+), C

(CMV vysoce pozitivní kontrola)

CMV L(+), C

(CMV níže pozitivní kontrola)

CMV (-) C

(Negativní kontrola CMV)

CMV H(+), C Clip

(Klip s čárovým kódem vysoce pozitivní kontroly CMV)

CMV L(+), C Clip

(Klip s čárovým kódem níže pozitivní kontroly CMV)

CMV (-) C Clip

(Klip s čárovým kódem negativní kontroly CMV)

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

PG WR

PG WR

(Promývací činidlo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Zařízení COBAS® AmpliPrep
 - Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48
 - Doplněk: Dokovací stanice
 - Doplněk: Nástroj **cobas p 630**
 - Software AMPLILINK, verze 3.3
 - Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou
 - Příručky pro software AMPLILINK v3.3:
 - Příručka pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátozem COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® 48 nebo zařízením **cobas p 630** a softwarem AMPLILINK, verze 3.3
 - Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® (plus k volitelné dokovací stanici) pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.3
 - Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLILINK, verze 3.3
 - Aplikační příručka pro software AMPLILINK verze 3.3 při použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátozem COBAS® TaqMan®, analyzátozem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátozem COBAS® AMPLICOR
- nebo
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátozem COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® 48 a zařízením **cobas p 630**

Spotřební materiál

- Jednotky pro zpracování vzorku: SPU
- Vstupní zkumavky pro vzorek (S-zkumavky) s klipy s čárovým kódem
- Stojany s K-špičkami
- Stojany s K-zkumavkami

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Stojan na vzorky (stojan SK24)
- Stojan na činidlo
- Stojan SPU
- K-nosič
- Přemísťovač K-nosiče
- Stojan K-nosiče (vyžaduje se pouze pro použití s analyzátory COBAS® TaqMan® 48)
- Pipety s aerosolovou bariérou nebo špičkami bez DNázy s pozitivním posunem (obsah 1000 µl)*
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Vřivý mixér

* Pipety musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s pozitivním posunem bez DNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a ampliconu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

Pozn.: Tento test je validován pouze pro používání s lidskou plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.

A. Odběr vzorků

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV je určen pro použití se vzorky plazmy. Krev se odebírá do sterilních zkumavek za použití EDTA (uzávěr levandulové barvy) jako antikoagulantu a adekvátně promíchána podle pokynů výrobce zkumavky.

B. Přeprava vzorků

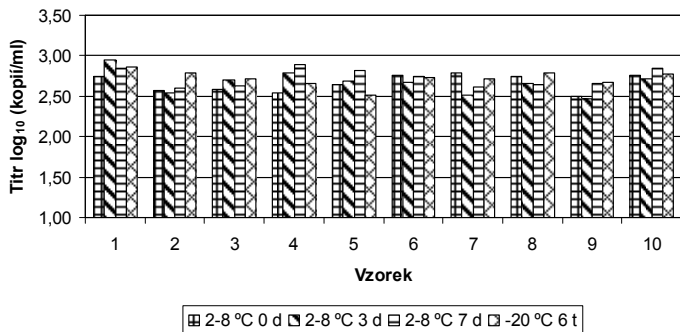
Plnou krev uchovávejte při teplotě 2–25 °C maximálně 6 hodin. Plazmu z plné krve separujte do 6 hodin od odběru, a to odstředováním za pokojové teploty po dobu 20 minut při otáčkách 800–1600 x g. Plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky.

Při přepravě plné krve nebo plazmy je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy o dopravě etiologických látek.⁴¹ Plná krev se přepravuje při teplotách 2–25 °C a centrifuguje do 6 hodin od odběru. Plazma se může přepravovat při teplotě 2–8 °C nebo ve zmrazeném stavu při teplotách ≤ –20 °C.

C. Uchovávání vzorků

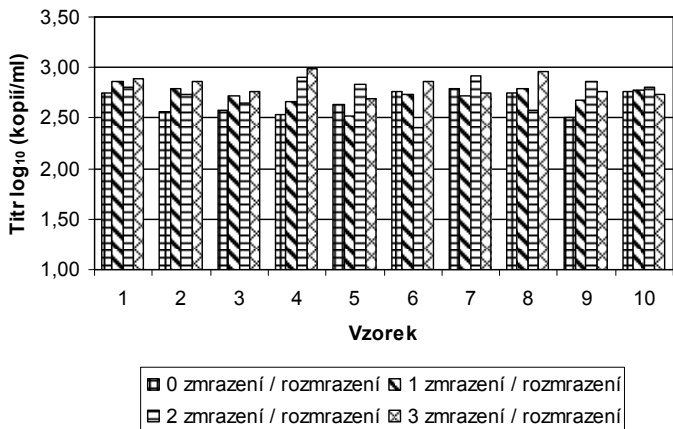
Vzorky plazmy lze při teplotě 2–8 °C uchovávat až 7 dnů. U zmrazených vzorků plazmy při teplotách ≤ –20 °C je prokázána stabilita po dobu šesti týdnů. Vzorky plazmy se doporučuje uchovávat v alikvotních podílech po 550–600 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (například Sarstedt 72.694.006). Obrázek 4 obsahuje údaje o stabilitě vzorků ze studií o stabilitě vzorků provedených pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Obrázek 4
Stabilita CMV v EDTA plazmě



Vzorky plazmy mohou být bez výrazné ztráty CMV DNA zmrazeny a rozmrazeny maximálně třikrát. Obrázek 5 obsahuje údaje ze studií o zmrazování-rozmrazování vzorků provedených pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Obrázek 5
Výsledky CMV až po třech cyklech zmrazení-rozmrazení (F-T) (v EDTA plazmě)



NÁVOD K POUŽITÍ

Pozn.: *Podrobné provozní pokyny, podrobný popis možných konfigurací, tisk výsledků a interpretace příznaků, poznámek a hlášení o chybách naleznete v (1) Příručce pro zařízení COBAS® AmpliPrep pro použití s analyzátořem COBAS® TaqMan®, COBAS® TaqMan® 48 nebo zařizením cobas p 630 a softwarem AMPLILINK, verze 3.3; (2) Příručce pro použití s analyzátořem COBAS® TaqMan® (a doplňkovou dokovací stanicí) při použití se softwarem AMPLILINK, verze 3.3; (3) Příručce pro analyzátoř COBAS® TaqMan® 48 pro použití se softwarem AMPLILINK, verze 3.3; (4) Příručce pro software AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařizením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan® a COBAS® TaqMan® 48 nebo softwarem AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařizením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a zařizením cobas p 630.*

Velikost dávky

Každá souprava obsahuje dostatek činidel pro 72 testů, které mohou být provedeny v dávkách po 12 až 24 testech. Alespoň jeden replikát **CMV (-) C**, **CMV L(+)+C** a **CMV H(+)+C** musí být zahrnut do každé dávky (viz část „Kontrola kvality“).

Pracovní postup

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

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

Připrava vzorku a kontroly

Pozn.: *Používáte-li vzorky zmrazené, ponechte je před použitím při pokojové teplotě, dokud úplně nerozmrznou, a ponechte je 3–5 sekund vířit. Kontroly by měly být před použitím vyjmuty ze skladování při teplotě 2–8 °C a vyrovnány na okolní teplotu.*

Nastavení zařizení COBAS® AmpliPrep

Část A. Údržba a plnění

- A1. Zařizení COBAS® AmpliPrep je připraveno k práci v pohotovostním režimu.
- A2. Zapněte datovou stanicí pro software AMPLILINK (**ON**). Připravte datovou stanicí dle následujícího návodu:
 - a. Přihlaste se k operačnímu systému Windows® XP.
 - b. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru AMPLILINK.
 - c. Přihlaste se k softwaru AMPLILINK zadáním přiděleného uživatelského jména a hesla.
- A3. Zkontrolujte zásobu **PG WR** pomocí obrazovky **Status** a v případě potřeby jej doplňte.
- A4. Proveďte veškerou údržbu, jak je uvedeno v záložce **Due**. Zařizení COBAS® AmpliPrep automaticky naplní systém.

Část B. Plnění kazet s činidly

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

- B1. Vložte **CMV CS1** do stojanu na činidla. Vložte **CMV CS2**, **CMV CS3** a **CMV CS4** do odděleného stojanu na činidla.
- B2. Zaveďte stojan na činidla obsahující **CMV CS1** do pozice stojanu **A** zařízení COBAS® AmpliPrep.
- B3. Zaveďte stojan na činidla obsahující **CMV CS2**, **CMV CS3** a **CMV CS4** do pozice stojanu **B**, **C**, **D** nebo **E** zařízení COBAS® AmpliPrep. Další informace viz tabulka 1.

Část C. Plnění spotřebním materiálem

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

Při použití zařízení COBAS® AmpliPrep s analyzátozem COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 je možné provést více nastavení pracovních postupů. Viz tabulka 1. Podle použitého postupu práce zaveďte příslušný počet stojanů s kazetami na činidla, stojanů se vzorky se vstupními S-zkumavkami, stojanů SPU, stojanů s K-špičkami, stojanů s K-zkumavkami a K-nosiči na stojanech pro K-nosiče do příslušných pozic stojanů zařízení COBAS® AmpliPrep (další informace viz tabulka 1).

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

Tabulka 1

Možné postupy práce pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep s analyzátelem COBAS® TaqMan® nebo analyzátelem COBAS® TaqMan® 48

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

Část D. Objednávání a ukládání vzorků

- D1. Stojany na vzorky připravte následovně: Připevněte klipy s čárovým kódem ke každé pozici stojanu na vzorky, kam je ukládán vzorek (S-zkumavka). Připevněte jeden ze specifických klipů s čárovým kódem pro kontroly [**CMV (-) C**, **CMV L(+)**C a **CMV H(+)**C] ke každé pozici stojanu na vzorky, do které budou kontroly (S-zkumavky) uloženy. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo dávky kontroly, jako je číslo dávky na kontrolních lahvíčkách v soupravě. Dbejte na to, abyste přiřadili správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím kontrolním klipem s čárovým kódem. Vložte jednu vstupní S-zkumavku do každé pozice obsahující klip s čárovým kódem.
- D2. Pomocí softwaru AMPLILINK vytvořte objednávky pro každý vzorek a kontrolu v okně **Orders** ve složce **Sample**. Zvolte příslušný testový soubor a dokončete uložením.
- D3. Přiřaďte objednávky pro vzorek a kontrolu k pozici stojanu na vzorky v okně **Orders** ve složce **Sample Rack**. Číslo stojanu na vzorky musí být pro stojan připravený v kroku D1.
- D4. Vytiskněte zprávu **Sample Rack Order** pro použití jako pracovní tabulku.
- D5. Stojany na vzorky a kontroly připravte na vyhrazeném místě pro vzorky a kontroly následovně: **Každý vzorek a každou kontrolu [CMV (-) C, CMV L(+)**C a **CMV H(+)**C] protřepejte po dobu 3 až 5 sekund. Při manipulaci se vzorky a kontrolami zabraňte kontaminaci rukavic.
- D6. Přeneste 500 µl každého vzorku a kontroly [**CMV (-) C**, **CMV L(+)**C a **CMV H(+)**C] do odpovídající vstupní S-zkumavky s čárovým kódem pomocí mikropipetoru s aerosolovou bariérou nebo špičkou bez DNázy s pozitivním posuvem. **Zabraňte přenosu částicěk a/nebo fibrinových sraženin z originálního vzorku do vstupní S-zkumavky.** Vzorky a kontroly musí být přenášeny do pozic na zkumavky, jak bylo určeno a zaznamenáno v pracovní tabulce v kroku D4. Klipy s čárovým kódem by měly mít stejné číslo dávky kontroly, jako je číslo dávky na kontrolních lahvíčkách v soupravě. Přiřaďte správnou kontrolu k pozici s odpovídajícím klipem s čárovým kódem kontroly. **Zabraňte kontaminaci horní části S-zkumavky vzorkem nebo kontrolami.**
- D7. Pro pracovní postupy 1 a 2 zaveďte stojan(y) na vzorky naplněné vstupními S-zkumavkami do pozic **F**, **G** nebo **H** v zařízení COBAS® AmpliPrep.
- D8. Pro pracovní postup 3 pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 zaveďte stojan(y) na vzorky se vstupními S-zkumavkami a K-zkumavkami (jedna pro každou vstupní S-zkumavku, zavedené v pozici vpravo vedle vstupních S-zkumavek) do pozice stojanu **F**, **G** nebo **H** zařízení COBAS® AmpliPrep.

Část E. Spuštění cyklu zařízení COBAS® AmpliPrep

- E1. Spustte zařízení COBAS® AmpliPrep pomocí softwaru AMPLILINK.

Část F. Konec cyklu zařízení COBAS® AmpliPrep a přesun do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 (pouze pro pracovní postup 2 a 3)

- F1. Zkontrolujte příznaky a chybová hlášení.
- F2. Vyjměte zpracované vzorky a kontroly ze zařízení COBAS® AmpliPrep na stojanech na vzorky (pro analyzátor COBAS® TaqMan® bez dokovací stanice) nebo na stojanech pro K-nosiče (pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48), v závislosti na postupu práce (další podrobnosti viz Část G).
- F3. Odstraňte odpad ze zařízení COBAS® AmpliPrep.

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

Amplifikace a detekce

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

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

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

Část G. Plnění zpracovaných vzorků

G1. V závislosti na zvoleném pracovním postupu proveďte odpovídající kroky pro přemístění K-zkumavek do analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48:

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

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

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

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

H1. Spustíte analyzátor COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 jednou z možností uvedených níže v závislosti na použitém pracovním postupu:

Pracovní postup 1: Není nutný žádný zásah.

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

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

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

I1. Po dokončení cyklu analyzátoru COBAS® TaqMan® nebo COBAS® TaqMan® 48 vytiskněte výsledkový protokol. Zkontrolujte příznaky a chybová hlášení ve výsledkovém protokolu. Vzorky se záložkami a komentáři jsou interpretovány tak, jak je popsáno v části „Výsledky“. Po odsouhlasení uložte data do archívu.

I2. Vyměňte použité K-zkumavky z COBAS® TaqMan® nebo z analyzátoru COBAS® TaqMan® 48.

VÝSLEDKY

Analyzátor COBAS® TaqMan® nebo analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje koncentrace CMV DNA pro vzorky a kontroly. **Koncentrace CMV DNA je vyjádřena v kopiích/ml. Konverzní faktor pro CMV DNA mezi kopiemi/ml (v souladu s definicí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV) a mezinárodními jednotkami (IU)/ml je 1,1 kopie/IU [0,9 IU/kopii] v souladu s První mezinárodní normou WHO pro lidský cytomegalovirus pro amplifikační metody nukleové kyseliny (NIBSC 09/162)⁴⁰.** Tento konverzní faktor mezi kopiemi a IU se může pro jiné testy CMV DNA lišit.

Software AMPLILINK:

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

Validace cyklu – AMPLILINK, verze 3.3

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

Šarže je platnou v případě, že se neobjeví žádný indikátor pro žádnou kontrolu [**CMV (-)** C, **CMV L(+)**C a **CMV H(+)**C].

Šarže není platná, pokud se u CMV kontrol objeví některý z následujících indikátorů.

Negativní kontrola

Příznak	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo „platný“ (valid) výsledek, který nebyl negativní pro cílovou CMV

CMV Nízce pozitivní kontrola

Příznak	Výsledek	Interpretace
LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

CMV Vysoce pozitivní kontrola

Příznak	Výsledek	Interpretace
HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

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

Interpretace výsledků

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

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

Výsledky vzorků se interpretují takto:

Výsledek titru	Interpretace
Target Not Detected	Výsledky nahlaste jako „CMV DNA nedetekována“.
<1.50E+02 cp/mL	Vypočtená hodnota kopií/ml je pod kvantifikačním limitem testu. Výsledky uvádějte jako „CMV DNA detekována, méně než 150 CMV DNA kopií/ml“.
≥1.50E+02 cp/mL a ≤1.00E+07 cp/mL	Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 150 kopií/ml a menší než nebo rovny 1,00E+07 kopií/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy.
>1.00E+07 cp/mL	Vypočtená hodnota kopií/ml je nad rozsahem analýzy. Označte výsledky jako „vyšší než 1,00E+07 CMV DNA kopií/ml“. Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, měl by být originální vzorek rozředěn CMV-negativní lidskou EDTA plazmou a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

Pozn.: *Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 1,00E+07 kopií/ml. Originální vzorek je nutné rozředit EDTA plazmou negativní na CMV a test by měl být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.*

Pozn.: *Výsledek „Failed“. Interpretace: Vzorek nebyl správně zpracován.*

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

KONTROLA KVALITY

Jeden replikát každé negativní kontroly COBAS® TaqMan® CMV níže pozitivní kontroly a CMV vysoce pozitivní kontroly musí být zahrnut do každé dávky testů. Šarže je platnou v případě, že se neobjeví žádný indikátor pro žádnou kontrolu [CMV (-) C, CMV L(+)**C** a CMV H(+)**C**].

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

Negativní kontrola

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

Pozitivní kontroly

Přijatelná rozmezí titrů **CMV L(+)**C**** a **CMV H(+)**C**** jsou uvedena na čárových kódech kazety s činidly pro test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

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

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

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

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

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

INTERFERENČNÍ LÁTKY

Bylo prokázáno, že zvýšené hodnoty triglyceridů (až do 3300 mg/dl), konjugovaného bilirubinu (až do 20 mg/dl), nekonjugovaného bilirubinu (až do 20 mg/dl), hemoglobinu (až do 200 mg/dl) a lidské DNA (až do 0,4 mg/dl) ve vzorcích či přítomnost autoimunní choroby či příslušných markerů, jako jsou Systémový lupus erythematoses (SLE), Revmatoidní artritida (RA) a Antinukleární protilátky (ANA), neinterferují s kvantifikací CMV DNA či neovlivňují specifitu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. Hodnocení bylo provedeno v souladu s Pokyny CLSI EP7-A2⁴¹ za použití jedné sady činidel testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.

Následující složky léčiv testované třikrát při maximální plazmatické hladině (Cmax) nevykázaly interferenci s kvantifikací CMV DNA nebo vliv na specifitu testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV:

Imunosupresant Azathioprin Cyklosporin Mykofenolát mofetil Mykofenolát sodný Sirolimus Takrolimus Everolimus Prednison	Antibiotikum Sulfamethoxazol Trimethoprim Cefotetan Piperacilin Tazobaktam sodný Klavulanát draselný Ticarcillin sodný Vancomycin
Anti-CMV Gancyklovir Valgancyklovir Cidofovir Foscarnet	Antifungální Fluconazole

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Mez detekce

Mez detekce testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byla určena prostřednictvím testů CMV DNA-pozitivních vzorků a RMS CMV sekundárních standard zředěných v CMV-negativní lidské EDTA plazmě. Panel 2 CMV zdrojových materiálů byl připraven jako 6 nezávislých zředěných řad do 6 samostatných jednotek CMV-negativní EDTA plazmy dárců. Řada ředění CMV DNA-pozitivních klinických vzorků měla 6 úrovní (47, 93, 140, 186, 280 a 373 kopií/ml); řada ředění RMS CMV sekundárních standard měla 6 úrovní (50, 100, 150, 200, 300 a 400 kopií/ml). Po kombinaci replikátů z panelů připravených z CMV DNA-pozitivního vzorku a RMS CMV sekundárních standard bylo na každém stupni koncentrace testováno alespoň 208 replikátů. Mez detekce byla určena s použitím 3 sad činidel a všech 3 pracovních postupů (COBAS® AmpliPrep ve spojení s COBAS® TaqMan® COBAS® AmpliPrep v kombinaci s COBAS® TaqMan® a COBAS® AmpliPrep v kombinaci s COBAS® TaqMan® 48). Vyhodnocení proběhlo v souladu s Pokyny CLSI EP17-A, Protokoly pro určení mezí detekce a kvantifikace; Schválené pokyny.⁴²

Koncentrace CMV DNA, kterou lze detekovat s pravděpodobností větší než 95 % v souladu s Analýzou PROBIT, je 56 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 50–66 IU/ml) nebo 61 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 55–72 kopií/ml). Kombinované výsledky všech 3 šarží činidel jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2
Detekční mez a analýza PROBIT testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV s použitím vzorku a RMS CMV sekundární standard

Nominální vstup (CMV DNA IU/ml)		Nominální vstup (CMV DNA kopie/ml)		Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra pozitivivity
RMS CMV sekundární standard	Klinický vzorek	RMS CMV sekundární standard	Klinický vzorek			
364	339	400	373	208	208	100%
273	255	300	280	210	210	100%
182	169	200	186	209	209	100%
137	127	150	140	210	210	100%
91	85	100	93	210	209	99,50%
46	43	50	47	210	188	89,50%
0	0	0	0	210	0	0%
PROBIT 95% úspěšnost detekce				56 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 50–66 IU/ml) 61 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 55–72 kopií /ml)		

B. Přesnost

Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byla určena analýzou 8členného panelu. Panel byl připraven s použitím CMV DNA-positivních vzorků s nižšími hodnotami dynamického rozsahu a, vzhledem k nedostupnosti materiálu s velice vysokým titrem, zředěním kultury CMV (kmen AD169) pro střední a vyšší hodnoty dynamického rozsahu. Oba zdrojové materiály byly zředěny v CMV-negativní EDTA plazmě. 8členný panel pokrýval rozsah od 2,00E+02 CMV DNA kopií/ml do 1,00E+07 CMV DNA kopií/ml.

Každý člen panelu byl testován s 2 replikáty na cyklus, se 2 cykly za den, minimálně po dobu 12 dnů a se 2 pracovními postupy (COBAS® AmpliPrep ve spojení s COBAS® TaqMan® a COBAS® AmpliPrep ve spojení s COBAS® TaqMan® 48), s celkově 96 replikáty na člena panelu rovnoměrně rozdělenými do 3 sad, 4 systémů COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® a alespoň se 2 členy obsluhy. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Výsledky pro každou šarží činidel a pro kombinaci všech 3 šarží činidel jsou zobrazeny v tabulce 3.

Tabulka 3
Přesnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV

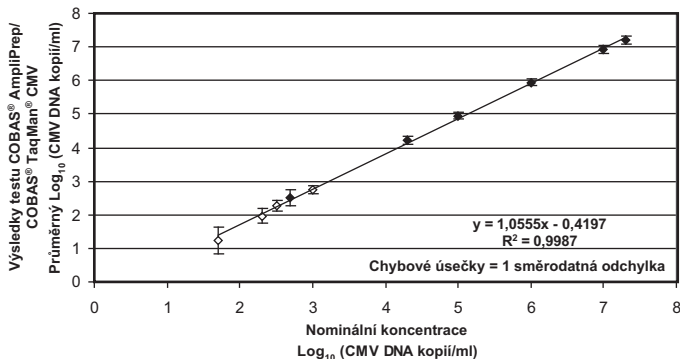
Titř (kopie/ml)	Šarže 1		Šarže 2		Šarže 3		Kombinace všech tří šarží		
	N	Celková směrodatná odchylka v Log ₁₀	N	Celková směrodatná odchylka v Log ₁₀	N	Celková směrodatná odchylka v Log ₁₀	N	Celková směrodatná odchylka v Log ₁₀	Celkový variační koeficient (%)
Kultivovaný CMV (kmen AD169)									
1,00E+07	32	0,10	32	0,08	32	0,12	96	0,12	28%
1,00E+06	32	0,10	32	0,05	32	0,07	96	0,09	20%
1,00E+05	32	0,10	32	0,08	32	0,10	96	0,10	24%
2,00E+04	32	0,14	32	0,15	32	0,08	96	0,13	30%
5,00E+02	32	0,22	32	0,23	32	0,26	96	0,24	59%
Vzorek									
1,00E+03	32	0,11	32	0,12	32	0,10	96	0,12	29%
3,20E+02	32	0,17	32	0,16	32	0,13	96	0,16	39%
2,00E+02	32	0,21	32	0,20	32	0,20	96	0,21	53%

C. Lineární rozmezí

Lineární rozmezí testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV bylo určeno analýzou 10členného panelu. Panel byl připraven s použitím CMV DNA-pozitivních vzorků s nižšími hodnotami dynamického rozsahu a, vzhledem k nedostupnosti klinického materiálu s velice vysokým titrem, zředěním kultury CMV (kmen AD169) pro střední a vyšší hodnoty dynamického rozsahu. Oba zdrojové materiály byly zředěny v CMV-negativní EDTA plazmě. 10členný panel pokrýval rozsah od 5,00E+01 CMV DNA kopií/ml do 2,00E+07 CMV DNA kopií/ml.

Každý člen panelu byl testován s 2 replikáty na cyklus, se 2 cykly za den, minimálně po dobu 12 dnů a se 2 pracovními postupy (COBAS® AmpliPrep ve spojení s COBAS® TaqMan® a COBAS® AmpliPrep ve spojení s COBAS® TaqMan® 48), s celkově 96 replikáty na člena panelu rovnoměrně rozdělenými do 3 sad, 4 systémů COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® a alespoň 2 členy obsluhy. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Jak lze vidět na Obrázku 6, na základě CLSI EP6-A, test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byl lineární od 5,0E+01 CMV DNA kopií/ml do 2,0E+07 CMV DNA kopií/ml. Na základě spodní kvantifikační meze 1,5E+02 CMV DNA kopií/ml je lineární rozsah od 1,5E+02 CMV DNA kopií/ml do 1,0E+07 CMV DNA kopií/ml.

Tabulka 6
Lineárnost testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV



Pozn.: Prázdné a vyplněné symboly reprezentují průměrné hodnoty títů Log₁₀ pro ředění klinických vzorků a kultur CMV kmenu AD169.

D. Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV s anti-CMV IgG negativními vzorky

Výsledek testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byl určen se 2 šaržemi činidel analýzou anti-CMV IgG-negativní EDTA plazmy vzorků od příjemců renálních aloimplantátů, kde byl před přijetím ledviny donor (+) / příjemce (-) v CMV sérologii. Sto padesát jedna (151) ze 157 EDTA plazma vzorků od 156 pacientů vedlo k negativním výsledkům pro CMV DNA v testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. Pro 6 CMV DNA pozitivních výsledků, další testy průběžně odebraných vzorků stejných pacientů indikovaly, že pacienti měli dřívější či následnou CMV infekci. Nezávislý PCR test CMV navíc potvrdil přítomnost CMV DNA v 5 ze 6 nesouhlasných výsledků. Jako výsledek rozlišovacích testů, 151 ze 152 CMV IgG seronegativních vzorků bylo negativních na přítomnost CMV DNA, vedoucí k přesnosti 99,3 % (95% interval spolehlivosti: 96,4% - 100,0%).

E. Analytická specifita

Analytická specifita testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byla vyhodnocena přidáním kultivovaných organismů (virů, bakterií, hub) s vstupní koncentrací 1,0E+06 částic/ml do CMV-negativní lidské EDTA plazmy a do CMV-pozitivní EDTA plazmy při 7,5E+02 kopiích/ml CMV (viz tabulka 4).

Žádný z testovaných organismů nevykázal křížovou reakci s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV. CMV-pozitivní vzorky měly výsledky titru do $\pm 0,3 \text{ Log}_{10}$ od CMV-pozitivní kontroly.

Tabulka 4
Analytická specifita vzorků

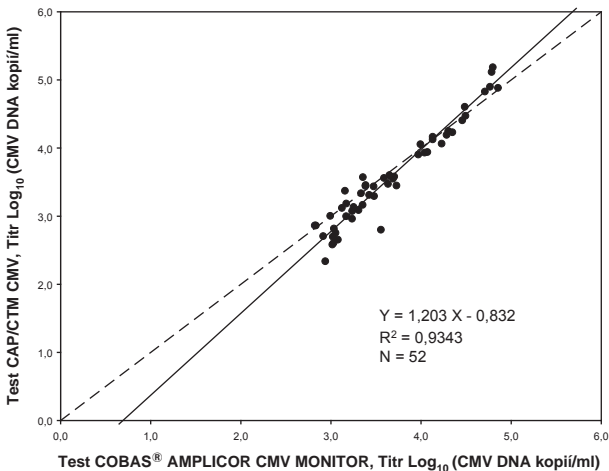
<p><u>Lidské herpetické viry</u></p> <p>Herpes simplex virus typ 1 Herpes simplex virus typ 2 Varicella-zoster virus Epstein-Barr virus Lidský herpetický virus 6 Lidský herpetický virus 7 Lidský herpetický virus 8</p>	<p><u>Další viry</u></p> <p>BK polyomavirus JC polyomavirus Virus hepatitidy A Virus hepatitidy B Virus hepatitidy C HIV typ 1 Adenovirus 5 Parvovirus B19</p>
<p><u>Baktérie</u></p> <p><i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i></p>	<p><u>Houby</u></p> <p><i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus</i></p>

F. Porovnání testu COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR a testu LightCycler® CMV Quant

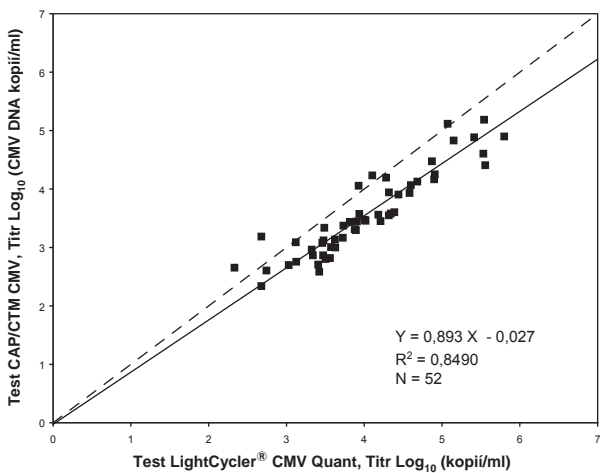
Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byly porovnány s testem COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR pomocí analýzy 52 prospektivně odebraných nezředěných CMV pozitivních klinických vzorků. Pouze platné páry titrů v obou lineárních rozmezích dvou porovnávaných testů byly zařazeny do Demingovy regresní analýzy (viz obrázek 7).

Výsledky testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV byly porovnány s testem LightCycler® CMV Quant pomocí analýzy 52 prospektivně odebraných nezředěných CMV pozitivních klinických vzorků. Pouze platné páry titrů v obou lineárních rozmezích dvou porovnávaných testů byly zařazeny do Demingovy regresní analýzy (viz obrázek 8).

Obrázek 7
Korelace testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV
a testu COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR



Obrázek 8
Korelace mezi testem COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] CMV
a testem LightCycler[®] CMV Quant



LITERATURA

1. Griffiths PD. 2000. Cytomegalovirus. In Principles and Practice of Clinical Virology. eds. Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E. and Pattison, J.R. John Wiley and Sons, London. 79-116.
2. Pass R.F. 2001. Cytomegalovirus. In: Fields Virology. eds. Knipe, D., Howley, P. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2675-2706.
3. Kapranos N., Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. 2003. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertility and Sterility* **79**:48-52.
4. Forbes BA. 1989. Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clinical Microbiological Reviews* **2**:204-216.
5. Numazaki, K. 1997. Human cytomegalovirus infection of breast milk. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **18**:2:91-98.
6. Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP. 1998. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **17**:55-53.
7. Souza IE, Nicholson D, Matthey S, et al. 1994. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by polymerase chain reaction and a nonradioactive probe. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* **20**:13-19.
8. Alford CA, Brill WJ. 1990. Cytomegalovirus. In: *Virology*, Vol. 2, 2nd ed., eds. Fields, B.N. Knipe, D.M. Raven Press, New York, NY. 1981-2010.
9. Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, et al. 2003. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics*. **111**:1333-6.
10. Jordan MC. 1983. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Reviews in Infectious Diseases* **5**:205-215.
11. Drew WL. 1989. Other virus infections in AIDS: I: Cytomegalovirus. *Immunology and Serology* **44**:507-534.
12. Drew WL. 1992. Nonpulmonary manifestations of Cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Review* **5**:204-210.
13. Mocarski ES, Courcelle CT. 2001. Cytomegaloviruses and their replication. In: *Fields Virology*. eds. Knipe D and Howley P. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2629-2674.
14. Fedorko DP, Yan SS. 2002. Recent advances in laboratory diagnosis of human Cytomegalovirus infection. *Clinical and Immunological Reviews* **2**:155-167.
15. Schafer P, Tenschert W, Gutensohn K, Laufs R. Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1997 **35**: 741-744.
16. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, et al. 1997. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *AIDS* **11**:889-893.
17. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. 1998. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplantation* **21**:597-605.
18. Hassan-Walker AF, Kidd IM, Sabin C, et al. 1999. Quantity of human cytomegalovirus (CMV) DNAemia as a risk factor for CMV disease in renal allograft recipients: Relationship with donor/recipient CMV serostatus, receipt of augmented methylprednisolone and antithymocyte globulin (ATG). *Journal of Medical Virology* **58**:182-187.
19. Sanchez JL, Kruger RM, Paranjothi S, et al. 2001. Relationship of cytomegalovirus viral load in blood to pneumonitis in lung transplant recipients. *Transplantation* 2001 **72**:733-735.

20. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, Covington E, Alecock E; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/- transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 May; **5(5)**:1065-701
21. Griffiths P, Whitley R, Snyderman DR, Singh N, Boeckh M; International Herpes Management Forum. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes*. 2008 Oct; **15(1)**:4-12.
22. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, Allen U, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010 Apr 15; **89(7)**:779-95.
23. Marenzi, R., Cinque, P., Ceresa, D., et al. 1996. Serum polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA for monitoring ganciclovir treatment in AIDS patients. *Scandinavian Journal of Infectious Disease* **28**:347-351.
24. Rasmussen, L., Zipeto, D., Wolitz, R.A., et al. 1997. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *Journal of Infectious Disease* **176**:1146-1155.
25. Shinkai M, Bozzette SA, Powderly W, et al. 1997. Utility of urine and leucocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. *Journal of Infectious Disease* **175**:3029308.
26. Spector SA, Wong R, Hsia K, et al. 1998. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *Journal of Clinical Investigation* **101**:497-502.
27. Cope AV, Sweny P, Sabin C, et al. 1997. Quantity of cytomegalovirus viremia is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Journal of Medical Virology* **52**:200-205.
28. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. 1998. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplantation* **21**:579-605.
29. Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., et al. 1991. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* **338**:1170-1172.
30. Bowen EF, Wilson P, Cope A. et al. 1996. Cytomegalovirus retinitis in AIDS patients: influence of cytomegalovirus load on response to ganciclovir, time to recurrence and survival. *AIDS* **10**:1515-1520.
31. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, Landini MP, Faldella G. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics*. 2006 Jan; **117(1)**:e76-83.
32. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant*. 2008 Mar-Apr; **22(2)**:162-170.
33. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, Styczynski J, Ward K; European Conference on Infections in Leukemia. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug; **42(4)**:227-240.
34. Smith ES, Li AK, Wang AM, Gelfand DH, Myers TM. 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.
35. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
36. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.

37. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
38. Richmond JY, McKinney RW. 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. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. 2010 Collaborative Study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.
41. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations, 41st Edition*. 2000. 704 pp.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interference Testing in Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI Document EP7-A2. CSLI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. CLSI Document EP17-A [ISBN 1-56238-551-8]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.

Informace k revizi dokumentuDoc Rev. 2.0
03/2011

První publikace.

Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
Člen Roche Group

Distributed by

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, SwitzerlandRoche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, GermanyRoche Diagnostics SL
Avda Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, SpainRoche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguaraé, Building 10
05321-010 São Paulo, SP BrazilRoche 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, FranceDistributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, ItalyDistribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILINK, COBAS, COBAS P, AMPLIPREP a TAQMAN jsou ochranné známky společnosti Roche.

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

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare Bio-Sciences Corp. a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společností Roche pouze za účelem výzkumu a jako součást diagnostických sad *in vitro*. Jakékoliv použití takových sad pro jiné účely než pro výzkum nebo *in vitro* diagnostiku vyžaduje poskytnutí sublicence od společnosti GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, U.S.A. a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.

© 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

3/2011

(04898362001-02ENGL)

Doc Rev. 2.0

04898362041-02

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim