



# COBAS® TaqMan HIV-1 Test

## Určené na používanie so systémom High Pure

### URČENÉ NA DIAGNOSTICKÉ *IN VITRO* POUŽITIE.

COBAS TaqMan HIV-1 Test

HIV-1 HPS

48 Tests P/N: 03501752 190

High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

48 Tests P/N: 03502295 001

#### PLÁNOVANÉ POUŽÍVANIE

Test COBAS TaqMan HIV-1 Test, ktorý je určený na používanie s High Pure System (HPS) je *in vitro* amplifikačný test kyseliny nukleovej, určený na kvantifikáciu RNA vírusu HIV-1 v ľudskej EDTA plazme pomocou sady High Pure System Viral Nucleic Acid Kit pre manuálnu prípravu vzorky a analyzátora COBAS TaqMan 48 Analyzer pre automatickú amplifikáciu a detekciu. Test dokáže kvantifikovať HIV-1 RNA v koncentračnom rozsahu 40–10 000 000 kópií/ml. Jedna kópia HIV-1 RNA je ekvivalentná s  $1,64 \pm 0,1$  IU (vychádzajúc z normatívneho štandardu WHO (NIBSC 97/656)).

Test sa má používať v súčinnosti s klinickou prezentáciou a inými laboratórnymi markermi vývoja ochorenia na klinickú správu pacientov infikovaných HIV-1. Test sa dá používať na hodnotenie prognózy pacienta pomocou merania úvodnej úrovne HIV-1 RNA alebo na monitorovanie vplyvov antiretrovírusovej terapie pomocou merania zmien úrovne HIV-1 RNA v plazme počas antiretrovírusovej liečby. Úrovně HIV-1 RNA merané reakciou reťazca polymerázy (PCR) sa použili ako jedny z náhradných markerov v zrýchlenom schvaľovacom procese FDA, týkajúceho sa proteázových inhibičných liečiv INVIRASE (saquinavir mesylate), CRIXIVAN® (indinavir sulfate), NORVIR® (ritonavir) a FORTOVASE (saquinavir); non-nuleotických inhibítorov reverznej transkriptázy VIRAMUNE® (nevirapine), SUSTIVA® (efavirenz) a ZIAGEN® (abacavir) a pre reverznú transkriptázu liečivo EPIVIR® (lamivudine).

Test COBAS TaqMan HIV-1 Test nie je určený na použitie pri skríningu krvi alebo krvných produktov za účelom zistenia HIV-1 a nie je určený na použitie ako diagnostický test, ktorý má potvrdiť prítomnosť infekcie HIV-1.

#### SÚHRNNÉ INFORMÁCIE A VYSVETLENIE TESTU

Vírus HIV je etiologickým faktorom Syndrómu získanej imunologickej nedostatočnosti (AIDS)<sup>1-3</sup>. Infekcia HIV sa prenáša sexuálnym kontaktom, stykom s infikovanou krvou alebo krvnými produktmi alebo prenosom infekcie matky na plod<sup>4</sup>. V dobe od troch do šiestich týždňov po styku s infekciou HIV sa u postihnutých jednotlivcov vyvinie akútny syndróm podobný chrípke, ktorý je charakteristický vysokou hladinou vírusu v krvi<sup>5-8</sup>. U mnohých infikovaných jedincov následne dochádza k špecifickej HIV reakcii imunitného systému a poklesu vírusu v plazme – táto fáza obvykle nastáva štyri až šesť týždňov po vypuknutí symptómov<sup>9,10</sup>. Po uskutočnení sérokonverzie obvykle infikovaní jedinci vstupujú do klinicky stabilnej asymptomatickej fázy, ktorá môže trvať roky<sup>11-13</sup>. Asymptomatická fáza je charakteristická nízkou úrovňou plazmovej virózy<sup>14</sup> a postupnou degradáciou CD4<sup>+</sup> T lymfocytov, čo vedie k závažnej imunitnej nedostatočnosti, vzniku viacerých oportunistických infekcií, tvorbe zhubných nádorov a k smrti<sup>15</sup>. Aj keď sú hladiny vírusu v periférnej krvi počas asymptomatickej fázy pomerne nízke, opätovné zvyšovanie a znižovanie hladiny vírusu je dynamickým procesom, v ktorom sú vysoké hladiny tvorby vírusu a infekcie buniek CD4<sup>+</sup> vyvážené rovnako vysokými úrovňami znižovania jeho hladiny, úmrtia infikovaných buniek a dotvárania buniek CD4<sup>+</sup> čo vyúsťuje do relatívne stabilných úrovní plazmovej virózy a buniek CD4<sup>+</sup><sup>16-18</sup>.

Kvantitatívne merania HIV virózy v periférnej krvi dokázali, že vyššie hladiny vírusu môžu korelovať so zvýšeným rizikom klinického vývoja HIV ochorenia, a že zníženie hladiny vírusu v plazme môže súvisieť so zníženým rizikom klinického vývoja<sup>19-21</sup>. Hladina vírusu v periférnej krvi sa dá kvantifikovať prostredníctvom merania HIV p24 antigénu v sére alebo priamym meraním vírus obsahujúcej RNA v plazme pomocou amplifikácie kyseliny nukleovej alebo technológií signálnej amplifikácie<sup>22-26</sup>.

Antigén p24 je v zásade jadrovým proteínom HIV a v sére sa nachádza buď voľný alebo viazaný na anti-p24 protilátku. Voľný antigén p24 sa dá merať pomocou komerčne dostupných enzymatických imunoanalýz (EIA), aj keď je užitočnosť antigénu p24 ako markera pri vírusovom ochorení pomerne obmedzená, nakoľko antigén možno zistiť len u 20% asymptomatických pacientov a približne u 40–50% symptomatických pacientov. Procedúry, zamerané na rozštiepenie komplexu antigén – protilátka zlepšujú citlivosť testov na antigén p24, avšak vírusový proteín ostáva u väčšiny asymptomatických pacientov nezistiteľný<sup>22</sup>.

Infikovaný HIV v plazme sa dá kultivovať naočkovaním do aktivovaných krvných buniek s jedným jadrom (PBMC) od bežných darcov. Stanovenie množstva sa dosiahne naočkovaním PBMC do sériových roztokov plazmovej vzorky. Kvantitatívna kultúra má obmedzené použitie z hľadiska monitorovania úrovne vírusu u infikovaných jedincov, nakoľko len malá časť čiastočiek vírusu je infekčná *in vitro*. U asymptomatických jedincov je infekčný vírus často nezistiteľný<sup>22</sup>.

HIV RNA v plazme sa dá kvantifikovať pomocou technológií amplifikácie kyseliny nukleovej – napríklad reakciou reťazca polymerázy (PCR)<sup>27-29</sup>. Test COBAS TaqMan HIV-1 využíva PCR technológiu na dosiahnutie maximálnej citlivosti a dynamického rozsahu pri kvantifikačnej detekcii HIV-1 RNA v EDTA anti-koagulovanej plazme.

## PRINCÍPY PROCEDÚRY

COBAS TaqMan HIV-1 Test je založený na piatich základných procesoch: (1) manuálna príprava vzorky za účelom získania HIV-1 RNA; (2) automatická reverzná transkripcia cieľovej RNA za účelom vytvorenia komplementárnej DNA (cDNA)<sup>30</sup>; (3) súčasná PCR amplifikácia<sup>30</sup> cieľovej cDNA pomocou HIV-1-špecifických komplementárnych základov a detekcia rozštiepených duálnych fluorescenčných farebne označených oligonukleotických sond, ktoré umožňujú kvantifikáciu cieľového HIV-1 amplifikovaného produktu (amplikóna) a RNA kvantifikačného štandardu HIV-1, ktorý sa spracuje, amplifikuje a detekuje súčasne so vzorkou.

Hlavná zmes obsahuje párový základ špecifický pre HIV-1 RNA a HIV-1 RNA kvantifikačného štandardu. Hlavná zmes bola vyvinutá tak, aby bolo možné zaistiť ekvivalentnú kvantifikáciu podtypov HIV-1 skupiny M. Detekcia amplifikovanej DNA sa vykonáva za použitia cieľovo špecifických a QS (kvantifikačný štandard) – špecifických duálne označených oligonukleotických sond, ktoré umožňujú nezávislú amplifikáciu HIV-1 aplikóna a HIV-1 aplikóna kvantifikačného štandardu.

Kvantifikácia HIV-1 vírusovej RNA sa vykonáva pomocou kvantifikačného štandardu HIV-1. Kvantifikačný štandard HIV-1 je neinfekčná transkripcia posilneného obrazca RNA, ktorá obsahuje identické väzbové základy ako cieľová HIV-1 RNA a unikátny sondový väzbový región, ktorý umožňuje rozpoznať aplikón HIV-1 kvantitatívneho štandardu od cieľového aplikóna HIV-1. HIV-1 kvantifikačný štandard sa zavedie do každej jednotlivej vzorky a kontrolnej vzorky pri známom počte kópií a prenáša sa cez prípravu vzoriek, reverznú transkripciu, PCR amplifikáciu a detekciu spolu s cieľovým HIV-1. Analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer vypočítava titráciu HIV-1 RNA v testovacích vzorkách porovnaním signálu HIV-1 so signálom HIV-1 kvantitatívneho štandardu pre každú vzorku a kontrolnú vzorku. HIV-1 kvantifikačný štandard vyvažuje efekty inhibície a riadi proces amplifikácie tak, aby bolo možné dospieť k presnej kvantifikácii HIV-1 RNA v každej vzorke.

## Príprava vzorky

Test COBAS TaqMan HIV-1 Test spracúva EDTA plazmové vzorky a izoláty HIV-1 RNA pomocou všeobecných manuálnych postupov prípravy vzorky na základe väzby kyseliny nukleovej na sklenené vlákna. Vírusové častice HIV-1 sa rozkladajú inkubáciou pri zvýšenej teplote a obsahu proteázy a chaotropického dezintegračného/väzbového roztoku, ktorý uvoľňuje nukleové kyseliny a chráni uvoľnenú HIV-1 RNA pred RNase v plazme. Spolu s dezintegračným činidlom sa známy počet molekúl RNA HIV-1 kvantitatívneho štandardu zavedie do každej vzorky. Následne sa do dezintegračnej zmesi pridá izopropanol a dezintegračná zmes sa odstreďuje v stĺpci s vložkou zo skleneného vlákna. Počas odstreďovania sa HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu naviažu na povrch vložky zo sklenených vlákien. Nenaviazané látky, akými sú napríklad soli, proteíny a iné bunkové nečistoty sa odstreďovaním odstránia. Adsorbované nukleové kyseliny sa vymyjú vodným roztokom. Testovacie sady umožňujú paralelne spracovať 12 vzoriek alebo ich násobky. Spracovaná vzorka obsahujúca HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu sa následne pridá do amplifikačnej/detekčnej zmesi. HIV-1 cieľová RNA a HIV-1 kvantifikačného štandardu RNA sú následne reverzne transkribované, amplifikované a detekované v analyzátove COBAS TaqMan 48 Analyzer pomocou amplifikačných a detekčných činidiel obsiahnutých v testovacej sade.

## Reverzná transkripcia a PCD amplifikácia

### Výber cieľa

Výber cieľovej sekvencie RNA pre HIV-1 závisí od identifikácie hraníc v rámci HIV-1 genómu, ktorý zobrazuje maximálne zachovanie sekvencie v rámci rôznych HIV-1 podtypov skupiny M. V súlade s vyššie uvedeným je vhodný výber základov a sondy zásadným predpokladom pre schopnosť testu detekovať genotyp HIV-1. Test COBAS TaqMan HIV-1 Test využíva základy reverznej transkripcie a PCR amplifikácie, ktoré definujú sekvenciu v rámci vysoko zachovaného regiónu HIV-1 *gag* gému<sup>31</sup>. *Gag* región kóduje antigény špecifické z hľadiska skupiny alebo jadrové štruktúrne proteíny vírusovej partikuly. Nukleotická sekvencia základov bola optimalizovaná tak, aby bolo možné dosiahnuť ekvivalentnú amplifikáciu HIV-1 podtypov skupiny M.

### Reverzná transkripcia

Reverzná transkripcia, PCR amplifikácia a detekcia sa vykonávajú pri použití termostabilného rekombinačného enzýmu *Thermus specie* Z05 DNA polymerázy (Z05). Sekvencie nukleotidu a aminokyselín polymerázy Z05 DNA sa odlišujú od *Taq* DNA Pol a *rTth* DNA Pol z hľadiska vlastností DNA polymerázy. Za prítomnosti mangánu ( $Mn^{2+}$ ) a v rámci príslušných podmienok roztoku vykazuje Z05 aktivitu reverznej transkriptázy a DNA polymerázy<sup>30</sup>. Toto umožňuje, že sa reverzná transkripcia, PCR amplifikácia a detekcia môžu uskutočniť v tej istej reakčnej zmesi.

Spracované vzorky sa pridávajú do amplifikačnej zmesi v amplifikačných skúmavkách (K-skúmavky), v ktorých dochádza k reverznej transkripcii a PCR amplifikácii. Reakčná zmes sa zahreje, aby sa antimediátorový základ uvoľnil do HIV-1 cieľovej RNA a do RNA HIV-1 kvantifikačného základu. Za prítomnosti  $Mn^{2+}$  a prebytku deoxynukleozid trifosfátov (dNTPs) vrátane deoxyadenozín, deoxyguanozín, deoxycytidín, deoxyuridín a deoxythymidín trifosfátov rozšíri Z05 polymeráza uvoľnený základ tak, že sa vytvorí reťazec DNA (cDNA) komplementárny s cieľovou RNA.

## Amplifikácia cieľa

Po uskutočnení reverznej transkripcie HIV-1 cieľovej RNA a HIV-1 RNA kvantifikačného štandardu sa reakčná zmes zahreje za účelom denaturácie hybridu RNA: cDNA hybridu a expozície cieľových expozícií základu. Pri chladnutí zmesi sa antimediátorový základ uvoľní špecificky do reťazca cDNA, Z05 rozšíri základ a nastane syntetizácia druhého reťazca DNA. Týmto sa ukončí prvý cyklus PCR, čím získame kópiu DNA s dvojitým reťazcom cieľového regióna HIV-1 RNA a HIV-1 RNA kvantifikačného základu. Reakčná zmes sa opätovne zahreje za účelom oddelenia výslednej DNA s dvojitým reťazcom a expozície cieľových sekvencií základu. Pri chladnutí zmesi sa základy uvoľnia do cieľovej DNA. Z05 za prítomnosti  $Mn^{2+}$  a prebytku dNTP rozšíri uvoľnené základy v cieľových šablónach, čím sa vytvorí DNA molekula s dvojitým reťazcom, ktorá sa nazýva amplikón. Aminokyselínová sekvencia polymerázy Z05 DNA sa odlišuje od *Taq* DNA polymerázy a od *rTth* DNA polymerázy už len z hľadiska vlastností enzýmu DNA polymerázy. Analyzátor COBAS TaqMan 48 opakuje tento proces v určenom počte cyklov, pričom každý cyklus efektívne zdvojnásobuje počet amplikónov DNA. Požadovaný počet cyklov je už naprogramovaný. K amplifikácii dochádza len v rámci HIV-1 genómu medzi základmi; celý genóm nie je amplifikovaný.

## Selektívna amplifikácia

Selektívna amplifikácia cieľovej kyseliny nukleovej zo vzorky sa dosiahne v rámci testu COBAS TaqMan HIV-1 Test prostredníctvom použitia enzýmu AmpErase (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridín trifosfátu (dUTP). Enzým AmpErase rozpoznáva a katalyzuje rozpad reťazcov DNA obsahujúcich deoxyuridín<sup>32</sup>, avšak nie DNA, ktorá obsahuje deoxythymidín. Deoxyuridín sa v bežne existujúcej DNA nevyskytuje, vždy sa však vyskytuje v amplikóne a to v dôsledku použitia deoxyuridín trifosfátu ako jedného z dNTPs v Hlavnej zmesi; preto deoxyuridín obsahuje iba amplikón. Deoxyuridín spôsobuje citlivosť kontaminujúceho amplikónu na zničenie pomocou enzýmu AmpErase ešte pred amplifikáciou cieľovej DNA. Taktiež akýkoľvek nešpecifický produkt po úvodnej aktivácii Hlavnej zmesi pomocou mangánu sa zničí enzýmom AmpErase, čím sa zlepšuje citlivosť a špecifickosť. Enzým AmpErase, ktorý je súčasťou Hlavného činidla, katalyzuje štiepenie DNA obsahujúcej deoxyuridín vo zvyškoch deoxyuridínu prostredníctvom otvorenia reťazca deoxyribózy v mieste C1. Pri zahriatí v rámci prvého kroku tepelného cyklu sa reťazec DNA amplikóna rozdelí v mieste deoxyuridínu, čím spôsobí, že DNA sa nedá amplifikovať. Po vystavení teplotám nad 55 °C ostáva enzým AmpErase dlhodobo neaktívny (t.j. počas krokov tepelného cyklu) a preto nedochádza k zničeniu amplikóna vytvoreného po uskutočnení reverznej transkripcie a amplifikácie.

## **Detekcia PCR produktov v rámci testu COBAS TaqMan Test**

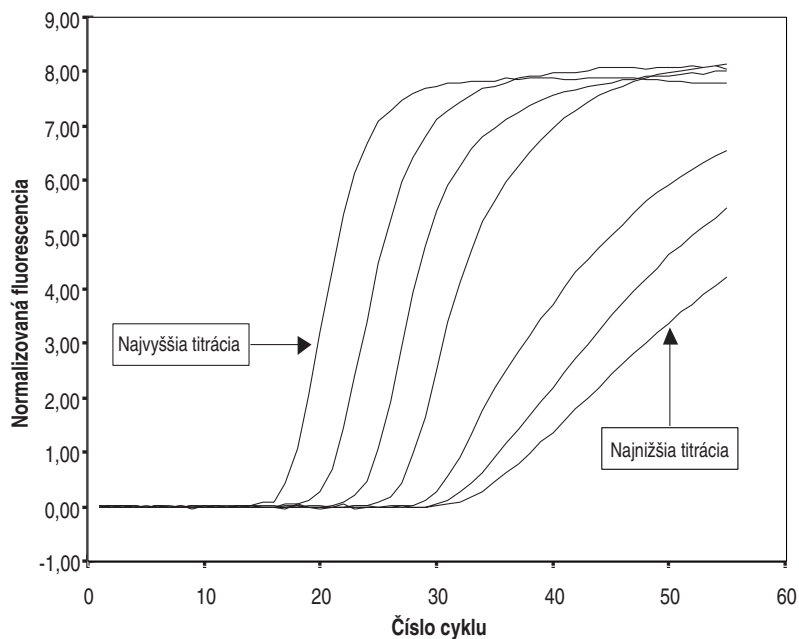
Test COBAS TaqMan HIV-1 Test využíva PCR technológiu v skutočnom čase<sup>33,34</sup>. Použitie duálne označených fluorescenčných sond umožňuje detekciu v reálnom čase akumulácie PCR produktov prostredníctvom monitorovania emisnej intenzity fluorescenčného farbiva uvoľneného v priebehu amplifikačného procesu. SONDY pozostávajú zo špecifických (vo vzťahu k HIV-1 a HIV-1 kvantifikačného štandardu) oligonukleotidov označených špecifickým signalizačným farbivom a tlmiacim farbivom. V teste COBAS TaqMan HIV-1 Test sú sondy HIV-1 a HIV-1 kvantifikačného štandardu označené rôznymi fluorescenčnými signalizačnými farbivami. Ak sú tieto sondy neporušené, signalizačná fluorescencia je potlačená prítomnosťou tlmiaceho farbiva v dôsledku efektov transferu energie Försterovho typu. Počas PCR sa sonda hybridizuje na cieľovú sekvenciu a je rozštiepená 5' → 3' aktivitou nukleázy termostabilnej Z05 DNA polymerázy. Po uvoľnení a separovaní signalizačného a tlmiaceho farbiva sa tlenie ukončí a zvýši sa fluorescenčná aktivita signalizačného farbiva. Amplifikácia HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu sa meria nezávisle pri odlišných vlnových dĺžkach. Tento proces sa opakuje pre určený počet cyklov, pričom každý cyklus efektívne zvyšuje emisnú intenzitu jednotlivého signalizačného farbiva, čo umožňuje nezávislú identifikáciu HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu. Intenzita signálov súvisí s množstvom „štartovacieho“ materiálu na začiatku PCR.

## **Základy kvantifikácie testu COBAS TaqMan HIV-1 Test**

Test COBAS TaqMan HIV-1 poskytuje presné kvantitatívne výsledky v rámci veľmi širokého dynamického rozsahu, pretože monitorovanie amplikóna sa uskutočňuje počas exponenciálnej fázy amplifikácie. Čím vyššia je HIV-1 titrácia vzorky, tým skôr dochádza k zvýšeniu fluorescencie signalizačného farbiva sondy HIV-1 nad základnú fluorescenčnú úroveň (pozri Obrázok 1). Keďže pri všetkých vzorkách je množstvo RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu (QS) konštantné, fluorescencia signalizačného farbiva sondy HIV-1 QS by sa mala objaviť v konkrétnom cykle pri všetkých vzorkách (pozri Obrázok 2). V prípade, ak je QS fluorescencia ovplyvnená inhibíciou alebo nedostatočnou obnovou vzorky, titrácia sa príslušne upraví. Výskyt špecifického fluorescenčného signálu sa vníma ako kritická prahová hodnota ( $C_t$ ).  $C_t$  sa definuje ako frakčné číslo cyklu, v ktorom signalizačné farbivo presiahne predurčený fluorescenčný prah (Priradená fluorescenčná úroveň) a súčasne nastáva začiatok fázy exponenciálneho rastu tohto signálu (pozri Obrázok 3). Vyššia hodnota  $C_t$  naznačuje nižšiu titráciu úvodného HIV-1 cieľovej RNA. Dvojnásobný rast titrácie koreluje s jednonásobným znížením hodnoty  $C_t$  pre cieľovú HIV-1 RNA a 10-násobné zvýšenie titrácie koreluje s poklesom  $C_t$  3,3.

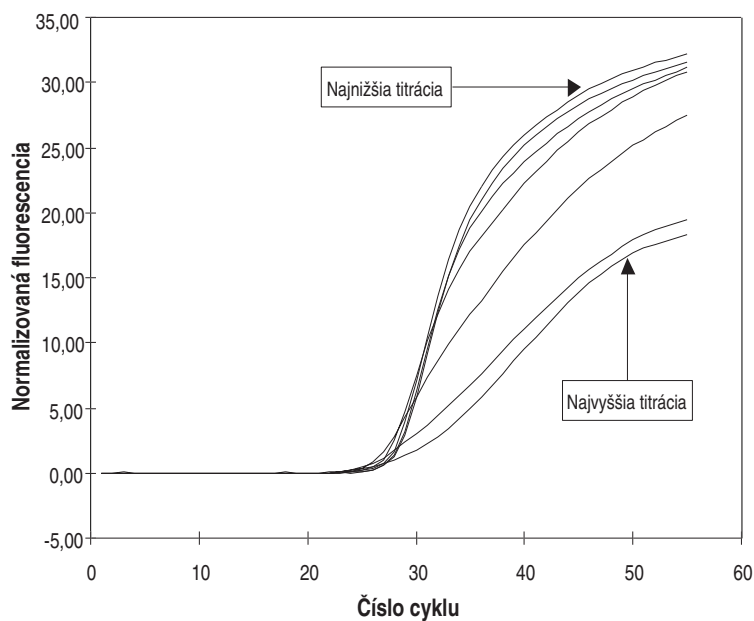
Obrázok 1 znázorňuje cieľové rastové krivky roztokových sád vírusového rozsahu nad  $5\text{-log}_{10}$  pásmo. Pri raste koncentrácie vírusu sa rastové krivky presúvajú na hodnoty predchádzajúcich cyklov. Preto ľavá krajná rastová krivka korešponduje s najvyššou hladinou vírusu a pravá krajná rastová krivka korešponduje s najnižšou titračnou hladinou vírusu.

**Obrázok 1**



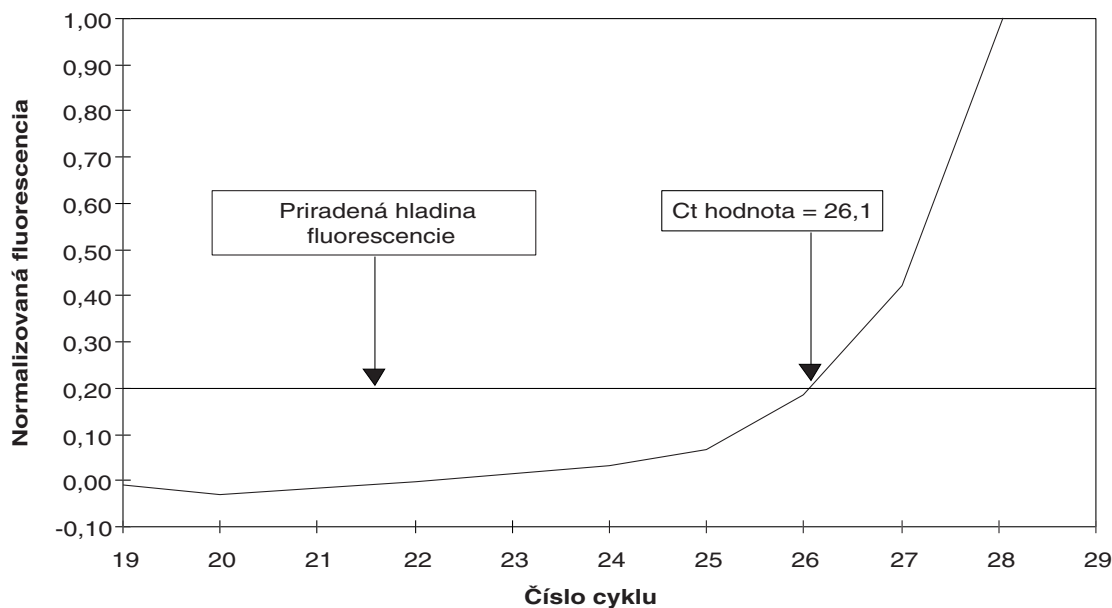
Obrázok 2 znázorňuje rastové krivky Kvantifikačného štandardu pre vzorky z vírusového roztoku s obsahom vyšším než  $5\text{-log}_{10}$  pásmo. Množstvo kvantifikačného štandardu pridávaného do každej vzorky je pri každej reakcii konštantné. Hodnota Ct kvantifikačného štandardu je bez ohľadu na vírusovú titráciu podobná.

**Obrázok 2**



Obrázok 3 uvádza príklad normalizácie fluorescenčných hodnôt každého cyklu pre každú rastovú krivku. Frakčné číslo cyklu (Ct) sa počíta v prípade, ak fluorescenčný signál presiahne priradenú fluorescenčnú úroveň.

Obrázok 3



### Kvantifikácia HIV-1 RNA

COBAS TaqMan HIV-1 Test kvantifikuje vírusovú HIV-1 RNA využitím druhej cieľovej sekvencie (kvantifikačný štandard HIV-1), ktorá sa pridá do každej testovacej vzorky so známou koncentráciou. Kvantifikačný štandard HIV-1 je neinfekčný posilnený obrazec RNA obsahujúci fragmenty HIV-1 sekvencií s väzbovými regiónmi základu identickými s cieľovou sekvenciou HIV-1. Kvantifikačný štandard HIV-1 taktiež generuje amplifikačný produkt rovnakej dĺžky a kompozície základu ako cieľová HIV-1 RNA. Detekčný väzbový región sondy kvantifikačného štandardu HIV-1 bol modifikovaný za účelom odlíšenia amplikóna kvantifikačného štandardu HIV-1 od cieľového amplikóna HIV-1.

Počas fázy uvoľnenia PCR v analyzátore COBAS TaqMan 48 Analyzer sú vzorky osvetlené a nabudené filtrovaným svetlom a filtrované emisné fluorescenčné údaje sa zhromažďujú pre každú vzorku. Načítania pre každú vzorku sa následne upravujú z hľadiska odchýlok prístroja. Tieto fluorescenčné načítania odosiela prístroj do softvéru AMPLILINK a tieto údaje sa ukladajú v databáze. Predbežné kontroly sa využívajú na stanovenie skutočnosti, či sú sady dát HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu platné a v prípade, že údaje ležia mimo stanovený limit, dochádza ku generácii príznakov. Po vykonaní všetkých predbežných kontrol s kladným výsledkom sa spracujú fluorescenčné načítania, čím sa vytvorí Ct hodnoty pre HIV-1 RNA a pre RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu. Kalibračné konštanty špecifické pre dávku, ktoré poskytuje COBAS TaqMan HIV-1 Test sa využívajú pri kalkulácii hodnoty titrácie pre vzorky a kontrolné vzorky vychádzajúce z Ct hodnôt pre HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu. Test COBAS TaqMan HIV-1 je štandardizovaný v súlade s referenčným materiálom WHO HIV-1B 97/656<sup>35</sup>. Výsledky titrácie sú vyjadrené v kópiách/ml (cp/ml). Konverzný faktor medzi HIV-1 RNA kópií/ml a HIV-1 medzinárodnými jednotkami/ml bol stanovený spoločnosťou Roche Molecular Systems, Inc. na úroveň 0,61 cp/IU (1,64 IU/cp).

## ČINIDLÁ

### High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

48 testov

(P/N: 03502295 001)

#### LYS

2 x 25 ml

(Dezintegračný/väzbový roztok)

Tris

52% Guanidín-HCl

< 1% Urea

20% Triton X-100

Xn 52% (w/w) Guanidín-HCl



Zdraviu škodlivé

#### CAR

2 x 2 mg

(RNA, lyofilizovaná)

#### PK

2 x 100 mg

(Proteináza K, lyofilizovaná)

99% Proteináza K, lyofilizovaná

Xn 99% Proteináza K, lyofilizovaná



Zdraviu škodlivé

#### IRB

1 x 33 ml

(Roztok pre odstránenie inhibítora)

Tris

65% Guanidín-HCl

(pridať 20 ml etanolu)

Xn 65% Guanidín-HCl



Zdraviu škodlivé

#### WASH

1 x 20 ml

(Výplachový roztok)

Tris

NaCl

(pridať 80 ml etanolu)

#### ELB

1 x 30 ml

(Lúhovací roztok)

#### RS

4 x každý

(Sada High Pure System so stojanom s vírusovou kyselinou nukleovou)

Dezintegračný stojan

Stojan s filtračnými skúmavkami s upevneným stojanom na odpad

Stojan na lúhovanie

Krycí stojan

Príchytné čeluste

#### WR

8 x každá

(Sada High Pure System s vírusovou kyselinou nukleovou a so stojanom na odpad, biela)

**Specimen Preparation and Control Reagents**

Činidlá na prípravu vzoriek a kontrolných vzoriek

**HIV-1 QS**

(HIV-1 kvantifikačný štandard)

2 x 1,0 ml

Roztok Tris-HCl

EDTA

< 0,001% posilnený obrazec RNA obsahujúci HIV-1 sekvencie väzbového základu a unikátny detekčný väzbový región sondy (neinfekčná RNA v bakteriofágu MS2)

Amarantové farbivo

< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)

0,05% Azid sodíka

**HIV-1 H (+) C**

[kontrolná látka HIV-1 High (+)]

2 x 1,0 ml

< 0,001% posilnený obrazec RNA obsahujúci HIV-1 sekvencie (neinfekčná RNA v MS2 bakteriofágu)

Negatívna ľudská plazma, nereaktívna z hľadiska US FDA testov na protilátku na HCV, protilátku na HIV-1/2, HIV p24 antigén a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nezistiteľné PCR metódami.

0,1% ProClin 300

**HIV-1 L (+) C**

[kontrolná látka HIV-1 Low (+)]

2 x 1,0 ml

< 0,001% posilnený obrazec RNA obsahujúci HIV-1 sekvencie (neinfekčná RNA v MS2 bakteriofágu)

Negatívna ľudská plazma, nereaktívna z hľadiska US FDA testov na protilátku na HCV, protilátku na HIV-1/2, HIV p24 antigén a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nezistiteľné PCR metódami.

0,1% ProClin 300

**CTM (-) C**

[COBAS TaqMan negatívna kontrola (ľudská plazma)]

4 x 1,0 ml

Negatívna ľudská plazma, nereaktívna z hľadiska US FDA testov na protilátku na HCV, protilátku na HIV-1/2, HIV p24 antigén a HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA a HBV DNA nezistiteľné PCR metódami.

0,1% ProClin 300

**Amplification and Control Reagents**

Amplifikačné a detekčné činidlá

**HIV-1 MMX**

(Hlavná zmes COBAS TaqMan HIV-1)

2 x 24 testov

2 x 1,4 ml

Roztok Tricínu

Hydroxid draselný

Octan draselný

< 20% Dimetyl sulfoxid

Glycerol

< 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP

< 0,001% HIV-1 základy

< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiálna)

< 0,1% enzým AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiálny)

< 0,001% fluorescenčne označené oligonukleotické vzorky špecifické pre HIV-1 a HIV-1 kvantifikačného štandardu

0,09% Azid sodíka

**CTM Mn<sup>2+</sup>**

(Mangánový roztok COBAS TaqMan)

2 x 24 testov

2 x 1,0 ml

< 1,2% octan mangánu

Glaciálna kyselina octová

0,09% Azid sodíka

## VÝSTRAHY A BEZPEČNOSTNÉ POKYNY

### A. URČENÉ NA *IN VITRO* DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE.

- B. Tento test je určený na použitie s ľudskou plazmou získanou z antikoagulačných látok EDTA.
- C. Pipetu nenapĺňajte pomocou úst.
- D. V priestoroch laboratória nejdzte, nepite a ani nefajčite. Pri manipulácii so vzorkami a činidlami používajte ochranné rukavice, ochranné laboratórne plášte a ochranu očí. Po ukončení práce so vzorkami a testovacími činidlami si dôkladne umyte ruky.
- E. ***Dbajte, aby ste pri vyberaní pomerných častí vzoriek z reakčných nádob zabránili mikrobiálnej kontaminácii činidiel a ich kontaminácii ribonukleázou.***
- F. ***Odporúčame používať sterilné jednorazové pipety a špičky pipiet bez RNase.***
- G. Nemiešajte činidlá z rôznych dávok alebo z rôznych nádob v rámci jednej dávky.
- H. Nemiešajte činidlá z rôznych sád.
- I. Pri likvidácii nepoužitých činidiel, odpadu a vzoriek postupujte v súlade s platnými predpismi.
- J. Sady nepoužívajte po uplynutí doby expirácie.
- K. Bezpečnostné záznamové listy (MSDS) sú dostupné na požiadanie od miestneho zastúpenia Roche.
- L. So vzorkami by sa vždy malo zachádzať ako s infikovaným materiálom a vždy by sa mali dodržiavať bezpečné laboratórne postupy, uvedené napríklad v materiáli *Biologická bezpečnosť v mikrobiologických a biomedických laboratóriách*<sup>36</sup> a v dokumente M29-A NCCLS<sup>37</sup>. Všetky miesta výkonu práce dôkladne vyčistite a vydezinfikujte pomocou čerstvo pripraveného 0,5% roztoku chlórnanu sodného v deionizovanej alebo destilovanej vode.

**POZNÁMKA:** *Komerčne dostupné bielidlá pre domácnosti obvykle obsahujú 5,25% koncentráciu chlórnanu sodného. Rozriedením bielidla používaného v domácnosti v pomere 1:10 dosiahnete 0,5% koncentráciu chlórnanu sodného.*

- M. **UPOZORNENIE:** CTM (–) C, HIV-1 L (+) C a HIV-1 H (+) C obsahujú ľudskú plazmu derivovanú z ľudskej krvi. Zdrojový materiál bol testovaný v súlade s US FDA schválenými testmi a bol vyhodnotený ako nereaktívny na prítomnosť protilátok na povrchový antigén hepatitídy B (HBsAg), protilátok na HIV-1/2 a HCV a antigén p24 HIV. Testovanie negatívnej ľudskej plazmy PCR metódami nezistilo výskyt HIV-1 RNA, HCV RNA alebo HBV DNA. Neexistuje žiadna známa metóda testovania, pomocou ktorej by bolo možné potvrdiť, že produkty, derivované z ľudskej krvi neprenášajú infikujúcich činiteľov. Preto by sa všetky takéto látky mali považovať za potenciálne infikujúce. S CTM (–) C, HIV-1 L (+) C a HIV-1 H (+) C by sa malo zaobchádzať ako s infikovanými látkami a mali by sa dodržiavať bezpečné laboratórne postupy – napríklad podľa inštrukcií uvedených v *Biologickej bezpečnosti v mikrobiálnych a biomedických laboratóriách*<sup>36</sup> a v dokumente NCCLS M29-A<sup>37</sup>. Všetky miesta výkonu práce dôkladne vyčistite a vydezinfikujte pomocou čerstvo pripraveného 0,5% roztoku chlórnanu sodného v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- N. **HIV-1 MMX, HIV-1 QS a CTM Mn<sup>2+</sup>** obsahujú azid sodíka. Azid sodíka môže reagovať s olovenými a medenými vedeniami a môže dochádzať k tvorbe vysoko výbušných kovových azidov. Ak vylievate roztoky obsahujúce azid sodíka do laboratórnych drezov, vypláchnite odvodné potrubia veľkým množstvom vody, čím zabránite tvorbe azidov.
- O. Pri manipulácii s činidlami používajte ochranné rukavice, ochranné laboratórne plášte a ochranu očí. Zabráňte kontaktu týchto látok s pokožkou, očami a so sliznicami. Ak aj napriek opatreniam dôjde k takémuto kontaktu, zasiahnuté miesto okamžite oplachujte veľkým množstvom vody. V opačnom prípade môžu na zasiahnutých miestach vzniknúť popáleniny. Ak dôjde k rozliatiu týchto činidiel, pred ich vysušením rozliate činidlá zriedte vodou.

## POŽIADAVKY NA SKLADOVANIE A MANIPULÁCIU

### Činidlá na prípravu vzoriek

- A. Činidlá systému High Pure System Viral Nucleic Acid po obdržaní skladujte pri teplote 15–25 °C.
- B. Lúhovací roztok (ELB) a Dezintegračný/Väzbový roztok (LYS) skladujte pri teplote 15–25 °C. Po otvorení skladujte ELB a LYS pri teplote 15–25 °C. Otvorené nádoby s látkami ELB a LYS sa musia použiť do 30 dní alebo do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).
- C. Po pridaní Lúhovacieho roztoku (ELB) za účelom rozriedenia Nosiča RNA a Proteinázy K uskladňujte rozriedený Nosič RNA (CAR) a nepoužitú rozriedenú Proteinázu K (PK) pri teplote –15 až –25 °C. Po rozriedení sa Nosič RNA a Proteináza K musia použiť do 30 dní alebo do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).
- D. Po pridaní etanolu uskladnite Roztok na odstránenie inhibítora (IRB) a Výplachový roztok (WASH) pri teplote 15–25 °C. Tieto pracovné roztoky sú stále po dobu 30 dní alebo do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).
- E. Dezintegračný/Väzbový pracovný roztok [Dezintegračný/Väzbový roztok s nosičom RNA, Proteinázou K a HIV-1 QS] sa musí použiť hneď po jeho príprave. Zvyšné časti roztoku sa musia zlikvidovať.

## PCR činidlá (amplifikačné a detekčné)

- A. **Činidlá alebo kontrolné vzorky nezmrazujte.**
- B. Uskladňujte **HIV-1 MMX, CTM (-) C, HIV-1 L (+) C, HIV-1 H (+) C, HIV-1 QS** a **CTM Mn<sup>2+</sup>** pri teplote 2–8 °C. Neotvorené si tieto činidlá uchovávajú stálosť do dátumu expirácie. Po otvorení za účelom odobratia pomernej časti pre dávku o veľkosti 12 vzoriek uskladnite zvyšok **HIV-1 MMX, HIV-1 L (+) C, HIV-1 H (+) C, HIV-1 QS** a **CTM Mn<sup>2+</sup>** pri teplote 2–8 °C. Po otvorení sú látky **HIV-1 MMX, HIV-1 L(+), HIV-1 H(+), HIV-1 QS** a **CTM Mn<sup>2+</sup>** stále po dobu 30 dní pri teplote 2–8 °C alebo až do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr). Po otvorení sa všetka nepoužitá časť CTM (-) C musí zlikvidovať.
- C. Pracovná hlavná zmes (pripravená pridaním **CTM Mn<sup>2+</sup>** do **HIV-1 MMX**) sa musí uskladňovať pri teplote 2–8 °C na tmavom mieste. Pripravené vzorky a kontrolné vzorky sa musia pridať do 2 hodín po príprave Hlavnej pracovnej zmesi.
- D. Spracované vzorky si zachovávajú stálosť max. 2 hodiny pri teplote 4–30 °C.
- E. Amplifikácia sa musí začať do 1 hodiny od doby, kedy boli spracované vzorky a kontrolné vzorky pridané do Pracovnej hlavnej zmesi.

## POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

### Specimen Preparation Reagents

Činidlá na prípravu vzoriek

- A. **Sada High Pure System s vírusovou kyselinou nukleovou**  
(P/N: 03502295 001)
- LYS**  
(Dezintegračný/väzbový roztok)
  - CAR**  
(Nosič RNA)
  - PK**  
(Proteináza K)
  - IRB**  
(Roztok pre odstránenie inhibítora)
  - WASH**  
(Výplachový roztok)
  - ELB**  
(Lúhovací roztok)
  - RS**  
(Sada High Pure System so stojanom s vírusovou kyselinou nukleovou)
  - WR**  
(Sada High Pure System s vírusovou kyselinou nukleovou a so stojanom na odpad, biela)

### Amplification and Detection Reagents

Amplifikačné a detekčné činidlá

- B. **COBAS TaqMan HIV-1 Test**  
(P/N: 03501752 190)
- HIV-1 QS**  
(HIV-1 kvantifikačný štandard) HIV-1 HPS
  - HIV-1 H (+) C**  
[kontrolná látka HIV-1 High (+) Control]
  - HIV-1 L (+) C**  
[kontrolná látka HIV-1 Low (+) Control]
  - CTM (-) C**  
[COBAS TaqMan negatívna kontrolná látka (ľudská plazma)]
  - HIV-1 MMX**  
(COBAS TaqMan HIV-1 Hlavná zmes)
  - CTM Mn<sup>2+</sup>**  
(COBAS TaqMan mangánový roztok)

## VYŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

### Nástroje a softvér

- Analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer
- Softvér AMPLILINK, v 3.0.1 alebo vyššia verzia
- Dátová stanica pre softvér AMPLILINK
- *Príručka operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer
- Zátkovacie zariadenie pre K-skúmavky (P/N: 03516539001)
- COBAS TaqMan HIV-1 PCR CD ROM s testovacím súborom (P/N: 03610101190)

### Jednorazové príslušenstvo

- Schránka s 12 x 96 K-skúmavkami (P/N: 03137082001)

### Požiadavky na odstredivku

- Odstredivka Sigma 4–15 °C Benchtop alebo ekvivalentná platňová mikro-titrážna odstredivka s kapacitou odstredovania 4600 x g
- Sigma odstredivka s výkyvným rotorom P/N: 11118 (vrátane 2 vaničiek P/N: 13218 a 2 držiakov platní P/N: 17978) alebo ekvivalentná

### INÉ VYŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ POSKYTOVANÉ

- Izopropanol (> 99%) – spĺňa alebo prevyšuje požiadavky ACS
- Etanol (96–100%) – spĺňa alebo prevyšuje požiadavky ACS
- Nastaviteľné pipety\*: (kapacita 250 µl a 1 000 µl) s aerosólovou prepážkou alebo mechanickými koncami bez RNase
- Pomôcky pre pipety: Drummond (P/N: 4-000-100) alebo ekvivalent
- Vodný kúpeľ s teplotou 50 °C
- Zariadenie na tvorbu suchého tepla s teplotou 70 °C
- Sterilné jednorazové sérologické pipety: 5, 10 a 25 ml
- Sterilné polypropylénové kónické skúmavky; 15 ml a 50 ml: Corning (P/N: 430052 a P/N: 430290) alebo ekvivalentná
- Sterilné 2,0 ml skúmavky do odstredivky: Sarstedt (P/N: 72.693.005) alebo ekvivalentná
- Vírivý mixér
- Stojany skúmaviek
- Jednorazové rukavice (bez púdru)
- Kalibrované teploměry pre vodný kúpeľ a zariadenie na tvorbu suchého tepla

\* 3%-ný rozdiel objemu pipetorov nie je na záväzku. Za účelom zamedzenia kontaminácie vzorky a amplikóna je potrebné používať špičky pipiet s aerosólovou prepážkou alebo mechanické špičky bez RNase.

### ZBER VZORIEK, ICH PREPRAVA A SKLADOVANIE

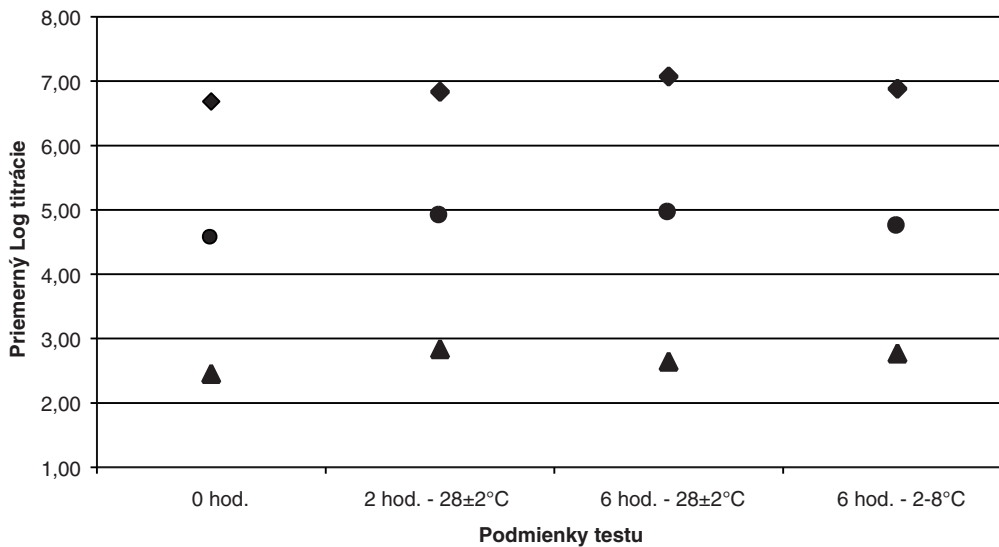
**POZNÁMKA:** *So všetkými vzorkami narábajte ako so vzorkami, schopnými prenášať infekčné faktory.*

#### A. Zber vzoriek

Test COBAS TaqMan HIV-1 je určený výlučne na testovanie plazmy. Krv by sa mala zhromažďovať v sterilných skúmavkách za použitia EDTA ako antikoagulantu.

Krv uskladňujte pri teplote 2–28 °C nie dlhšie, než 6 hodín. Plazmu oddelíte od krvi do 6 hodín od získania krvi pomocou odstredivky – 800–1600 x g po dobu 20 minút pri izbovej teplote. Preneste plazmu do sterilnej polypropylénovej skúmavky. Obrázok 4 zobrazuje údaje zo štúdie, zameranej na stálosť krvi.

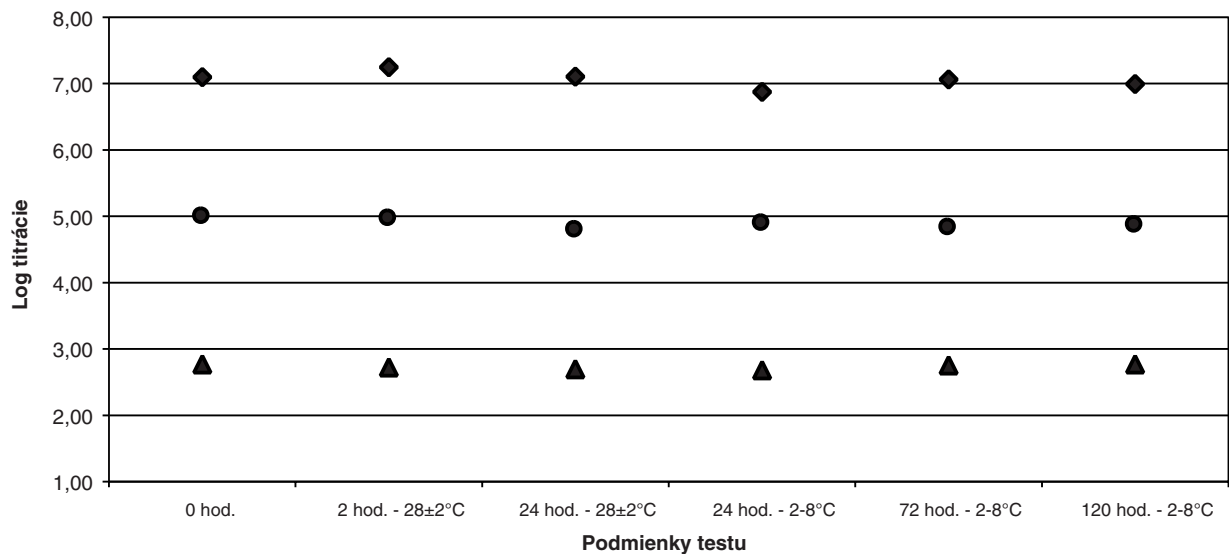
**Obrázok 4**  
**HIV-1 stálosť v krvi s EDTA antikoagulantom pred separáciou do plazmy**



### B. Preprava vzorky

Preprava krvi alebo plazmy musí spĺňať štátne, federálne a miestne predpisy týkajúce sa prepravy etiologických látok<sup>38</sup>. Preprava krvi sa musí uskutočňovať pri teplote 2–28 °C a krv sa musí spracovať od 6 hodín od jej získania. Plazmu možno uskladňovať pri izbovej teplote max. 1 deň, pri teplote 2–8 °C max. 5 dní, alebo ju možno uskladňovať zmrazenú pri teplote –20 °C až –80 °C. Obrázok 5 znázorňuje stálosť HIV-1 v EDTA plazme.

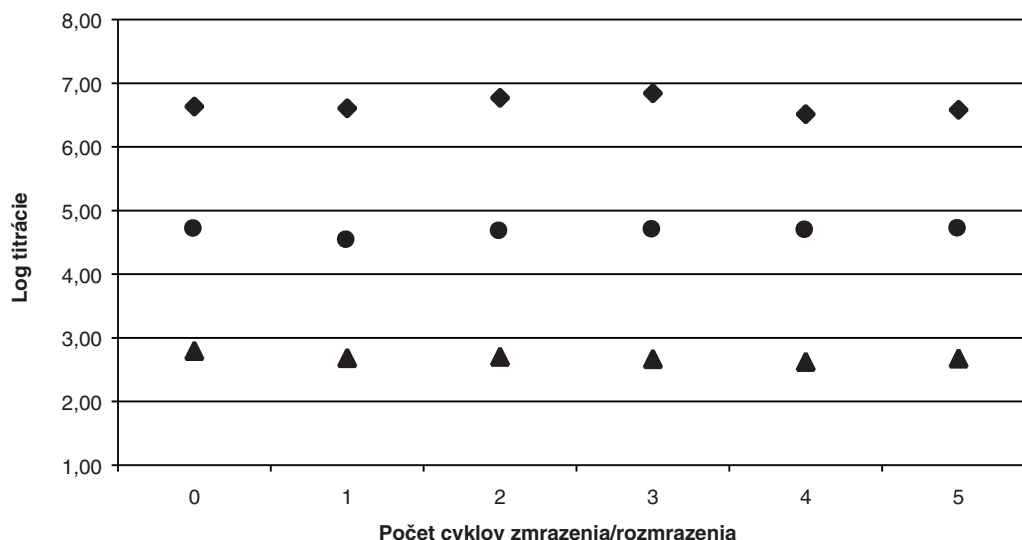
**Obrázok 5**  
**Stálosť HIV-1 v EDTA plazme v skúmavke pre prípravu plazmy**



### C. Skladovanie vzoriek

Plazmové vzorky sa pri izbovej teplote môžu uskladňovať po dobu 1 dňa, pri teplote 2–8 °C je povolená doba uskladňovania 5 dní, alebo sa môžu uskladňovať zmrazené na –20 °C až –80 °C. Odporúčame vzorky skladovať v pomerných častiach 800–900 µl v sterilných 2,0 ml polypropylénových skúmavkách so skrutkovým uzáverom (napríklad Sarstedt P/N: 72.694.006). Sérové plazmové vzorky možno zmraziť a rozmraziť päťkrát bez toho, aby došlo ku strate HIV-1 RNA. Obrázok 6 znázorňuje údaje zo štúdií, týkajúcich sa zmrazovania a rozmrazovania vzoriek.

Obrázok 6  
Stabilita HIV-1 v EDTA plazme pri zmrazovaní a rozmrazovaní vzoriek



## NÁVOD NA POUŽITIE

**POZNÁMKA:** Podrobný návod na použitie sa nachádza v Príručke operátora pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer.

**POZNÁMKA:** Všetky amplifikačné a detekčné činidlá sa musia pred použitím uchovávať pri izbovej teplote; najmenej 30 minút pred použitím ich vyberte z miesta skladovania (z teploty 2–8 °C).

**POZNÁMKA:** 15–30 minút pred použitím sa musí pri izbovej teplote vykonať ekvilibrácia plazmových vzoriek.

**POZNÁMKA:** Tam, kde je to potrebné, použite pipetory s aerosólovou prepážkou alebo mechanickou špičkou. Starostlivo dbajte, aby nedošlo ku kontaminácii.

### Rozsah testu:

Každá sada obsahuje činidlá postačujúce na realizáciu štyroch testov s 12 vzorkami, ktoré sa môžu vykonať separátne alebo súčasne. Jeden replikát CTM (–) C, HIV-1 L (+) C a HIV-1 H (+) C sa musí pridať do každého testovacieho cyklu (pozri časť „Kontrola kvality“). Amplifikačné a detekčné činidlá sú zabalené v 24-testových fľaškách na dvojnásobné použitie. Za účelom čo najúčinniejšieho použitia činidiel by vzorky a kontrolné vzorky mali byť spracované v dávkach, ktoré sú násobkami 12.

### Príprava vzorky a kontrolnej vzorky

**POZNÁMKA:** Ak používate zmrazené plazmové vzorky, umiestnite vzorky na miesto s izbovou teplotou až pokiaľ sa úplne nerozmrazia a pred použitím ich 5–10 sekúnd miešajte vo vírivom mixéri.

**POZNÁMKA:** Predtým, než budete pokračovať, vyčkajte, kým činidlá nenadobudnú izbovú teplotu. Pred započatím purifikačných reakcií zahrejte zariadenie na tvorbu tepla na teplotu 70 °C a vodný kúpeľ na teplotu 50 °C.

#### A. Príprava činidla

**POZNÁMKA:** Pracovný dezintegračný/väzbový roztok si pripravte až potom, ako ste vykonali ekvilibráciu všetkých vzoriek a kontrolných vzoriek pri izbovej teplote po dobu 15–30 minút.

1. Pripravte si Roztok na odstránenie inhibítora pridaním 20 ml 96–100% etanolu do roztoku na odstránenie inhibítora (IRB). Preklápaním zmes 5–10 krát premiešajte. Týmto dosiahnete postačujúce zriedenie roztoku na odstránenie inhibítora na 48 testov.
2. Pripravte si Výplachový roztok pridaním 80 ml 96–100% etanolu do výplachového roztoku (WASH). Preklápaním zmes 5–10 krát premiešajte. Týmto dosiahnete postačujúce zriedenie výplachového roztoku na 48 testov.
3. Zahrejte Lúhovací roztok (ELB) na teplotu 70 °C v 2,0 ml skúmavke (so skrutkovým uzáverom) do mikro-odstredivky. Môžete použiť viacero skúmaviek. Obsah lúhovacej látky na jednu vzorku je 75 µl. Podľa počtu testov nahrejte objem uvedený v nižšie uvedenej tabuľke.

| Činidlo              | Počet opakovaní |     |
|----------------------|-----------------|-----|
|                      | 12              | 24  |
| Lúhovací roztok (ml) | 2,0             | 4,0 |

- 4 Pridajte objem izopropanolu špecifikovaný v nižšie uvedenej tabuľke v závislosti od počtu testov do čistej sterilnej skúmavky.

| Činidlo          | Počet opakovaní |      |
|------------------|-----------------|------|
|                  | 12              | 24   |
| Izopropanol (ml) | 5,0             | 10,0 |

5. Pridajte 0,5 ml Lúhovacieho roztoku (**ELB**) do Nosiča RNA (**CAR**). Nádobu uzavrite, preklopte ju a miešajte vo vírivom mixéri, až pokiaľ sa všetok Nosič RNA nerozpustí. Rozriedený Nosič RNA postačuje na vykonanie 24 testov. Nepoužitý objem rozriedeného nosiča RNA sa môže uskladňovať pri teplote  $-15$  až  $-25$  °C maximálne 30 dní alebo až do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).
6. Pridajte 5 ml Lúhovacieho roztoku (**ELB**) do Proteinázy K (**PK**). Nádobu uzavrite, preklopte ju a miešajte vo vírivom mixéri, až pokiaľ sa všetka Proteináza K nerozpustí. Rozriedená Proteináza K postačuje na vykonanie 24 testov. Nepoužitý objem rozriedenej Proteinázy K sa môže uskladňovať pri teplote  $-15$  až  $-25$  °C maximálne 30 dní alebo až do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).
7. Pripravte si Dezintegračný/väzbový roztok pridaním objemov špecifikovaných v nižšie uvedenej tabuľke v závislosti od počtu vzoriek a kontrolných vzoriek, ktoré sa majú spracovať:

| Činidlá                                     | Počet opakovaní |      |
|---|-----------------|------|
|   | 12              | 24   |
| Dezintegračná látka/<br>Väzbový roztok (ml) | 7,0             | 14,0 |
| Nosič RNA (µl)                              | 140             | 280  |
| HIV-1 QS (µl)                               | 84              | 168  |
| Proteináza K (ml)                           | 1,4             | 2,8  |

**POZNÁMKA:** Objem HIV-1 QS je špecifický pre test COBAS TaqMan HIV-1 Test.

**POZNÁMKA:** Ak budete používať zmrazený rozriedený Nosič RNA alebo Proteinázu K, tieto látky rozmrazte pri izbovej teplote a pred použitím ich premiešajte preklápaním nádob.

- Pridajte stanovený objem Dezintegračného/Väzbového roztoku do čistej a sterilnej 50 ml skúmavky.
- Do skúmavky obsahujúcej dezintegračný/väzbový roztok pridajte stanovený objem rozriedeného nosiča RNA.
- Látku **HIV-1 QS** miešajte vo vírivom mixéri po dobu 3–5 sekúnd a pridajte označené množstvo **HIV-1 QS** do skúmavky obsahujúcej dezintegračný/väzbový roztok a rozriedený nosič RNA.
- Skúmavku uzavrite a preklápaním obsah premiešajte 10–15 krát. **NEPOUŽÍVAJTE vírivý mixér** – týmto spôsobom by sa v roztoku vytvorili bubliny.
- Do skúmavky obsahujúcej dezintegračný/väzbový roztok pridajte stanovený objem rozriedenej Proteinázy K.
- Skúmavku uzavrite a preklápaním obsah premiešajte 10–15 krát. **NEPOUŽÍVAJTE vírivý mixér** – týmto spôsobom by sa v roztoku vytvorili bubliny. S dávkovaním dezintegračného/väzbového roztoku začnite ihneď po pridaní a zmiešaní dezintegračného/väzbového roztoku s Proteinázou K.

Nepoužitý objem dezintegračného/väzbového roztoku (**LYS**) sa môže uskladňovať pri teplote 15 až 25 °C maximálne 30 dní alebo až do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr). Nepoužitý zvyšok dezintegračného/väzbového pracovného roztoku sa musí zlikvidovať.

## B. Príprava vzorky a kontrolnej vzorky

**POZNÁMKA:** Pre túto procedúru sa musia používať nastaviteľné pipetory so špičkami odolnými voči aerosólu.

**POZNÁMKA:** V krokoch 14, 16, 19 a 22 sa môžu používať opakované pipety s príslušne veľkými sterilnými kombi-špičkami. Je však potrebné dbať, aby nedošlo k vymytiu činidiel a vzájomnej kontaminácii.

1. Pridajte 625 µl dezintegračného/väzbového roztoku do každej priehlbiny dezintegračného stojana (I, priehľadný). Viečka zatlačte tak, aby došlo k uzavretiu.
2. Po otvorení vždy iba jednej priehlbiny pridajte 500 µl vzorky alebo kontrolnej vzorky do príslušnej priehlbiny. Po ukončení pridávania vzoriek alebo kontrolných vzoriek zatlačte veko, až pokiaľ poistný mechanizmus veko tesne neuzavrie.
3. Po pridaní všetkých vzoriek a kontrolných vzoriek vo vírivom mixéri premiešajte Dezintegračný stojan po dobu približne 10 sekúnd. Vizualne sa ubezpečte, že všetky priehlbiny sa dobre premiešajú.

4. Vykonať inkubáciu Dezintegračného stojana vo vodnom kúpeli zahriatom na 50 °C po dobu 10 minút. Ponechajte Dezintegračný stojan voľne plávať vo vodnom kúpeli, v ktorom je približne 5–7 cm vody. Po vyňatí Dezintegračného stojana z vodného kúpeľa stojan vysušte.
5. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Dezintegračný stojan po dobu 10–20 sekúnd pri rýchlosti 4600 x g. Centrifúga nesmie dosiahnuť nastavenú rýchlosť.
6. Po otvorení vždy iba jednej priehlbiny pridajte do každej z nich 350 µl izopropanolu. Po ukončení pridávania vzoriek alebo kontrolných vzoriek zatlačte veko, až pokiaľ poistný mechanizmus veko tesne neuzavrie.

**POZNÁMKA:** *Objem izopropanolu je špecifický pre každý test COBAS TaqMan Test.*

7. Vzorky preklápaním stojana 3x premiešajte a následne stojan premiešajte vo vírivom mixéri po dobu 10 sekúnd. Vizualne sa ubezpečte, že všetky priehlbiny sa dobre premiešajú.
8. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Dezintegračný stojan po dobu 10–20 sekúnd pri rýchlosti 4600 x g. Centrifúga nesmie dosiahnuť nastavenú rýchlosť.
9. Po otvorení vždy iba jednej priehlbiny pridajte 750 µl vzorky alebo kontrolnej vzorky do príslušných priehlbín Stojana s filtračnými skúmavkami (II, žltý) s pripevneným stojanom na zber odpadu (biely). Po ukončení pridávania vzoriek alebo kontrolných vzoriek zatlačte veko, až pokiaľ poistný mechanizmus veko tesne neuzavrie.
10. Po pridaní všetkých vzoriek alebo kontrolných vzoriek odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 2 minút pri rýchlosti 4600 x g v mikro-titrážnej platňovej odstredivke.
11. Po otvorení vždy iba jednej priehlbiny pridajte zvyšnú zmes vzoriek alebo kontrolných vzoriek do príslušných priehlbín Stojana s filtračnými skúmavkami. Po pridaní všetkých vzoriek alebo kontrolných vzoriek riadne uzavrite veko. Dezintegračný stojan vhodným spôsobom zlikvidujte.
12. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 2 minút pri rýchlosti 4600 x g.
13. Vyberte Stojan s filtračnými skúmavkami z Odpadového stojana stlačením oboch strán poistného mechanizmu na vrchnej časti Stojana s filtračnými skúmavkami. Odpadový stojan zlikvidujte. Osadte nový Odpadový stojan a pripevnite Stojan s filtračnými skúmavkami do Odpadového stojana.
14. Všetky viečka Stojana s filtračnými skúmavkami otvorte pomocou príchytných čelustí a do každej priehlbiny pridajte 400 µl roztoku na odstránenie inhibítora (IRB). **Nedotýkajte sa strán priehlbín.** Po pridaní roztoku na odstránenie inhibítora do všetkých priehlbín riadne uzavrite všetky viečka.
15. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 2 minút pri rýchlosti 4600 x g.
16. Všetky viečka otvorte pomocou príchytných čelustí a do každej priehlbiny pridajte 700 µl výplachového roztoku (WASH) po stenách každej priehlbiny. **Nedotýkajte sa strán priehlbín.** Po pridaní výplachového roztoku do všetkých priehlbín riadne uzavrite všetky viečka.
17. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 2 minút pri rýchlosti 4600 x g.
18. Vyberte Stojan s filtračnými skúmavkami z Odpadového stojana stlačením oboch strán poistného mechanizmu na vrchnej časti Stojana s filtračnými skúmavkami. Odpadový stojan zlikvidujte. Osadte nový Odpadový stojan a pripevnite Stojan s filtračnými skúmavkami do Odpadového stojana.
19. Všetky viečka otvorte pomocou príchytných čelustí a do každej priehlbiny pridajte 700 µl výplachového roztoku. **Nedotýkajte sa strán priehlbín.** Po pridaní výplachového roztoku do všetkých priehlbín riadne uzavrite všetky viečka.
20. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 3 minút pri rýchlosti 4600 x g.
21. Vyberte Stojan s filtračnými skúmavkami z Odpadového stojana stlačením oboch strán poistného mechanizmu na vrchnej časti Stojana s filtračnými skúmavkami. Stojan s filtračnými skúmavkami umiestnite do Lúhovacieho stojana (IIIA, modrý) a pripevnite Stojan s filtračnými skúmavkami do Lúhovacieho stojana. Odpadový stojan vhodne zlikvidujte.
22. Všetky viečka otvorte pomocou príchytných čelustí a do stredu každého filtra pridajte 75 µl zahriateho lúhovacieho roztoku (ELB) **bez toho, aby ste sa filtra dotýkali.**

**POZNÁMKA:** *Lúhovací roztok nepridávajte tak, aby stekal po stranách priehlbín.*

Po pridaní lúhovacieho roztoku do všetkých priehlbín riadne uzavrite všetky viečka. Vykonať inkubáciu Lúhovacieho stojana pri izbovej teplote po dobu minimálne 3 minút po pridaní Lúhovacieho roztoku do poslednej priehlbiny.

23. V mikro-titrážnej platňovej odstredivke odstreďujte Stojan s filtračnými skúmavkami po dobu 3 minút pri rýchlosti 4600 x g.

24. Vyberte Stojan s filtračnými skúmavkami z Lúhovacieho stojana stlačením oboch strán poistného mechanizmu na vrchnej časti Stojana s filtračnými skúmavkami. Stojan s filtračnými skúmavkami vhodným spôsobom zlikvidujte.
25. Krycí stojan (IIIB, modrý) umiestnite na Lúhovací stojan (IIIA, modrý). Riadne zatlačte a upevnite spoje na Lúhovací stojan. Uzavrite všetky viečka.
26. Spracované vzorky a kontrolné vzorky sa priamo môžu použiť na PCR. Použite 50 µl spracovaných vzoriek a kontrolných vzoriek na amplifikáciu. Spracované vzorky a kontrolné vzorky pridajte do Pracovnej hlavnej zmesi do 2 hodín po ukončení príprav vzoriek a kontrolných vzoriek. Vykonajte amplifikáciu spracovaných vzoriek a kontrolných vzoriek do 1 hodiny po pridaní vzoriek a kontrolných vzoriek do hlavnej pracovnej zmesi a do 3 hodín od dokončenia prípravy vzoriek.

**POZNÁMKA:** *Spracované HIV-1 vzorky možno uskladňovať pri teplote 4–30 °C max. 2 hodiny pred ich pridaním do hlavnej pracovnej zmesi a do hlavnej pracovnej zmesi ich možno pridať max. 1 hodinu pred amplifikáciou.*

### Reverzná transkripcia, amplifikácia a detekcia

**POZNÁMKA:** *K-nosiče a držiak K-nosičov utrite handrou, ktorá nezanecháva vlákna navlhčenou 70% roztokom izopropanolu.*

#### C. Príprava činidla

**POZNÁMKA:** *COBAS TaqMan HIV-1 hlavná zmes (HIV-1 MMX), „Pracovná hlavná zmes“ (Pracovná MMX) a Pracovná hlavná zmes spolu so spracovanými vzorkami a kontrolnými vzorkami sú citlivé na pôsobenie svetla. Tieto činidlá chráňte pred svetlom.*

**POZNÁMKA:** *COBAS TaqMan HIV-1 hlavná zmes (HIV-1 MMX) a COBAS TaqMan mangánový roztok (CTM Mn<sup>2+</sup>) sa musia ekvilibrovať pri izbovej teplote prostredia najmenej 30 minút pred prípravou pracovnej hlavnej zmesi.*

**POZNÁMKA:** *Pracovnú MMX pripravujte po vykonaní prípravy vzoriek a kontrolných vzoriek.*

**POZNÁMKA:** *Spracované vzorky sú pred pridaním do Pracovnej MMX stále po dobu max. 2 hodín.*

**POZNÁMKA:** *Pracovná MMX sa musí použiť do 2 hodín od prípravy.*

**POZNÁMKA:** *Po pridaní spracovaných vzoriek a kontrolných vzoriek do Pracovnej MMX sa amplifikácia musí začať do 1 hodiny.*

1. Vykonajte ekvilibračiu jednej nádobky HIV-1 MMX a jednej nádobky CTM Mn<sup>2+</sup> pri okolitej teplote po dobu minimálne 30 minút.
2. K-nosič umiestnite do držiaka K-nosiča.
3. Nové K-skúmavky umiestnite do K-nosiča bez toho, aby ste sa dotýkali stien K-skúmaviek.

**POZNÁMKA:** *Ak bude do testu zahrnutých menej než 24 skúmaviek, je potrebné obsadiť pozície 1, 2, 5, 20, 23 a 24, aby bol K-nosič v tepelnom cyklovači vyvážený.*

4. Pomocou otváracieho zariadenia pre K-skúmavky tieto skúmavky otvorte. Uzávery umiestnite do držiaka parkovacej polohy K-skúmaviek.
5. Pracovnú MMX pripravte nasledovne:

*Na 24 testov* pridajte 170 µl CTM Mn<sup>2+</sup> do jednej nádobky HIV-1 MMX. Fľašu uzavrite a preklápaním obsah premiešajte 10 krát. Pracovnú MMX nemiešajte vo vírivom mixéri. Pracovnú MMX chráňte pred svetlom a použite ju do 2 hodín od prípravy.

*Na 12 testov* odoberte 700 µl of HIV-1 MMX a pridajte do 2 ml skúmavky. Pridajte 85 µl CTM Mn<sup>2+</sup> do 2 ml skúmavky obsahujúcej HIV-1 MMX, skúmavku uzavrite a preklápaním 10 krát zmes dôkladne premiešajte. Pracovnú MMX chráňte pred svetlom a použite ju do 2 hodín. Zvyšok nepoužitej HIV-1 MMX a CTM Mn<sup>2+</sup> uskladňujte v pôvodných nádobách pri teplote 2–8 °C. Po otvorení si látky HIV-1 MMX a CTM Mn<sup>2+</sup> uchovávajú stálosť po dobu 30 dní pri teplote 2–8 °C alebo až do dátumu expirácie (podľa toho, čo nastane skôr).

**POZNÁMKA:** *Objem CTM Mn<sup>2+</sup> je špecifický pre test COBAS TaqMan HIV-1 Test.*

6. Do každej K-skúmavky pridajte pipetou 50 µl pracovnej hlavnej zmesi.
7. Pridajte 50 µl každej spracovanej vzorky a kontrolnej vzorky do vhodne označenej K-skúmavky obsahujúcej Hlavnú zmes (použite na to mikropipetor s aerosólovou prepážkou alebo mechanickou špičkou). Pomocou mikropipetora a bez toho, aby sa tvorili bublinky opatrne každú vzorku a kontrolnú vzorku trikrát premiešajte.
8. Opakujte krok 7 pre každú spracovanú vzorku a spracovanú kontrolnú vzorku, až pokiaľ nebudú všetky prenesené do K-skúmaviek. Pri každej vzorke a kontrolnej vzorke použite novú špičku. Vizualne skontrolujte, či sa netvorí bubliny a bubliny podľa potreby odstráňte. Pomocou otváracieho zariadenia pre K-skúmavky tieto skúmavky uzavrite. Vizualne skontrolujte, či boli pridané príslušné objemy.
9. Amplifikácia sa musí začať do 1 hodiny od doby, kedy boli spracované vzorky a kontrolné vzorky vložené do K-skúmaviek obsahujúcich Pracovnú MMX.

#### D. Spustenie a prevádzka analyzátoru COBAS TaqMan 48 Analyzer

1. Zapnite počítač a prihláste sa do OS Windows XP pomocou prideleného mena a hesla.
2. Zapnite analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer. Skontrolujte, či sa zariadenie inicializuje a je pripravené na použitie v súlade s inštrukciami, uvedenými v *Príručke operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer. Ak sa v niektorom z tepelných cyklovačov stále nachádzajú K-nosiče z predchádzajúcich cyklov, vyberte ich pomocou transportného zariadenia pre K-nosiče v súlade s inštrukciami, uvedenými v *Príručke operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer.
3. Na počítači spustíte softvér AMPLILINK. Prihláste sa pomocou príslušného používateľského mena a hesla.
4. Ak chcete vytvoriť poradie K-nosičov pre vzorky, ktoré sa majú analyzovať, kliknite na ikonu **Orders** (poradie). Zvoľte kartu **Sample** (vzorka) a kliknite na tlačidlo **New** (nový) a pomocou klávesnice alebo skenera pre čiarové kódy zadajte poradové číslo každej vzorky. Zvoľte definíciu testu „**HIV\_HPS**“. Postup opakujte pre každú vzorku. Kliknite na tlačidlo **Save** (uložiť).

**POZNÁMKA:** Ak bude do testu zahrnutých menej než 24 skúmaviek, je potrebné obsadiť pozície 1, 2, 5, 20, 23 a 24, aby bol K-nosič v tepelnom cyklovači vyvážený.

5. Zvolením karty **Quality Control** (kontrola kvality) v okne **Orders** (poradie) zadajte požadované informácie o Kontrole kvality. Kliknite na tlačidlo **New** (nový) a zadajte informáciu z karty **COBAS TaqMan HIV-1 Test Controls Value Card** (záznamová karta s hodnotami testov kontrolných látok), ktorá je súčasťou dodávky sady pomocou klávesnice alebo skenera pre čiarové kódy. Do príslušných políček zadajte číslo dávky testu COBAS TaqMan HIV-1 Test, dátum expirácie, rozsahy kontrolných látok Low (+) a High (+) a kalibračné koeficienty špecifické pre dávku. Kliknite na „**OK**“.
6. Priradte číslo K-nosiča k testu po kliknutí na kartu **K-Carrier** (nosič) v okne **Orders** (poradie). V okne **K-Carrier** kliknite na **New**. V bunke napravo od „**K-Carrier ID**“ zadajte číslo K-nosiča z čiarového kódu a to pomocou skenera pre čiarové kódy na K-nosiči alebo klávesnice. Uvedomte si, že výsledky predchádzajúceho testovacieho cyklu s tým istým identifikačným číslom K-nosiča musia byť akceptované. Po dvojnásobnom použití K-nosiča s rovnakým číslom na čiarovom kóde v jednom analyzátoe sa výsledky týchto dávok musia prijať a vymazať predtým, než je opätovne možné použiť rovnaké číslo čiarového kódu. Zvoľte test **HIV\_HPS** z testovacieho panela v dolnej časti okna.
7. V časti **Worklist** (pracovný zoznam) vyberte prvý riadok stĺpca Type (T). Zvýraznením tohto poľa získate prístup k rozbalovacej ponuke a následne zvoľte požadovaný typ kontrolnej látky. Dvakrát kliknite na ID pole vzorky v tom istom riadku. Zobrazí sa okno **LookUp Control** (vyhľadávanie kontrolných látok) so všetkými dostupnými kontrolnými látkami. Po zvolení kontrolnej látky budú v dolnej pravej časti v informačnom paneli zobrazené príslušné hodnoty kalibrácie a kontrolných vzoriek. Pre všetky požadované kontrolné látky tento postup opakujte.
8. Ak chcete zadať vzorky do položky **Worklist**, dvakrát kliknite na prvú pozíciu (riadok) pre zadanie vzorky. Zobrazí sa okno **Lookup Sample** (vyhľadávanie vzoriek) obsahujúce priradené poradie vzoriek. Pomocou tlačidiel **Shift + Arrow** zvýraznite viac než jedno číslo poradia. Skontrolujte, či boli všetky poradia priradené k **HIV\_HPS** testu.
9. Kliknutím na **Save** (uložiť) uložíte poradie K-nosičov.

#### E. Reverzná transkripcia, amplifikácia a detekcia

1. Zvoľte ikonu **Systems** (systémy) na karte System; kliknite na **Open** (otvoriť) za účelom otvorenia tepelného cyklovača. Keď sa kryt tepelného cyklovača úplne otvoril a zobrazí sa správa „**Ready to Load**“ v okne **Systems**, zdvihnite a ponechajte veko tepelného cyklovača otvorené. Pomocou transportného zariadenia pre K-nosiče preneste naplnený K-nosič obsahujúci uzatvorené K-skúmavky s pracovnou zmesou a vzorky a kontrolné vzorky do tepelného cyklovača v súlade s inštrukciami, uvedenými v *Príručke operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer. Zatvorte veko tepelného cyklovača.
2. Ubezpečte sa, že pre tento testovací cyklus bol zadaný súbor **HIV\_HPS** Definícia testu. Kliknite na **Start** v okne **Systems** pod ikonou TC, čím uzavriete kryt tepelného cyklovača a spustíte testovací cyklus.
3. Reverznú transkripciu, amplifikáciu a detekciu vykonáva analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer automaticky.

#### VÝSLEDKY

**POZNÁMKA:** Podrobné informácie o tlači výsledkov a o interpretácii príznakov a poznámok sú uvedené v *Príručke operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer.

#### Počítanie výsledkov

Analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer automaticky stanovuje titráciu HIV-1 RNA pre vzorku alebo kontrolnú vzorku. **Titrácia HIV-1 RNA sa vyjadruje vo forme kópie/ml.** Konverzný faktor medzi HIV-1 kópiami/ml a HIV-1 Medzinárodnými jednotkami/ml je 0,61 kópii/IU v súlade s referenčným materiálom WHO HIV-1B 97/656<sup>35</sup>.

#### Analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer:

- Stanovuje prahovú hodnotu cyklu (Ct) pre HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu.
- Stanovuje titráciu HIV-1 RNA založenú na Ct hodnotách pre HIV-1 RNA a RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu a kalibračné koeficienty špecifické pre dávku.
- Určuje, či vypočítané titrácie kópii/ml pre HIV-1 L (+) C a HIV-1 H (+) C spadajú do stanovených pásiem.

## Interpretácia výsledkov

Číselná titrácia, t.j. [2,34E+05 k/ml] označuje, že výsledok spadá do stanoveného pásma testu.

[< 4,00E+01 k/ml] znamená, že výsledok je platný a úroveň titrácie bola pod stanoveným pásmom testu.

[> 1,00E+07 k/ml] znamená, že výsledok je platný a úroveň titrácie bola nad stanoveným pásmom testu.

[Target not Detected] (cieľ nebol zistený) znamená, že výsledok je platný a jeho hodnota sa nachádza pod zistiteľnou hladinou.

[Invalid] (neplatný) znamená, že výsledok nebolo možné vypočítať a vzorka je označená príznakom, čo znamená, že sa vyskytla chyba.

## Validácia testovacieho cyklu

Skontrolujte výsledkové okno AMPLILINK alebo skúšobnú tlač z hľadiska výskytu príznakov a poznámok, čím sa ubezpečíte, že testovací cyklus je platný.

**POZNÁMKA:** Podrobné informácie o tlači výsledkov a o interpretácii príznakov a poznámok sú uvedené v Príručke operátora pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer.

Testovací cyklus je platný, ak kontrolným látkam COBAS TaqMan HIV-1 Controls nie je priradený žiadny príznak. Pri platnom teste sa získajú nasledujúce výsledky:

| Kontrolná látka                            | Výsledok                    | Interpretácia                               |
|--|-----------------------------|---|
| Negatívna kontrola                         | Target Not Detected         | Kontrolná látka v rámci stanoveného rozsahu |
| Nízka hladina pozitívnej kontrolnej látky  | Číselný titer X,XXE+XX k/ml | Kontrolná látka v rámci stanoveného rozsahu |
| Vysoká hladina kontrolnej pozitívnej látky | Číselný titer X,XXE+XX k/ml | Kontrolná látka v rámci stanoveného rozsahu |

Test nie je platný, ak sa ktorýkoľvek z príznakov zobrazí pre kontrolné vzorky COBAS TaqMan HIV-1 Controls:

### Negatívna kontrola:

| Príznak        | Výsledok | Interpretácia   |
|----------------|----------|---|
| __N_NC_INVALID | Invalid  | Neplatný výsledok alebo „platný“ výsledok ktorý nebol negatívny pre cieľový HIV-1 |

### Kontrolná látka HIV-1 Low Positive Control:

| Príznak        | Výsledok                     | Interpretácia                          |
|----------------|------------------------------|--|
| __L_LPCINVALID | < 4,00E+01 k/ml              | Kontrolná látka pod stanoveným pásmom  |
|                | Target Not Detected          | Kontrolná látka pod stanoveným pásmom  |
|                | Číselný titer, X,XXE+XX k/ml | Kontrolná látka mimo analytický rozsah |
|                | > 1,00E+07 k/ml              | Kontrolná látka nad stanovený rozsah   |
|                | Invalid                      | Neplatný výsledok                      |

### Kontrolná látka HIV-1 High Positive Control:

| Príznak        | Výsledok                     | Interpretácia                          |
|----------------|------------------------------|--|
| __H_HPCINVALID | < 4,00E+01 k/ml              | Kontrolná látka pod stanoveným pásmom  |
|                | Target Not Detected          | Kontrolná látka pod stanoveným pásmom  |
|                | Číselný titer, X,XXE+XX k/ml | Kontrolná látka mimo analytický rozsah |
|                | > 1,00E+07 k/ml              | Kontrolná látka nad stanovený rozsah   |
|                | Invalid                      | Neplatný výsledok                      |

Ak je testovací cyklus neplatný, opakujte ho (príprava vzoriek a kontrolných vzoriek, reverzná transkripcia, amplifikácia a detekcia).

## Interpretácia výsledkov:

Pri platnom testovacom cykle skontrolujte na výtlačku s výsledkami, či žiadnej vzorke nebol priradený príznak alebo pripomienka. Výsledky interpretujte nasledovne:

⇒ Platný test môže zahŕňať platné a aj neplatné výsledky vzoriek v závislosti na tom, či je jednotlivým vzorkám priradený príznak a/alebo poznámka.

### Výsledky testov sa interpretujú nasledovne:

| Poznámka                     | Príčina   |
|------------------------------|---|
| Target Not Detected          | Ct hodnota pre HIV-1 sa nachádza nad analytickým limitom alebo nebola zistená žiadna Ct hodnota pre HIV-1. Výsledky interpretujte ako „HIV-1 RNA nezistené“.  |
| < 4,00E+01 k/ml              | Vypočítané kópie/ml sa nachádzajú pod detekčným pásmom analýzy. Výsledky interpretujte ako „HIV-1 RNA zistené, menej než 40 HIV-1 RNA kópií/ml“.  |
| Číselný titer, X,XXE+XX k/ml | Vypočítané kópie/ml sa nachádzajú v rámci detekčného pásma analýzy.   |
| > 1,00E+07 k/ml              | Vypočítané kópie/ml sa nachádzajú nad detekčným pásmom analýzy. Výsledky interpretujte ako „viac než 1,00E+07 HIV-1 RNA kópií/ml“. Ak sa požadujú kvantitatívne výsledky, pôvodná vzorka sa môže zriediť s HIV-1-negatívnou ľudskou plazmou a test sa má opakovať. Vynásobte dosiahnutý výsledok faktorom riedenia. |

**POZNÁMKA:** *Vzorky s výsledkami presahujúcimi analytické pásmo môžu spôsobiť výskyt neplatného výsledku s príznakom „QS\_INVALID“. Ak sa vyžadujú kvantitatívne výsledky, pôvodnú vzorku treba rozriediť s HIV-1-negatívnou ľudskou EDTA plazmou a test opakovať. Vynásobte dosiahnutý výsledok faktorom riedenia.*

## KONTROLA KVALITY

V každom testovacom cykle sa musí nachádzať jeden replikát látky COBAS TaqMan Negative Control, COBAS TaqMan HIV-1 Low (+) Control a COBAS TaqMan HIV-1 High (+) Control. Ako pri každej novej laboratórnej procedúre musia noví operátori zvážiť použitie dodatočných kontrolných látok pri výkone každého testu až dovtedy, kým nedosiahnu schopnosť vykonať test správne. Neexistujú žiadne požiadavky týkajúce sa polohy kontrolných vzoriek v K-nosiči. Skontrolujte výtlačok, či sa na ňom nenachádzajú príznaky a poznámky, čím sa ubezpečíte, že testovací cyklus je platný. V *Príručke operátora* pre analyzátor COBAS TaqMan 48 Analyzer nájdete podrobné informácie o tlači a interpretácii príznakov a poznámok.

### Negatívna kontrola

Negatívna kontrolná látka **CTM (-) C** musí dosiahnuť výsledok „**Target Not Detected**“ (cieľ nebol zistený), tzn. Ct hodnota pre HIV-1 RNA sa nachádzala nad analytickým pásmom alebo nebola zistená žiadna Ct hodnota pre HIV-1 RNA, avšak pre RNA HIV-1 kvantifikačného štandardu bola dosiahnutá platná hodnota Ct. Ak **CTM (-) C** nespĺňa tieto kritériá, celý test je neplatný. Opakujte celý proces (príprava vzoriek a kontrolných vzoriek, amplifikácia a detekcia). Ak je hodnota **CTM (-) C** nepretržite neplatná, obráťte sa na miestne zastúpenie Roche, kde vám poskytnú technickú pomoc.

### Pozitívne kontrolné látky

Priradený rozsah pre **HIV-1 L (+) C** a **HIV-1 H (+) C** je špecifická pre každú dávku kontrolných látok a je uvedená na karte *COBAS TaqMan HIV-1 Test Controls Value Card* dodávanej spolu so sadou. Tieto rozsahy sa zadávajú do dátovej stanice softvéru AMPLILINK pomocou skenera čiarových kódov alebo klávesnice analyzátoru COBAS TaqMan 48.

Hodnoty HIV-1 RNA vyjadrené ako kópie/ml pre **HIV-1 L (+) C** a **HIV-1 H (+) C** musia spadať do pásma vyznačeného na karte *COBAS TaqMan HIV-1 Test Controls Value Card* dodávanej spolu so sadou. Ak jedna alebo obe pozitívne kontrolné vzorky nespĺňajú tieto kritériá, celý test je neplatný. Opakujte celý proces (príprava vzoriek a kontrolných vzoriek, amplifikácia a detekcia). Ak sa titrácia HCI-1 RNA jednej alebo oboch pozitívnych kontrolných látok stále nachádza mimo stanoveného rozsahu, obráťte sa na miestne zastúpenie Roche, kde vám podajú technické vysvetlenie.

## PROCEDURÁLNE BEZPEČNOSTNÉ POKYNY

1. Tak, ako pri každej testovacej procedúre, aj v tomto prípade platí, že správna laboratórna technika je základom pre správne vykonanie tejto analýzy. Vzhľadom na vysokú analytickú citlivosť tohto testu je potrebné zachovať najvyššiu opatrnosť pri uchovaní čistoty činidiel a amplifikačných zmesí. Čistota všetkých činidiel by mala byť dôsledne monitorovaná. Všetky podozrivé činidlá zlikvidujte.

## PROCEDURÁLNE OBMEDZENIA

1. Tento test je určený na len na použitie s ľudskou plazmou získanou výlučne z antikoagulantu EDTA. Testovanie iných typov preparátov môže vyústiť do chybných negatívnych alebo pozitívnych výsledkov.
2. Spoľahlivé výsledky závisia od adekvátneho množstva vzoriek, prepravy, uskladňovania a postupov pri spracovaní.
3. Prítomnosť enzýmu AmpErase v COBAS TaqMan HIV-1 Hlavnej zmesi znižuje riziko kontaminácie amplikóna. Avšak kontaminácii pochádzajúcej z HIV-1 pozitívnych kontrolných vzoriek a klinických vzoriek možno predísť osvedčenými laboratórnymi postupmi a dôsledným postupovaním v súlade s procedúrami, uvedenými v tomto materiáli.
4. Tento produkt môžu používať len osoby riadne vyškolené v oblasti používania techník a postupov PCR.
5. Tento produkt sa môže používať len v analyzátoroch COBAS TaqMan 48 Analyzer.

## RUŠIVÉ LÁTKY

Zvýšené úrovne lipidov, bilirubínu, albumínu a hemoglobínu vo vzorkách nepreukázali interferenciu pri kvantifikácii HIV-1 RNA pomocou tohto testu.

Plazmové vzorky od pacientov, trpiacich autoimunitnými stavmi/ochoreniami typu Anti Nuclear Antibody, Rheumatoid Arthritis a Systemic Lupus Erythematosus nemajú vplyv na test COBAS TaqMan HIV-1.

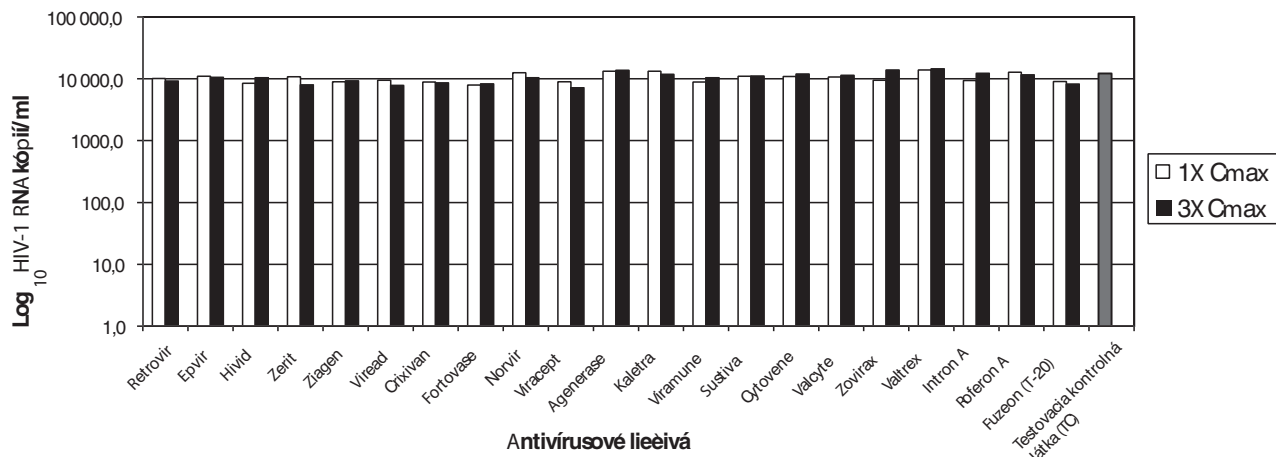
## Inhibícia – Exogénne látky

Nasledujúce liečivé zmesi taktiež nepreukázali schopnosť interferencie s kvantifikáciou HIV-1 RNA v tomto teste (Obrázok 7). Testované liečivá sú liečivami bežne predpisovanými pacientom infikovaným HIV-1. Niektoré z týchto liečiv sa taktiež používajú pri liečení vírusu hepatitídy B, C a cytomegalovírusu. Názvy značiek (USA) a všeobecné názvy (U.S.A.) týchto liečiv sú uvedené nižšie.

| Liečivo    | Všeobecný názov               |
|------------|-------------------------------|
| Retrovir®  | Zidovudine                    |
| Epivir®    | Lamivudine, 3TC               |
| Hivid      | Zalcitabine, ddC              |
| Zerit®     | Stavudine, d4T                |
| Ziagen®    | Abacavir sulfate              |
| Viread®    | Tenofovir disporoxil fumarate |
| Crixivan®  | Indinavir sulfate             |
| Fortovase  | Saquinavir                    |
| Norvir®    | Ritonavir                     |
| Viracept®  | Nelfinavir mesylate           |
| Agenerase® | Amprenavir                    |
| Kaletra™   | Lopinavir/Ritonavir           |
| Viramune®  | Nevirapine                    |
| Sustiva®   | Efavirenz                     |
| Cytovene   | Ganciclovir                   |
| Valcyte    | Valganciclovir HCl            |
| Zovirax®   | Acyclovir                     |
| Valtrex®   | Valacyclovir HCl              |
| Intron®A   | Interferon alfa-2b            |
| Roferon-A  | Interferon alfa-2a            |
| Fuzeon     | Enfuvirtide, T-20             |

Obrázok 7

Interferencia liečiv pri ich maximálnej koncentrácii ( $C_{max}$ ) a trojnásobku maximálnej koncentrácie v plazme.



## NEKLINICKÉ HODNOTENIE VÝKONNOSTI

### A. Detekčný limit

Detekčný limit testu COBAS TaqMan HIV-1 Test bol stanovený analýzou troch nezávislých sériových roztokov HIV-1 rodu H9/HIV-1 MN podtyp B (Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD) v HIV-negatívnej ľudskej EDTA plazme. Testovanie všetkých panelov sa vykonalo pri použití dvoch dávok sád a jeden panel sa testoval pomocou tretej dávky. Koncentrácia HIV v paneloch vychádzala z titrácie stanovenej testom COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 pri použití ultracitlivej metódy prípravy vzoriek.

Nižšie uvedené štúdie dokazujú, že test COBAS TaqMan HIV-1 je schopný detekcie HIV-1 RNA v EDTA-plazme pri koncentráciách od 40 HIV-1 RNA kópií/ml s pozitivitou vyššou než 95% (Tabuľka 1). Koncentráciu HIV-1 RNA v EDTA-plazme, ktorú možno zistiť s pozitivitou vyššou než 95% spoľahlivosti, stanovenou analýzou logit je 29,5 HIV-1 RNA kópií/ml (95% CL 25,8; 35,4). S 95% spoľahlivosťou je možné potvrdiť, že jedna kópia HIV-1 RNA je ekvivalentná s  $1,64 \pm 0,1$  IU (vychádzajúc z normatívneho štandardu WHO (NIBSC 97/656)).

Tabuľka 1  
Detekčný limit testu COBAS TaqMan HIV-1 Test

| HIV-1 RNA (kópie/ml) | Pozitívne Výsledky | Negatívne Výsledky | Citlivosť | (95% CL)     |
|----------------------|--------------------|--------------------|-----------|--------------|
| 10                   | 109                | 66                 | 0,62      | (0,55; 0,69) |
| 20                   | 152                | 20                 | 0,87      | (0,81; 0,92) |
| 30                   | 164                | 11                 | 0,94      | (0,89; 0,97) |
| 40                   | 171                | 4                  | 0,98      | (0,94; 0,99) |
| 50                   | 173                | 2                  | 0,99      | (0,96; 1,00) |
| 100                  | 173                | 0                  | 1,00      | (0,98; 1,00) |

### B. Presnosť

V rámci testu COBAS TaqMan HIV-1 Test dosahovali koeficienty odchýlok (CV) v lineárnom rozsahu 22% a 59% (Tabuľka 2). Väčšina variability analýzy bola sledovaná v rámci testovacieho cyklu (Tabuľka 3).

Uskutočnil sa test piatich rozličných úrovní titrácie (medzi 150 cp/ml a  $3E6$  cp/ml). Po dobu 12 dní vykonali 3 operátori testovacie cykly s 5 replikátmi. Každá vzorka prešla všetkými fázami testu COBAS TaqMan HIV-1 Test (príprava vzorky, amplifikácia a detekcia). Preto tu uvádzaná presnosť odráža všetky aspekty testovacej procedúry. V rámci štúdie boli použité dve dávky činidiel COBAS TaqMan HIV-1.

**Tabuľka 2**  
**Celková presnosť Dávky 1 a Dávky 2 sady dávok**  
**the COBAS TaqMan HIV-1 Test vzhľadom na % CV**

| Kit Lot COBAS TaqMan HIV-1 Test |                                    |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Hladina (cp/ml)                 | Dávka 1<br>Celková odchýlka (% CV) | Dávka 2<br>Celková odchýlka (% CV) |
| 150                             | 59%                                | 57%                                |
| 300                             | 46%                                | 39%                                |
| 3000                            | 26%                                | 28%                                |
| 300 000                         | 22%                                | 25%                                |
| 3 000 000                       | 34%                                | 35%                                |

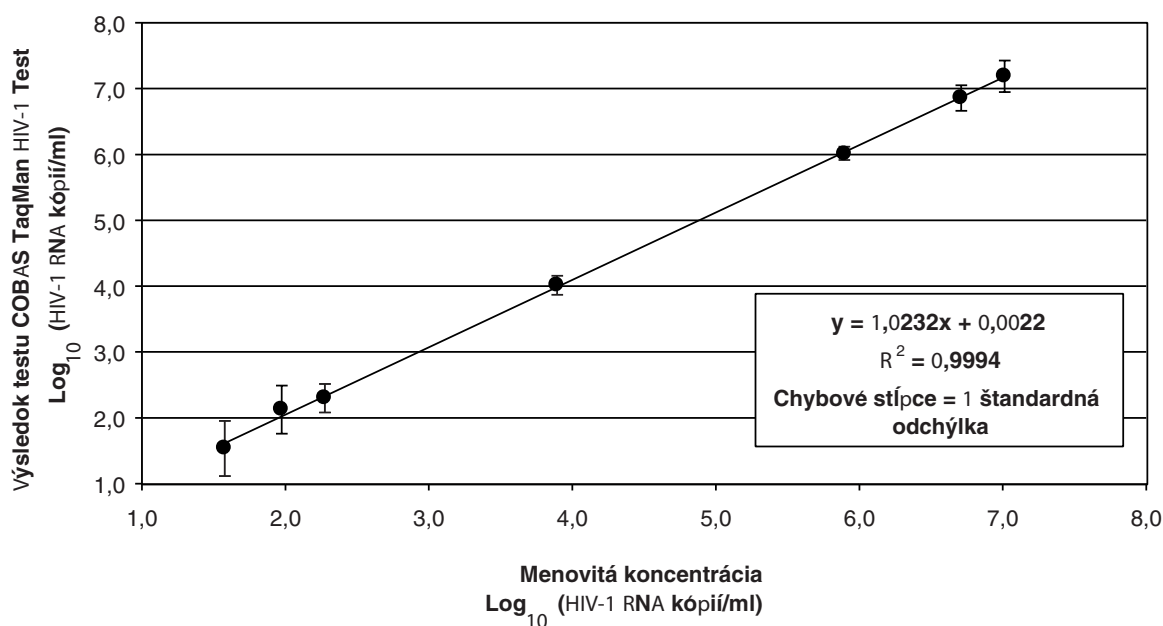
**Tabuľka 3**  
**Štandardné odchýlky komponentov.**  
**Hodnoty predstavujú percento celkovej odchýlky zodpovedajúce**  
**pre daný komponent ako priemer dvoch dávok**

| HIV-1 RNA<br>Koncentrácia<br>(kópie/ml) | Členenie podľa<br>operátorov | Členenie podľa<br>testov | V rámci testu | Celková<br>štandardná<br>Odchýlka |
|---|------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
| 150                                     | 12%                          | 1,5%                     | 86,5%         | 100%                              |
| 300                                     | 15,5%                        | 3%                       | 81,5%         | 100%                              |
| 3000                                    | 19%                          | 24%                      | 57%           | 100%                              |
| 300 000                                 | 18%                          | 27%                      | 55%           | 100%                              |
| 3 000 000                               | 23,5%                        | 26,5%                    | 50%           | 100%                              |

### C. Lineárny rozsah

Podľa údajov na Obrázku 8 je test COBAS TaqMan HIV-1 schopný lineárnej odozvy od 40 ( $\text{Log}_{10} = 1,6$ ) HIV-1 RNA kópií/ml do 1,0E7 ( $\text{Log}_{10} = 7,0$ ) HIV-1 RNA kópií/ml. Štúdia bola realizovaná pri použití dvoch dávok činidiel COBAS TaqMan HIV-1 so 16–18 replikátmi na jednu hladinu a analýza prebehla v súlade s usmerneniami NCCLS EP6-P. Menovitá koncentrácia bola stanovená pomocou testu COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5. Je možné potvrdiť, že analýza koreluje s odhadmi vykonanými pomocou elektónovej mikroskopie, s koncentráciou antigénu p24, s testom AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.0 a s analýzou DNA s rozvetveným reťazcom.<sup>39</sup>

**Obrázok 8**  
**Linearita testu COBAS TaqMan HIV-1 Test**



## D. Inkluzívnosť

Inkluzívnosť testu COBAS TaqMan HIV-1 z hľadiska podtypov bola testovaná na troch hladinách podtypov A, B, C, D, E, F, G a H (Tabuľka 4). Všetky testované podtypy pochádzali z panela NED (NIH-ENVA-DOD), zostaveného Virology Quality Assurance Laboratory za účelom jeho využitia ako HIV-1 referenčného a štandardného panela pre podtypy<sup>40</sup>. Ako referenčná metóda bol použitý test COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5, ktorého výsledky vykázali zhodu s očakávaným počtom vírusových častíc vírusu EM pre HIV-1 podtypy skupiny M.

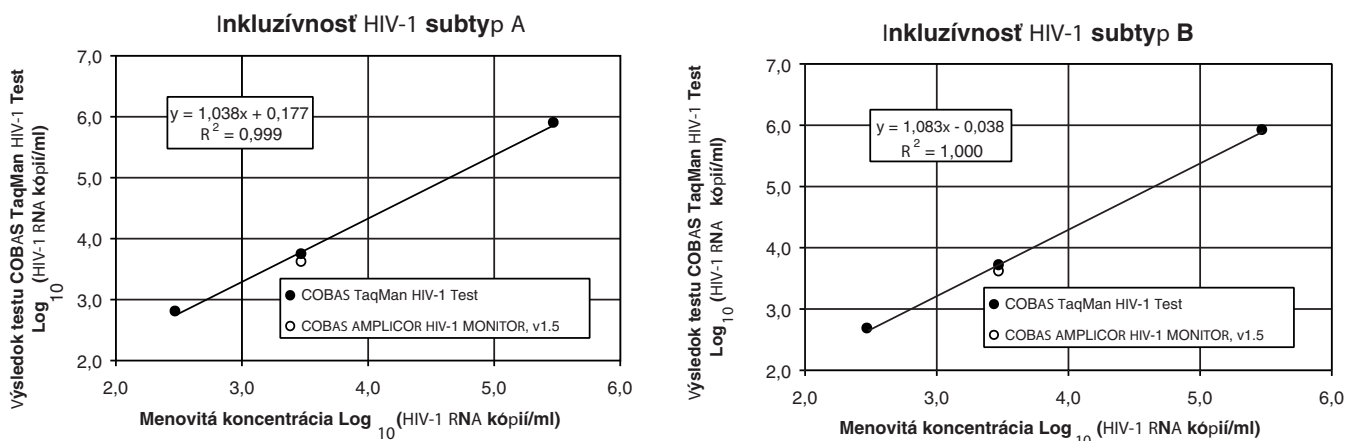
Každý HIV-1 podtyp bol zriedený na koncentrácie približne 300 cp/ml, 3000 cp/ml a 300 000 cp/ml a použil sa test COBAS TaqMan HIV-1 Test. Hladina 3000 cp/ml bola porovnaná s testom COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5.

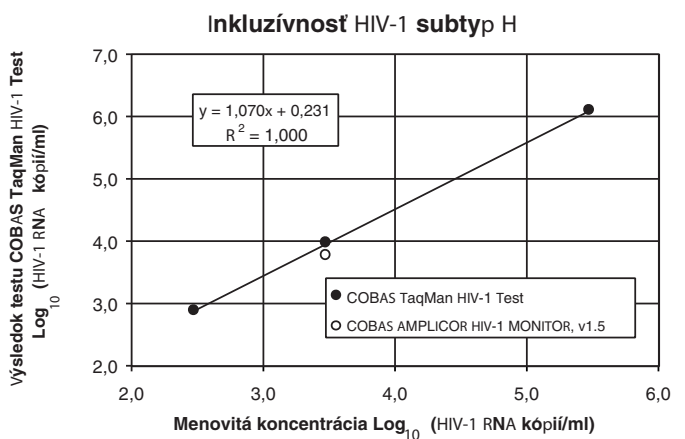
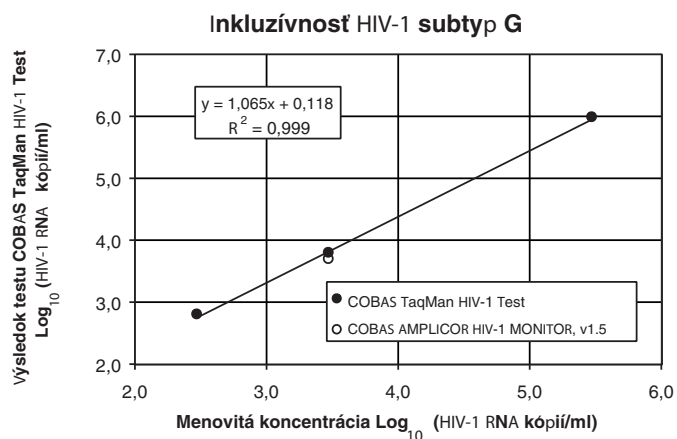
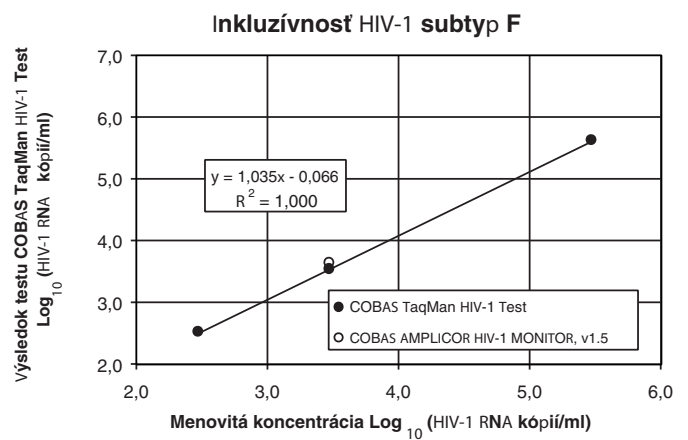
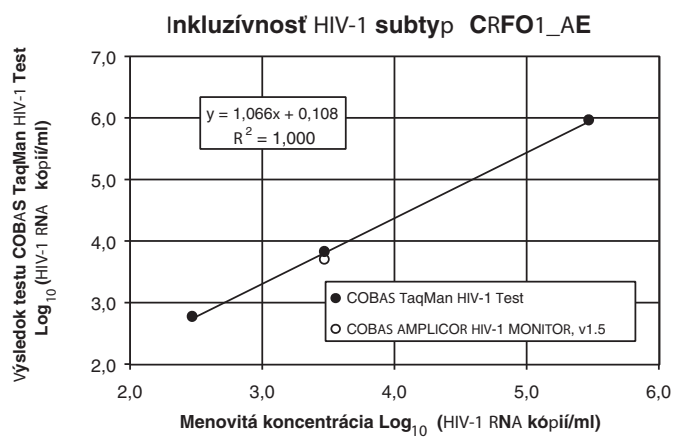
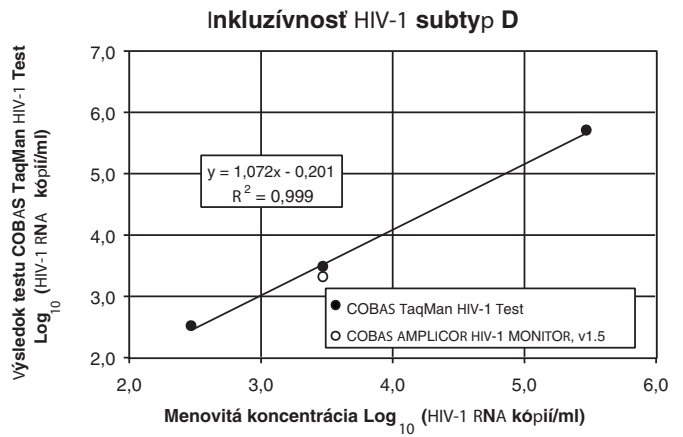
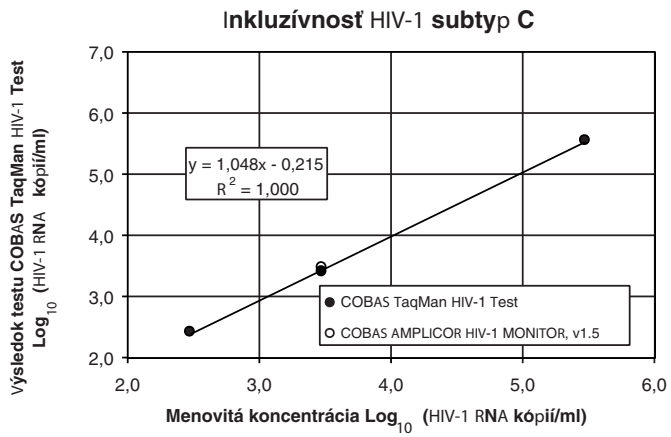
COBAS TaqMan HIV-1 Test kvantifikuje HIV-1 podtypy A, C, D, E (CRF01\_AE), F, G a H s hodnotou titrácie rovnakou ako referenčná analýza COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 (Obrázok 9).

**Tabuľka 4**  
*HIV-1 kultivovaný vírus použitý v priebehu tejto štúdie*

| Podtyp   | Izolovaná látka | Pôvod      | Prístupové číslo GenBank |
|----------|-----------------|------------|--------------------------|
| A        | UG273           | Uganda     | L22957                   |
| B        | US2             | USA        | L14574                   |
| C        | SM145           | Somálsko   | L11803, L22946           |
| D        | UG270           | Uganda     | L11800                   |
| CRF01_AE | CM240           | Thajsko    | U54771, L11761, L14572   |
| F        | BZ162           | Brazília   | L11751, L22084           |
| G        | HH8793          | Keňa       | AF447856                 |
| H        | BCF-KITA        | DRC (Zair) | AF447852                 |

**Obrázok 9**  
*Výkonnosť testu COBAS TaqMan HIV-1 Test pri HIV-1 podtypoch A až H*





### E. Klinická špecifickosť

Klinická špecifickosť testu COBAS TaqMan HIV-1 Test bola stanovená analýzou 100 jednotlivých HIV-1 a 2 séronegatívnych plazmových vzoriek. Všetky vzorky boli pri použití testu COBAS TaqMan HIV-1 negatívne na HIV-1 RNA. Na základe vyššie uvedených výsledkov je klinická špecifickosť testu COBAS TaqMan HIV-1 Test 100%.

### F. Analytická špecifickosť

Analytická špecifickosť testu COBAS TaqMan HIV-1 Test bola hodnotená použitím panelu 36 non-HIV-1 mikroorganizmov alebo DNA naočkovanvej do ľudskej EDTA plazmy (Tabuľka 5). Žiadny z testovaných mikroorganizmov, vírusov alebo purifikovaných kyselín nukleových nebol po vykonaní testu hodnotený ako pozitívny na HIV-1 RNA.

**Tabuľka 5**  
**Vzorky pre analytickú špecifickosť**

| Popis vzorky                      | Popis vzorky                     |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Adenovírus typ 2                  | (DeltaH6H11) úplná dĺžka HTLV-II |
| Adenovírus typ 3                  | Herpes Simplex typ I, F          |
| Adenovírus typ 7                  | Herpes Simplex typ I, HF         |
| <i>Candida Albicans</i>           | Herpes Simplex typ I, MacIntyre  |
| Cytomegalovírus Davis             | Herpes Simplex typ II, G         |
| Cytomegalovírus Towne             | Herpes Simplex typ II, MS        |
| Vírus Epstein-Barr RAJI           | Ľudský DNA vírus 11              |
| Vírus Epstein-Barr P-3            | Ľudský DNA vírus 18              |
| Vírus hepatitídy A (PA 21)        | Ľudský DNA vírus 6B              |
| HBV, genotyp A                    | Chrípka A (A/NJ/8/76)            |
| HBV, genotyp B                    | Chrípka B (B/HK/5/72)            |
| MJ (G11) bunky produkujúce HTLV-I | <i>Mycobacterium avium</i>       |
| (C5/MJ) bunky produkujúce HTLV-I  | <i>Pneumocystis carinii</i> D&D  |
| Vírus hepatitídy C genotyp 1a     | <i>Akné Propionibacterium</i>    |
| Vírus hepatitídy C genotyp 1b     | <i>Stafylococcus epidermidis</i> |
| Vírus hepatitídy C genotyp 2a     | <i>Stafylococcus aureus</i>      |
| Vírus hepatitídy C genotyp 2b     | Varicella-Zoster Ellen           |
| (MoT) bunky produkujúce HTLV-II   | Varicella Zoster Oka             |

Klinické vzorky od pacientov infikovaných rôznymi ochoreniami (HTLV-1, HTLV-2, HIV-2, HAV, HBV, HCV, EBV) nevykázali interferenciu s testom COBAS TaqMan HIV-1 (Tabuľka 6). Vírusová infekcia týchto vzoriek bola kvalitatívne vykázaná prostredníctvom najmenej jednej z nasledujúcich metód: Western blot, skrín IFA, EIA alebo PCR. Test COBAS TaqMan HIV-1 je špecifický z hľadiska amplifikácie a detekcie HIV-1 RNA taktiež sa súčasnej prítomnosti HTLV-1, HTLV-2, HIV-2, HAV, HBV, HCV a EBV.

**Tabuľka 6**  
*Analytická špecifickosť vzoriek získaných od infikovaných pacientov*

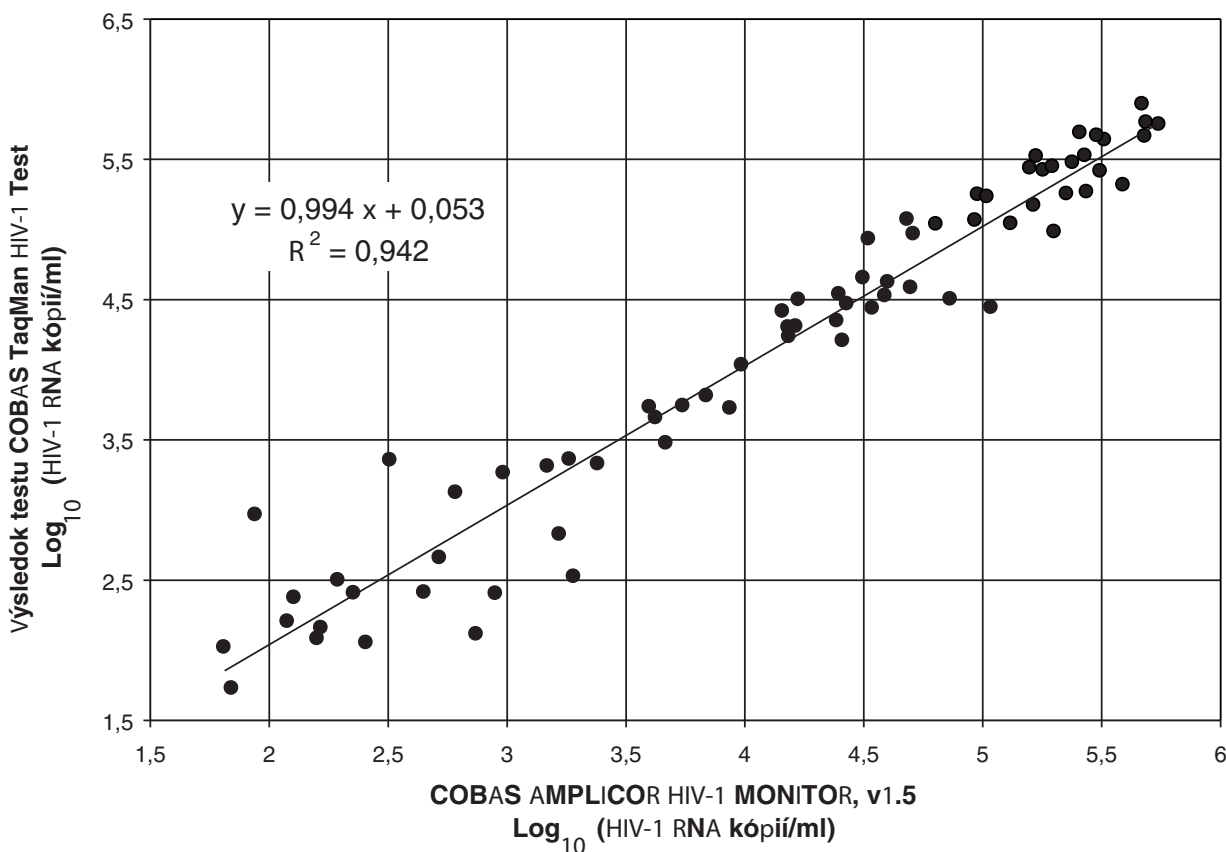
| Vzorky                             | Klinická vzorka<br>naočkovaná HIV-1<br>Log <sub>10</sub> Titer*<br>(HIV-1 RNA cp/ml) | Rovnorodá<br>klinická vzorka (bez HIV-1)<br>Log <sub>10</sub> Titer*<br>(HIV-1 RNA cp/ml) |
|------------------------------------|--|---|
| HTLV-1                             | 3,86   | Cieľ nebol zistený  |
| HTLV-2                             | 3,81   | Cieľ nebol zistený  |
| HIV-2                              | 4,00   | Cieľ nebol zistený  |
| HAV                                | 4,02   | Cieľ nebol zistený  |
| HBV                                | 3,94   | Cieľ nebol zistený  |
| HCV                                | 3,95   | Cieľ nebol zistený  |
| EBV                                | 3,89   | Cieľ nebol zistený  |
| Testovacia<br>kontrolná látka (TC) | 3,82   | Cieľ nebol zistený  |

\* Priemer desiatich jednotlivých klinických vzoriek

### G. Korelácia platformy

Výkonnosť testov COBAS TaqMan HIV-1 Test a COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 bola porovnaná analýzou plazmových vzoriek získaných od HIV-1 infikovaných osôb. Realizácia štúdie s klinickými vzorkami prebehla v TriCore Reference Laboratories (Albuquerque, NM). Uskutočnila sa analýza 72 vzoriek s vykázanou hodnotou titrácie medzi 50 cp/ml až 7,5E5 cp/ml a využila sa metóda lineárnej regresnej analýzy. Výsledky získané pomocou testu COBAS TaqMan HIV-1 Test a COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 boli podľa Obrázka 10 veľmi harmonické.

**Obrázok 10**  
*Korelácia testu COBAS TaqMan HIV-1 Test a  
COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5  
pri plazmových vzorkách od HIV-1 infikovaných pacientov*



## REFERENČNÉ MATERIÁLY

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 T-lymphotropic 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<sup>+</sup> T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* **113**:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* **328**:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* **114**:678-693.
16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-489.
17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-122.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* **334**:426-431.

20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* **174**:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* **174**:704-712.
22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* **170**:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukkink, 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 Virological Methods* **43**:177-187.
27. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354.
28. 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.
29. 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.
30. Myers, T.W. and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**:7661-7666.
31. 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.
32. 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.
33. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.
34. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
35. 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.
36. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
37. NCCLS. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. NCCLS Document M29-A Villanova, PA:NCCLS, 1997.
38. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

39. Yen-Lieberman, B., Brambilla, D., Jackson, B., Bremer, J., Coombs, R., Cronin, M. Herman, S., Katzenstein, D., Leung, S., Lin, H.J., Palumbo, P., Rasheed, S., Todd, J., Vahey, M., Reichelderfer, P. 1996. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trials Group virology laboratories. *Journal Clinical Microbiology* **34**:2695-2706.
40. Huang, D.D., Giesler, T.A. and Bremer, J.W., 2003. Sequence characterization of the protease and partial reverse transcriptase proteins of the NED panel, an international HIV type 1 podtype reference and standards panel, *AIDS Research and Human Retroviruses* **19**:320-328.



Sada High Pure System s vírusovou kyselinou nukleovou vyrobená pre:  
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA  
Člen skupiny Roche Group



COBAS TaqMan HIV-1 Test vyrobený:  
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA  
A Member of the Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics Corporation  
Indianapolis, IN 46256 USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center  
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.  
E-08006 Barcelona

Roche Diagnostics  
H7V 4A2 Laval, Quebec  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics  
F-38240 Meylan

Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics SpA  
Piazza Durante 11  
I-20131 Milano

Distribuidor em Portugal:  
Roche Farmacêutica Química, Lda  
P-2700 Amadora

Roche, CYTOVENE, INVIRASE, FORTOVASE, FUZEON, HIVID, ROFERON A, VALCYTE, AMPLICOR, AmpErase, AMPLILINK, AmpliPrep, COBAS, TaqMan, AMPLICOR HIV-1 MONITOR a High Pure sú obchodné známky člena skupiny Roche Group.

Roche Response Center je servisnou známkou člena Roche Group.

AGENERASE®, EPIVIR®, RETROVIR®, VALTREX®, ZIAGEN® a ZOVIRAX® sú registrované obchodné známky GlaxoSmithKline.

Armored RNA je patentovanou technológiou spoločne vyvinutou Ambion, Inc. a Cenetron Diagnostics, LLC. USA patenty #5,677,124, #5,919,625, a #5,939,262 a patenty v štádiu registrácie. Armored RNA® je registrovaná obchodná známka Ambion a Cenetron.

CRIXIVAN® je registrovaná obchodná známka Merck & Co., Inc.

INTRON®A je registrovaná obchodná známka Schering-Plough Corporation.

ProClin je obchodná známka Rohm and Haas Company. Microsoft a Windows XP sú registrované obchodné známky alebo obchodné známky Microsoft Corporation v USA a/alebo v iných krajinách.

KALETRA™ je ochranná známka a NORVIR® je registrovaná ochranná známka Abbott Laboratories.

SUSTIVA® je registrovaná obchodná známka DuPont Pharmaceuticals Company.

VIRACEPT® je registrovaná obchodná známka Agouron Pharmaceuticals Inc.

VIRAMUNE® je registrovaná obchodná známka Roxane Laboratories, Inc.

VIREAD® je registrovaná obchodná známka Gilead Sciences, Inc.

ZERIT® je registrovaná obchodná známka Bristol-Myers Squibb Company alebo jednej z jej divízií alebo dcérskych spoločností

Autorské práva 2003, Roche Molecular Systems, Inc. Všetky práva vyhradené.

9/2003

(03584291001-01ENGL)  
04498186001-01



Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim

