

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY IN VITRO.

COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0	HIVHP2	48 Tests	P/N: 05923468 190
High Pure System Viral Nucleic Acid Kit		48 Tests	P/N: 03502295 001

ÚČEL POUŽITÍ

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, verze 2.0 (v2.0) pro použití na systému High Pure je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny určený pro kvantifikaci RNA viru lidského imunodeficitu typu 1 (HIV-1) za použití soupravy High Pure System Viral Nucleic Acid pro manuální přípravu vzorku a analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci. Test dokáže kvantifikovat HIV-1 RNA v rozsahu od 34 do 10 000 000 kopií/ml (57 až $1,7 \times 10^7$ mezinárodních jednotek/ml). Jedna kopie HIV-1 RNA je ekvivalentní $1,7 \pm 0,1$ mezinárodních jednotek (IU) dle 1. mezinárodního standardu pro HIV-1 RNA Světové zdravotnické organizace (NIBSC 97/656)^{1,2}.

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

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure není určen k plošnému vyšetřování krve (skriningu) či krevních derivátů na přítomnost HIV-1, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem HIV-1.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je etiologickým agens syndromu získané imunodeficiency (AIDS)³⁻⁵. Infekce virem HIV se může přenést pohlavním stykem, stykem s infikovanou krví či krevními deriváty nebo z infikované matky na plod⁶. V průběhu tří až šesti týdnů od vystavení viru HIV se u infikovaných jedinců většinou vytvoří krátkodobý, akutní syndrom s příznaky podobnými chřipce a spojené s vysokými hladinami virémie v periferní krvi⁷⁻¹⁰. U nejvíce infikovaných osob následuje obvykle v době čtyř až šesti týdnů od prvních symptomů imunitní reakce specifická pro HIV a pokles virémie v plazmě^{11, 12}. Po sérokonverzi se u infikovaných osob obvykle dostavuje klinicky stabilní asymptomatická fáze, která může trvat i léta¹³⁻¹⁵. Pro asymptomatické období je charakteristická přetrvávající nízká virémie v plazmě¹⁶ a postupný pokles CD4⁺ T lymfocytů, což vede k závažné imunodeficienci, četným oportunním infekcím, malignitám a smrti¹⁷. Koncentrace virů v periferní krvi je sice během asymptomatické fáze infekce relativně nízká, nicméně replikace a odstraňování viru jsou dynamické procesy, kde je vysoká hodnota produkce viru a infekce buněk CD4⁺ vyvážena stejně vysokými hodnotami virové clearance, odumírání infikovaných buněk a doplňování lymfocytů CD4⁺, což vede k poměrně stálým hladinám plazmatické virémie a lymfocytů CD4⁺¹⁸⁻²⁰.

Kvantitativní měření virémie HIV v periferní krvi ukázala, že vyšší hladiny viru mohou být spojeny se zvýšeným rizikem klinické progresi onemocnění HIV a že snížení hladiny viru v plazmě může být spojeno se sníženým rizikem klinické progresi²¹⁻²³. Množství viru v periferní krvi může být kvantifikováno měřením antigenu HIV p24 v séru, kvantitativní kultivací HIV z plazmy nebo přímým měřením virové RNA v plazmě pomocí metod amplifikace nukleové kyseliny nebo technologiemi amplifikace signálu²⁴⁻²⁸.

Antigen p24 je hlavní protein jádra HIV a v séru se vyskytuje buď volně nebo vázaný na protilátku proti p24. Volný antigen p24 je možno měřit komerční soupravou pro enzymovou imunoanalýzu (EIA), ovšem jako marker virové zátěže má antigen p24 jen omezený význam, protože je detekovatelný jen u 20% asymptomatických pacientů a u 40–50% symptomatických pacientů. Citlivost testů na antigen p24 sice zvyšují postupy disociace komplexu antigen-protilátka, ale i tak zůstává tento virový protein u většiny asymptomatických pacientů nezjistitelný²⁴.

Infekční HIV v plazmě může být kultivován inokulací do aktivovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) od normálních dárců. Množství se stanovuje inokulací PBMC se sériovým ředěním vzorku plazmy. Pro sledování hladin viru u infikovaných osob má kvantitativní kultivace pouze omezený význam, protože jen malý podíl virových částí je infekčních *in vitro*. U asymptomatických osob je infekční virus často nedetekovatelný²⁴.

RNA HIV v plazmě může být kvantifikována pomocí technologií amplifikace nukleové kyseliny, například polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)²⁹⁻³¹. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure využívá technologii PCR pro dosažení maximální senzitivity a dynamického rozsahu pro kvantitativní detekci HIV-1 RNA v EDTA nesrážlivé plazmě.

PRINCIPY POSTUPU

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru lidského imunodeficitu typu 1 (HIV-1) v lidské plazmě. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure je založen na třech základních procesech: (1) izolace HIV-1 RNA pomocí manuální přípravy vzorku, (2) reverzní transkripce cílové RNA k vytvoření komplementární DNA (cDNA)³² a (3) simultánní PCR amplifikace³² cílové cDNA a detekce rozštěpené, dvojitě značené oligonukleotidové detekční sondy specifické pro cíl.

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure využívá manuální přípravu vzorku pomocí systému High Pure následovanou automatizovanou reverzní transkripcí, PCR amplifikací a detekcí cílové HIV-1 RNA a kvantifikačního standardu (QS) HIV-1 Armored RNA. Činidlo Master Mix obsahuje páry primerů a sondy specifické pro HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA. Činidlo Master Mix bylo vyvinuto pro zajištění ekvivalentní kvantifikace diverzních izolátů HIV-1. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a QS specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci ampikonu HIV-1 a HIV-1 QS.

Stanovení množství virové RNA HIV-1 se provádí pomocí kvantifikačního standardu HIV-1 QS. Ten kompenzuje účinky inhibitorů a kontroluje přípravné a amplifikační procesy, čímž umožňuje přesnější kvantifikaci HIV-1 RNA v každém vzorku. HIV-1 QS je neinfekční Armored RNA konstrukce, která obsahuje vazební oblasti pro primery HIV-1 v Master Mixu pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a unikátní vazebnou oblast pro sondu, která umožňuje odlišení ampikonu HIV-1 QS od cílového ampikonu HIV-1.

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

Volba cílové sekvence

Volba cílové sekvence RNA pro HIV-1 závisí na identifikaci oblastí v genomu HIV-1, která vykazuje maximální zachování sekvencí mezi různými izoláty HIV-1. Aby bylo možné určit vysokou genetickou variabilitu viru, jsou současně zacíleny dvě oblasti genomu HIV pro amplifikaci a detekci pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Dvě sondy specifické pro cílovou sekvenci a jedna pro QS dvojitě značené oligonukleotidová sonda umožňují nezávislou identifikaci ampikonu HIV-1 a HIV-1 QS, v2.0. Proto je patřičný výběr primerů a dvojitě značených oligonukleotidových sond důležitý pro schopnost testu amplifikovat a detekovat různé izoláty HIV-1. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure využívá reverzní transkripce a primery PCR amplifikace, které definují sekvence ve vysoce konzervované oblasti HIV-1 genu *gag*³³ a oblast HIV-1 LTR.

Příprava vzorku

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure zpracovává vzorky EDTA plazmy a izoluje HIV-1 RNA pomocí generické manuální přípravy vzorku založené na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna. Procedura zpracovává 500 µl plazmy. Virové částice HIV-1 jsou rozloženy inkubací při zvýšené teplotě s proteázou a chaotropními lytickým/vazebným puřrem, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou HIV-1 RNA před působením RNáz v plazmě. Proteáza a známý počet molekul HIV-1 QS Armored RNA jsou přidány do každého vzorku spolu s lytickým činidlem. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s vložkou ze skelného vlákna. Během centrifugace jsou HIV-1 RNA a kvantifikační standard HIV-1 RNA navázané na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Absorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a eluovány vodným roztokem. Spotřební materiál umožňuje paralelní zpracování 12 vzorků nebo jejich násobků. Zpracovávají vzorky obsahující HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA jsou přidány k amplifikační/detekční směsi a přeneseny do analyzátoru COBAS® TaqMan® 48. Cílové HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA jsou vystaveny reverzní transkripci a následně amplifikovány a simultánně detekovány štěpením dvou HIV-1 specifických a jedné QS specifické, dvojitě značené oligonukleotidové sondy.

Reverzní transkripce a PCR amplifikace

Reverzní transkripce

Reverzní transkripce a amplifikační PCR reakce je prováděna pomocí termostabilního rekombinantního enzymu DNA polymerázy Z05 druhu *Thermus specie Z05*. Za přítomnosti manganu (Mn^{2+}) a při vhodných puřrovcích podmínkách vykazuje Z05 aktivitu jak reverzní transkriptázy, tak polymerázy DNA³². To umožňuje reverzní transkripci a PCR amplifikaci spolu detekcí ampliconů v reálném čase.

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (K-zkumavkách) nebo v amplifikačních zásobnicích (K-zásobnicích), kde probíhá jak reverzní transkripce, tak PCR amplifikace. Reakční směs se zahřívá, aby se downstream primery napojily specificky na cílovou HIV-1 RNA a na kvantifikační standard HIV-1 QS RNA. V přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs), mezi něž patří deoxyadenozin, deoxyguanozin, deoxycytidin, deoxyuridin a deoxythymidin trifosfáty, polymerizuje Z05 polymeráza hybridizované primery za vzniku vláken DNA komplementárního k cílové RNA.

Amplifikace cíle

Po reverzní transkripci cílové RNA HIV-1 a RNA kvantifikačního standardu RNA HIV-1 se reakční směs zahřívá, aby se RNA:cDNA hybrid denaturoval a odhalily se cílové sekvence primeru. Během ochlazování směsi se upstream primery připojují specificky k řetězci cDNA, Z05 primer produkuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se uzavírá první cyklus PCR, poskytující dvouřetězcovou DNA kopii cílových oblastí HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA. Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouvláknové DNA a exponování cílových sekvencí primeru. Při chladnutí směsi se primery připojí k cílové DNA. Z05 v přítomnosti Mn^{2+} a nadbytku dNTP polymerizuje hybridizované primery podél cílových templátů za vzniku molekuly dvouvláknové DNA nazývané amplicon. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces pro určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství ampliconové DNA. Požadovaný počet cyklů se na analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblastech genomu HIV-1 mezi primery; celý genom HIV-1 amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje destrukci vláken DNA obsahujících deoxyuridin³⁴, ale přitom vynechává DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v ampliconu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplicon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplicon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažen ve směsi činidla Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozerváním deoxyribosového řetězce v pozici C1. Když je řetězec ampliconové DNA v prvním tepelně cyklickém kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55 °C, tzn. v průběhu tepelně cyklického kroku a proto nerozkládá cílový amplicon vzniklý po reverzní transkripci a amplifikaci.

Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure

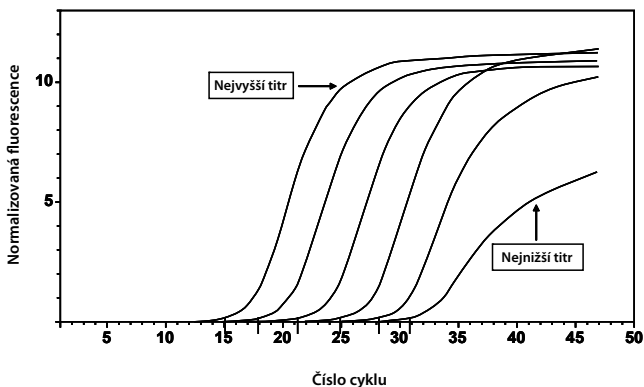
Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure využívá v reálném čase probíhající^{35, 36} PCR technologii. Použití dvojitě značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního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

Základy kvantifikace u testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure poskytuje přesně kvantitativní výsledky ve velmi širokém dynamickém rozmezí, protože monitorování amplikonu je prováděno v exponenciální fázi amplifikace. Čím vyšší je titr HIV-1 ve vzorku, tím dříve překročí fluorescence oznamovacího barviva HIV-1 sondy základní hladinu fluorescence (obrázek 1). Protože je množství HIV-1 QS RNA konstantní ve všech vzorcích, tak by se měla fluorescence oznamovacího barviva sondy HIV-1 QS objevit ve stejném cyklu u všech vzorků (obrázek 2). Ve vzorcích, v nichž je fluorescence QS postižena, je koncentrace upravena odpovídajícím způsobem. Objevení specifického fluorescenčního signálu je hlášeno jako kritická prahová hodnota (Ct). Ct je definována jako dílčí číslo cyklu, kdy fluorescence oznamovacího barviva překročí přednastavenou prahovou hodnotu fluorescence (Určenou fluorescenční hladinu) a začne exponenciální růstovou fází tohoto signálu (obrázek 3). Vyšší Ct hodnota značí nižší titr iniciální cílové HIV-1 RNA. Dvojnásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 1 Ct pro cílovou HIV-1 RNA, zatímco desetinásobný vzestup titru koreluje s poklesem o 3,3 Ct.

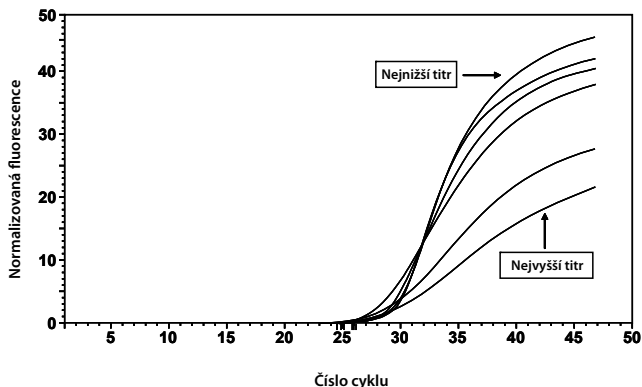
Obrázek 1 ukazuje cílové růstové křivky pro sérii ředění viru v rozsahu 5-log₁₀. Jakmile koncentrace viru narůstá, růstové křivky se posouvají do dřívějších cyklů. Proto růstová křivka nejvíce vlevo odpovídá nejvyššímu titru viru, zatímco růstová křivka nejvíce vpravo odpovídá nejnižšímu titru viru.

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



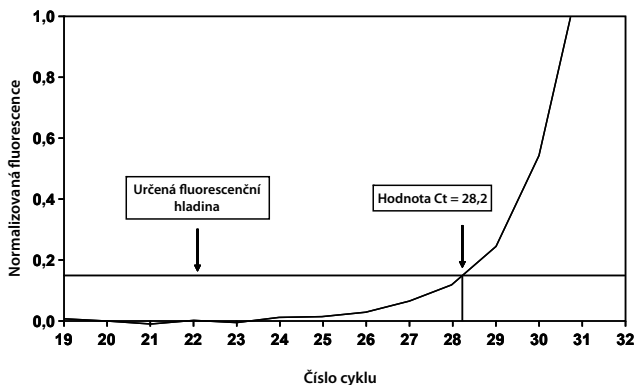
Obrázek 2 ukazuje růstové křivky kvantifikačního standardu pro vzorky ze sérií ředění viru v rozsahu 5-log_{10} . Množství kvantifikačního standardu přidaného do každého vzorku je konstantní pro každou reakci. Ct hodnota kvantifikačního standardu je podobná bez ohledu na titer viru.

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



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

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



Stanovení množství HIV-1 RNA

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

Při hybridizační fázi PCR reakce v analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 jsou vzorky osvětleny a excitovány filtrovaným světlem a filtrovaná emisní fluorescenční data jsou shromažďována pro každý vzorek. Hodnoty pro každý vzorek jsou poté korigovány na kolísání hodnot zařízení. Tyto hodnoty fluorescence jsou odeslány zařízením do softwaru AMPLILINK a uloženy v databázi. Pre-Checks (kontroly) se používají pro stanovení, zda-li HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA data reprezentují sady, které jsou platné a indikátorové záložky jsou generovány v případě, že data leží mimo nastavené limity. Po dokončení a splnění všech kontrol jsou odečteny fluorescence zpracovány pro generování Ct hodnot pro HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA. Kalibrační konstanty specifické pro sérii poskytované spolu s testem COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure jsou používány pro kalkulaci hodnoty titru pro vzorky a kontroly založené na Ct hodnotách HIV-1 RNA a HIV-1 QS RNA. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure je standardizován vůči referenčnímu materiálu Světové zdravotnické organizace HIV-1 RNA^{1,2,37}. Výsledné titry jsou udávány v kopiích/ml. Konverzní faktor mezi udaným počtem HIV-1 RNA kopií/ml a HIV-1 mezinárodních jednotek/ml byl stanoven společností Roche Molecular Systems, Inc. na hodnotu 0,6 kopií/1IU (1,7 IU/kopii).

ČINIDLA

High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid
(P/N: 03502295 001)

48 testů

LYS

(Lytický/vazebný pufr)

Tris

52% guanidin-HCl

< 1% Urea

20% Triton X-100

Xn 52% (hm.) guanidin-HCl



Zdraví škodlivý

R22: Zdraví škodlivý při požití.

R36/38: Dráždí oči a kůži.

R41: Nebezpečí vážného poškození očí.

S24: Zamezte styku s kůží.

S26: Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou
a vyhledejte lékařskou pomoc.

S39: Používejte osobní ochranné prostředky pro oči a obličej.

2 x 25 ml

CAR

(RNA, lyofilizovaná)

2 x 2 mg

PK

2 x 100 mg

(Proteináza K, lyofilizovaná)

99% Proteináza K, lyofilizovaná

Xn 99% Proteináza K, lyofilizovaná



Zdraví škodlivý

R36/37/38: Dráždí oči, dýchací orgány a kůži.

R42/43: Může vyvolat senzibilizaci při vdechování a při styku s kůží.

S22: Nevdechujte prach.

S24/25: Zamezte styku s kůží a očima.

S26: Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou
a vyhledejte lékařskou pomoc.S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice
a ochranné brýle nebo obličejový štít.**IRB**

1 x 33 ml

(Pufr na odstraňování inhibitorů)

Tris

65% (hm.) guanidin-HCl

(přidejte 20 ml ethanolu)

Xn 65% (hm.) guanidin-HCl



Zdraví škodlivý

R22: Zdraví škodlivý při požití.

R36/38: Dráždí oči a kůži.

S26: Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou
a vyhledejte lékařskou pomoc.**WASH**

1 x 20 ml

(Promývací pufr)

Tris

NaCl

(přidejte 80 ml ethanolu)

ELB

1 x 30 ml

(Eluční pufr)

RS

4 kusy

(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

Lytický stojan

Stojan filtrační zkumavky s připevněným odpadním stojanem

Eluční stojan

Krycí stojan

WR

8 kusů

(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

Příprava vzorku a kontrolní činidla

HIV-1 QS, v2.0

2 x 1,0 ml

(HIV-1 kvantifikační standard, v2.0)

Pufr Tris-HCl

EDTA

< 0,001% Armored RNA konstrukce obsahující HIV-1 vazebné sekvence primeru a unikátní vazebnou oblast sondy (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)

Amarantové barvivo

< 0,005% Poly rA RNA (syntetická)

0,05% azid sodný

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

2 x 1,0 ml

[HIV-1 vysoce (+) kontrola, v2.0]

< 0,001% Armored RNA konstrukce obsahující HIV-1 sekvence (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)

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

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi Směs 5-chloro-2-metyl-4-izotiazolin-3-on a 2-metyl-4-izotiazolin-3-on v poměru 3:1



Dráždivý

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

S24: Zamezte styku s kůží.

S37: Používejte vhodné ochranné rukavice.

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

2 x 1,0 ml

[HIV-1 nížce (+) kontrola, v2.0]

< 0,001% Armored RNA konstrukce obsahující HIV-1 sekvence (neinfekční RNA v bakteriofágu MS2)

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

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi Směs 5-chloro-2-metyl-4-izotiazolin-3-on a 2-metyl-4-izotiazolin-3-on v poměru 3:1



Dráždivý

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

S24: Zamezte styku s kůží.

S37: Používejte vhodné ochranné rukavice.

CTM (-) C

4 x 1,0 ml

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

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

0,1% konzervant ProClin® 300

Xi Směs 5-chloro-2-metyl-4-izotiazolin-3-on a 2-metyl-4-izotiazolin-3-on v poměru 3:1



Dráždivý

R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.

S24: Zamezte styku s kůží.

S37: Používejte vhodné ochranné rukavice.

Amplifikační a detekční činidla

HIV-1 MMX, v2.0

(Master Mix COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0)

Tricinový pufr

Hydroxid draselný

Octan draselný

< 20% dimethyl sulfoxid

Glycerol

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

< 0,001% HIV-1 primery

< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)

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

< 0,001% fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy

specifické pro HIV-1 a kvantifikační standard HIV-1

0,09% azid sodný

2 x 24 testů

2 x 1,4 ml

CTM Mn²⁺

(Roztok manganu COBAS® TaqMan®)

< 1,2% Octan manganatý

Ledová kyselina octová

0,09% azid sodný

2 x 24 testů

2 x 1,0 ml

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test je určen pouze pro použití s lidskou plazmou odebranou do antikoagulačního činidla EDTA.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V laboratorních prostorech nejzte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředek pro ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. ***Při odebrání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikro-biální nebo ribonukleázové kontaminaci.***
- F. ***Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a pipetovací špičky bez RNázy.***
- G. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav.
- I. Nespotebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- J. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- K. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- L. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ a v dokumentu CLSI M29-A3³⁹. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného v deionizované či destilované vodě.

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

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

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

- N. **HIV-1 MMX, v2.0, HIV-1 QS, v2.0 a CTM Mn²⁺** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- O. Při práci s jakýmkoliv činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozsyjou, rozřeďte je vodou a dosucha vytřete.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

Činidla pro přípravu vzorků

- A. Po přijetí skladujte činidla pro soupravu High Pure System Viral Nucleic Acid při teplotě 15–25 °C.
- B. Skladujte elučňi pufr (**ELB**) a lytický/vazebný pufr (**LYS**) při 15–25 °C. Po otevření skladujte **ELB** a **LYS** při teplotě 15–25 °C. Otevřené **ELB** a **LYS** musí být spotřebovány během 30 dní nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- C. Po přidání elučňního pufru (**ELB**) k rekonstituované nosičové RNA a proteináze K, skladujte nespoteřovanou rekonstituovanou nosičovou RNA (**CAR**) a nespoteřovanou rekonstituovanou proteinázu K (**PK**) při -15 až -25 °C. Po rekonstrukci musí být nosičová RNA a proteináza K spotřebovány během 30 dnů nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- D. Po přidání etanolu uchovávejte pufr pro odstranění inhibitorů (**IRB**) a promývací pufr (**WASH**) při teplotě 15–25 °C. Tyto pracovní roztoky jsou stabilní po dobu 30 dnů nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- E. Lytický/vazebný pracovní roztok [lytický/vazebný pufr s nosičovou RNA, proteináza K a **HIV-1 QS, v2.0**] musí být spotřebovány okamžitě po přípravě. Jakýkoliv nadbytek musí být zlikvidován.

Amplifikační a detekční činidla

- A. **Činidla ani kontroly nezmrazujte.**
- B. Skladujte **HIV-1 MMX, v2.0, CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C, **v2.0, HIV-1 H(+)**C, **v2.0, HIV-1 QS, v2.0 a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8 °C. Pokud nebyly otevřeny, jsou tyto činidla stabilní do uvedeného data použitelnosti. Po otevření pro odebrání alikvotní části pro velikost šarže o 12 vzorcích, uskladněte zbývající **HIV-1 MMX, v2.0, HIV-1 L(+)**C, **v2.0, HIV-1 H(+)**C, **v2.0, HIV-1 QS, v2.0 a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8 °C. Po otevření jsou **HIV-1 MMX, v2.0, HIV-1 L(+)**C, **v2.0, HIV-1 H(+)**C, **v2.0, HIV-1 QS, v2.0 a CTM Mn²⁺** při teplotě 2–8 °C stabilní po dobu 30 dnů nebo do doby použitelnosti na obalu, dle toho, která je kratší.
- C. Po otevření je třeba jakoukoliv nespoteřovanou část **CTM (-) C** zlikvidovat.
- D. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **CTM Mn²⁺** do **HIV-1 MMX, v2.0**) musí být uchováván při teplotě 2–8 °C v temnu. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 2 hodin od přípravy pracovního Master Mixu.
- E. Zpracované vzorky a kontroly jsou stabilní až 2 hodiny při teplotě 4–30 °C.
- F. S amplifikací je třeba začít do 1 hodiny od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního Master Mix.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Činidla pro přípravu vzorků

- A. **High Pure System Viral Nucleic Acid Kit**
Souprava High Pure System Viral Nucleic Acid
(P/N: 03502295 001)

LYS

(Lytický/vazebný pufr)

CAR

(Nosičová RNA)

PK

(Proteináza K)

IRB

(Pufr na odstraňování inhibitorů)

WASH

(Promývací pufr)

ELB

(Eluční pufr)

RS

(Stojanová souprava systému High Pure System Viral Nucleic Acid)

WR

(Odpadní stojan High Pure System Viral Nucleic Acid)

Amplifikační a detekční činidla

- B. **COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0**
(P/N: 05923468 190)

HIVHP2

HIV-1 QS, v2.0

(HIV-1 kvantifikační standard)

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

[HIV-1 High (+) kontrola]

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

[HIV-1 Low (+) kontrola]

CTM (-) C

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

HIV-1 MMX, v2.0

(Master Mix COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0)

CTM Mn²⁺

(Roztok manganu COBAS® TaqMan®)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- Software AMPLILINK, verze 3.3
- Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou
- Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p 630**
- Držák K-nosiče (P/N: 03287696001)
- Přemísťovač K-nosičů (P/N: 03517519001)
- Uzavírací nástroj K-zásobníků (P/N: 03339904001)

- Nosič K-zásobníku (P/N: 03341488001)
- Motorizovaný víčkovač K-zkumavek (P/N: 03516539001)
- K-nosič (P/N: 28150397001)

Spotřební materiál

- Box s K-zásobníky 24 ks (P/N: 03343146001)
- Box s K-zkumavkami v počtu 12 x 96 (P/N: 03137082001)

Požadavky na centrifugu

- Stolní centrifuga Sigma 4-15C nebo ekvivalentní mikrotitrační destičková centrifuga s centrifugačním výkonem 4600 x g
- Vychylující rotor centrifugy Sigma P/N: 11118 (včetně 2 nádob P/N: 13218 a 2 držáků destiček P/N: 17978) nebo ekvivalentní

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Isopropanol (> 99%) - vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Ethanol (96–100%) – vyhovuje ACS specifikacím nebo lepší
- Nastavitelné pipety:* (objem 250 µl a 1000 µl) s aerosolovou bariérou nebo špičkami bez RNázy s přímým vypuzováním
- Pipetovací pomůcka: Drummond (P/N: 4-000-100) nebo ekvivalentní
- Vodní lázeň nastavená na 50 °C (± 2 °C)
- Vyhřívací blok nastavený na 70 °C (± 2 °C)
- Jednorázové sérologické sterilní pipety : 5, 10 a 25 ml
- Sterilní polypropylenové kónické zkumavky; 15 ml a 50 ml: Corning (P/N: 430052 a P/N: 430290) nebo ekvivalentní
- Sterilní 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky: Sarstedt (P/N: 72.693.005) nebo ekvivalentní
- Vříhový mixér
- Stojany na zkumavky
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Kalibrované teploměry pro vodní lázeň a vyhřívací blok

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

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

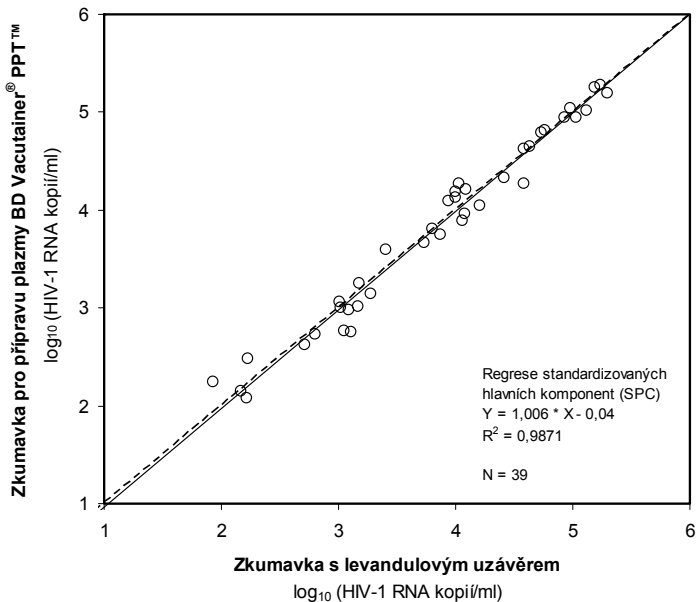
Poznámka: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

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

A. Odběr vzorků

Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure se používá pouze pro vzorky EDTA plazmy. Krev se odebírá do sterilních zkumavek s obsahem EDTA jako antikoagulantu a adekvátně promíchána podle pokynů výrobce zkumavky. Je možné použít zkumavky s uzávěrem levandulové barvy EDTA nebo zkumavky s uzávěrem bílé barvy pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™ (zkumavka BD PPT™). Zkumavka BD PPT™ obsahuje suchou K₂EDTA a separační gel. Na obrázku 4 je srovnání titru viru HIV-1 RNA vzorků odebraných do zkumavek s uzávěrem levandulové barvy a do zkumavek BD PPT™ od 39 dárců pozitivních na HIV-1. Zkumavky BD PPT™ byly odebrány, odstředěny, dekantovány a plazma byla zmrazena do 6 hodin po odběru.

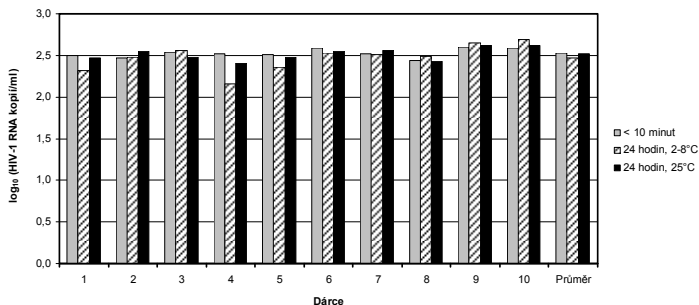
Obrázek 4
Srovnání virové zátěže HIV-1 RNA ve zkumavkách s levandulovým uzávěrem
a zkumavkách pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™



Zkumavky EDTA s levandulovým uzávěrem

Po smíchání dle pokynů výrobce zkumavek skladujte plnou krev odebranou do EDTA zkumavek s levandulovým uzávěrem při 2–25 °C ne déle než 24 hodiny. Separujte plazmu od buněčných komponent do 24 hodin od odběru, a to odstředováním za pokojové teploty po dobu 20 minut při otáčkách 800–1600 x g. Plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky. Obrázek 5 ukazuje vliv skladovacích podmínek plné krve na titr HIV RNA měřený testem COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Plná krev byla odebrána do zkumavek s levandulovým uzávěrem od normálních dárců a HIV-1 byl přidán do HIV-1 RNA titru přibližně 330 kopií/ml. Připravené alikvotní podíly byly skladovány v různých podmínkách, zpracovány s plazmou a poté testovány pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.

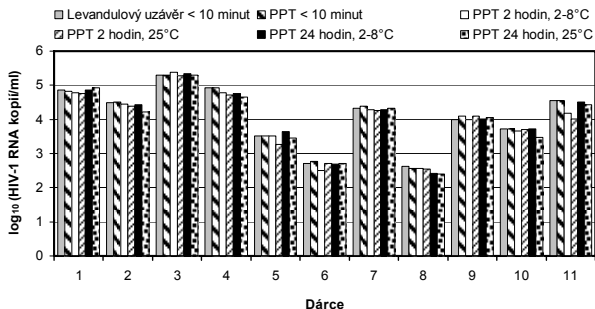
Obrázek 5
Stabilita HIV-1 v plné krvi odebrané do EDTA zkumavek
s levandulovým uzávěrem před separací plazmy



Zkumavky pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™

Po smíchání dle pokynů výrobce zkumavek skladujte plnou krev odebranou do zkumavek BD PPT™ při 2–25 °C ne déle než 24 hodiny. Míchání nebo manipulace se zkumavkami BD PPT™ jiným než uvedeným způsobem může vést k odchylkám výsledků virové nálože HIV-1. Separujte plazmu od buněčných komponent do 24 hodin od odběru, a to odstředováním v centrifuze s vychylujícím rotorem za pokojové teploty po dobu 20 minut při otáčkách 1100 x g. Plazmu převedte do sterilní polypropylenové zkumavky. Obrázek 6 ukazuje vliv skladovacích podmínek plné krve na titer HIV-1 RNA měřený testem COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Plná krev byla odebrána od dárců pozitivních na HIV-1 do jedné zkumavky s levandulovým uzávěrem a do pěti zkumavek BD PPT™. Po promíchání byly zkumavky skladovány za podmínek uvedených na obr. 6. Poté byla plazma separována a zmrazena až do okamžiku testování pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.

Obrázek 6
Stabilita HIV-1 v plné krvi odebrané do zkumavek
pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™ před separací plazmy



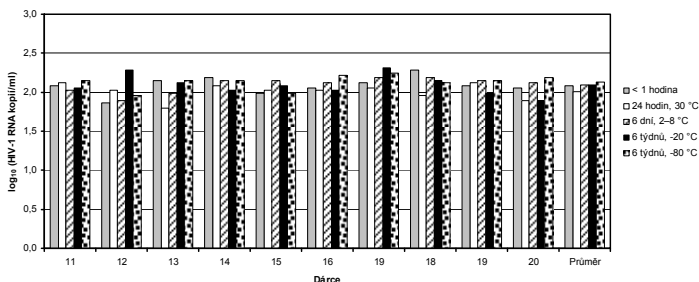
B. Přeprava vzorků

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

C. Uchování vzorků

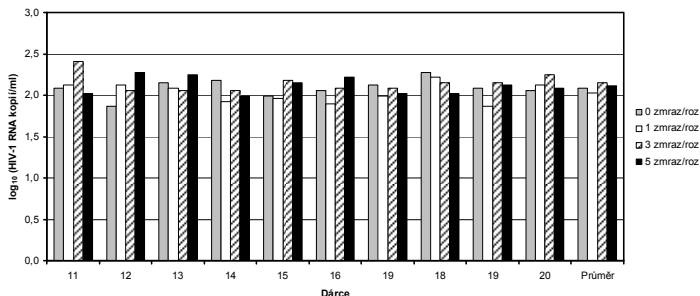
Vzorky plazmy je možno uchovávat při pokojové teplotě maximálně 1 den, při teplotě 2–8 °C do 6 dnů nebo ve zmrazeném stavu při teplotách -20 °C až -80 °C. Doporučuje se uchovávat vzorky v alikvotních podílech po 800–900 µl ve sterilních polypropylenových zkumavkách o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (např. Sarstedt P/N: 72.694.006). Obrázek 7 ukazuje výsledky studie stability prováděné pomocí testu COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure na vzorcích plazmy od normálních dárců, s HIV-1 přidaným do HIV-1 RNA titru přibližně 124 kopií/ml.

Obrázek 7
Stabilita HIV-1 v EDTA plazmě



Vzorky plazmy mohou být zmrazeny a rozmrazeny maximálně pětkrát bez významné ztráty HIV-1 RNA. Obrázek 8 ukazuje výsledky studie stability při zmrazení-rozmrazení prováděné pomocí testu COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure na vzorcích plazmy od normálních dárců, s HIV-1 přidaným do HIV-1 RNA titru přibližně 124 kopií/ml.

Obrázek 8
Stabilita HIV-1 v EDTA plazmě při zmrazení a rozmrazení



NÁVOD K POUŽITÍ

Poznámka: *Detailní provozní pokyny, popis k tisku výsledků a k interpretaci příznaků, komentářů a chybových hlášení najdete v uživatelské příručce pro zařízení COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou softwaru AMPLICOR®, verze 3.2 a 3.3 a s aplikační příručkou softwaru AMPLICOR® verze 3.3 k zařízení COBAS® AmpliPrep, analyzátoru COBAS® TaqMan®, analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 a analyzátoru COBAS® AMPLICOR® a zařízení cobas p 630.*

Poznámka: *Všechna amplifikační a detekční činidla musí být před použitím při pokojové teplotě. Vyjměte je z teploty 2–8 °C minimálně 30 minut před použitím.*

Poznámka: *Vzorky plazmy a kontrol musí být před použitím temperovány po dobu 15–30 minut na teplotu okolí.*

Poznámka: *Kde je tak uvedeno, používají se pipetory se špičkami s aerosolovou bariérou nebo s přímým vypuzováním. Věnujte maximální pozornost zabránění kontaminace.*

Velikost cyklu

Každá souprava obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři cykly o 12 testech, které mohou probíhat zvlášť nebo současně. Jeden replikát, každý z CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 a HIV-1 H(+)C, v2.0 musí být zahrnut do každého cyklu testu s až 24 vzorky a kontrolami (viz část „Kontrola kvality“). Amplifikační a detekční činidla jsou balena v 24-testových lahvičkách na dvě použití. Pro co nejeefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

Příprava vzorku a kontroly

Poznámka: *Používáte-li zmrazené vzorky plazmy, ponechte je při pokojové teplotě dokud kompletně nerozmrznou a nechte je 5–10 sekund před použitím vířit.*

Poznámka: *Umožněte, aby činidla před dalším postupem dosáhla teploty okolí. Předehřejte vyhřívací blok(y) na teplotu 70 °C (± 2 °C) a vodní lázeň na teplotu 50 °C (± 2 °C) předtím, než zahájíte purifikační reakce.*

A. Příprava činidel

Poznámka: *Připravte lytický/vazebný pracovní roztok až poté, co necháte teplotu všech vzorků a kontrol vyrovnávat na okolní teplotu po dobu 15–30 minut.*

1. Připravte pufr pro odstranění inhibitorů pipetováním 20 ml 96–100% ethanolu do pufru pro odstranění inhibitorů (IRB). Promíchejte 5–10násobným obrácením. To zajistí dostatek rekonstituovaného pufru pro odstranění inhibitoru na 48 testů.
2. Připravte promývací pufr pipetováním 80 ml 96–100% ethanolu do promývacího pufru (WASH). Promíchejte 5–10násobným obrácením. To zajistí dostatek rekonstituovaného promývacího pufru na 48 testů.
3. Předehřejte elučňi pufr (ELB) na teplotu 70 °C (± 2 °C) v mikrocentrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem o objemu 2,0 ml. Je možné použít více zkumavek. Elučňi objem na vzorek je 75 µl. Předehřejte objem uvedený v tabulce níže dle počtu testů.

	Počet replikátů	
Činidlo	12	24
Elučňi pufr (ml)	2,0	4,0

4. Pipetujte objem isopropanolu uvedený v tabulce níže dle počtu testů do čisté sterilní zkumavky.

	Počet replikátů	
Činidlo	12	24
Isopropanol (ml)	5,0	10,0

- Napipetujte 500 µl elučňního pufru (**ELB**) do nosičové RNA (**CAR**). Vyměřte uzávěr, otočte lahvičkou a pak jí míchejte, dokud se veškerá nosičová RNA nerozpustí. Rekonstituovaná nosičová RNA je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované nosičové RNA může být uchováván při teplotě -15 až -25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.
- Pipetujte 5,0 ml elučňního pufru (**ELB**) do proteinázy K (**PK**). Vyměřte uzávěr, otočte lahvičkou a pak jí míchejte vířením, dokud se veškerá proteináza K nerozpustí. Rekonstituovaná proteináza K je dostačující pro 24 testů. Nepoužitý objem rekonstituované proteinázy K může být uchováván při teplotě -15 až -25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší.
- Připravte lytický/vazebný pracovní roztok následujícím způsobem pipetováním objemů uvedených v následující tabulce dle počtu vzorků a kontrol, které mají být zpracovány.

Činidla	Počet replikátů	
	12	24
Lytický/vazebný pufr (ml)	7,0	14,0
Nosičová RNA (µl)	140	280
HIV-1 QS, v2.0 (µl)	84	168
Proteináza K (ml)	1,4	2,8

Poznámka: *Objem HIV-1 QS, v2.0 je specifický pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.*

Poznámka: *Pokud je třeba použít zmrazenou rekonstituovanou nosičovou RNA nebo proteinázu K, rozpustte je při pokojové teplotě a před použitím je několikrát obraťte.*

- Přidejte uvedený objem lytického/vazebného pufru do čisté sterilní zkumavky o objemu 50 ml.
- Přidejte uvedený objem rekonstituované nosičové RNA do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr.
- Vířením míchejte **HIV-1 QS, v2.0** po dobu 3–5 sekund a přidejte uvedený objem **HIV-1 QS, v2.0** do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr a rekonstituovanou nosičovou RNA.
- Zkumavku uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15krát převrátíte. **NEMÍCHEJTE** vířením – víření vytváří v roztoku bubliny.
- Přidejte uvedený objem rekonstituované proteinázy K do zkumavky obsahující lytický/vazebný pufr.
- Zkumavku uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15krát převrátíte. **NEMÍCHEJTE** vířením – víření vytváří v roztoku bubliny. Začněte rozdělávat lytický/vazebný pracovní roztok okamžitě po přidání a míchání proteinázy K s lytickým/vazebným puforem.
- Nepoužitý lytický/vazebný pufr (**LYS**) může být uchováván při teplotě 15 až 25 °C po dobu maximálně 30 dní nebo do doby použitelnosti, dle toho, která doba je kratší. Nespotebovaný lytický/vazebný pracovní roztok je třeba zlikvidovat.

B. Příprava vzorku a kontroly

Poznámka: *Pro tuto proceduru jsou doporučovány nastavitelné pipety se špičkami odolnými vůči aerosolům.*

Poznámka: *V krocích 1, 14, 16, 19 a 22 může být použita opakovací pipeta s vhodnou velikostí sterilní kombinované špičky. Je však třeba dávat velký pozor, aby se předešlo rozstříknutí činidel a zkřížené kontaminaci.*

Poznámka: *Dávejte si pozor, aby během celého postupu nedošlo k rozstříknutí lytického/vazebného pracovního roztoku, vzorku, kontroly a izopropanolu na nalepovací oblast mezi jamku a víčko na okraji každé jamky.*

Poznámka: *Používejte rukavice, které obsluhuje dobře padnou. Často měňte rukavice, zvláště po manipulaci s pozitivními kontrolami a otevření plných zkumavek z lytického stojanu. Nikdy se nedotýkejte se vnitřní části víček (např. při otvírání nebo zavírání).*

Poznámka: *Při manipulaci se soupravami kontrol a klinickými vzorky vložte negativní kontrolu před zpracováním soupravy pozitivních kontrol.*

1. Pipetujte 625 µl lytického/vazebného roztoku do každé jamky v lytickém stojanu (I, transparentní). Zabraňte pokapání nalepovací oblasti mezi jamkou a víčkem na okraji každé jamky. Jemně zatlačte na víčka tak, aby přikrývala jamky. Nepoužívejte zamykací mechanismus.
2. Při postupném otevření vždy jen jedné jamky opatrně pipetujte 500 µl vzorku nebo kontroly do odpovídající jamky. Zabraňte pokapání nalepovací oblasti mezi jamkou a víčkem na okraji každé jamky. Po přidání každého vzorku nebo kontroly přitlačte víčko. Začněte u závěsu víčka a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.
3. Poté, co byly přidány všechny vzorky a kontroly, promíchejte naplněný lytický stojan vířením po dobu přibližně 10 sekund. Nemíchejte příliš prudce. Vizually si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
4. Opatrně umístěte lytický stojan do vodní lázně předehřáté na 50 °C (± 2 °C), tak aby nedošlo k vystříknutí. Inkubujte lytický stojan 10 minut. Během inkubace by měl být lytický stojan ponořený, ale nesmí plavat. Ujistěte se, že horní část lytického stojanu mezi jamkami zůstane během inkubace suchá. Po vynětí z vodní lázně pečlivě osušte horní i spodní část lytického stojanu.
5. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzě. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
6. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na závěs víčka uvolníte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do každé jamky napipetujte 350 µl isopropanolu. Vždy po přidání mírným tlakem na víčko směrem od závěsu víčka uzavřete jamku. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.

Poznámka: *Objem izopropanolu je specifický pro každý test COBAS® TaqMan®.*

7. Zrakem zkontrolujte, zda jsou všechny jamky uzavřené. Míchejte vzorky převrácením stojanu třikrát a následným vířením stojanu po dobu přibližně 10 sekund. Nemíchejte příliš prudce. Vizually si ověřte, že byly všechny jamky dobře vířením promíchány.
8. Centrifugujte lytický stojan po dobu 10–20 sekund při nastavení 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzě. Centrifuga nemusí dosáhnout nastavenou rychlost. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
9. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na závěs víčka uvolníte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do odpovídajících jamek na stojanu filtrační zkumavky (II, žlutý) s připevněným odpadním stojanem (bílý) přeneste 750 µl směsi vzorku nebo kontroly. Po přidání směsi každého vzorku nebo kontroly přitlačte víčko. Začněte u závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku.
10. Po přidání všech vzorků nebo kontrol centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuzě. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
11. Vždy v jednom okamžiku mějte otevřenou jen jednu jamku. Jemným tlakem na závěs víčka uvolníte zamykací mechanismus, zvedněte víčko jamky a do odpovídajících jamek na stojanu filtrační zkumavky přeneste zbývající směs vzorku nebo kontroly. Po přidání směsi každého vzorku nebo kontroly přitlačte víčko. Začněte u závěsu a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete jamku. Lytický stojan odpovídajícím způsobem zlikvidujte.

12. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
13. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadejte stojan filtračních zkumavek do odpadního stojanu.
14. Otevřete všechna víčka stojanu filtračních zkumavek a pipetujte 400 µl pufru pro odstranění inhibitorů (IRB) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání pufru pro odstranění inhibitorů do všech jamek přitlačte každé víčko. Začněte u závěsu víčka a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčko.
15. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
16. Otevřete všechna víčka stojanu filtračních zkumavek a pipetujte 700 µl promývacího pufru (WASH) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání promývacího pufru do všech jamek přitlačte každé víčko. Začněte u závěsu víčka a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčko.
17. Centrifugujte soustavu stojanu filtrační zkumavky po dobu 2 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
18. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Znehodnoťte odpadní stojan. Vyměňte za nový odpadní stojan a zasadejte stojan filtračních zkumavek do odpadního stojanu.
19. Otevřete všechna víčka stojanu filtračních zkumavek a pipetujte 700 µl promývacího pufru (WASH) po stěně každé jamky. **Nedotýkejte se stran jamky.** Po přidání promývacího pufru do všech jamek přitlačte každé víčko. Začněte u závěsu víčka a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčko.
20. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
21. Vyjměte stojan filtrační zkumavky z odpadního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtračních zkumavek. Umístěte stojan filtrační zkumavky do elučního stojanu (IIIA, modrý) a zasadejte stojan filtrační zkumavky do elučního stojanu. Znehodnoťte odpadní stojan odpovídajícím způsobem.
22. Otevřete všechna víčka stojanu filtračních zkumavek a pipetujte 75 µl předeřhřátého elučního pufru (ELB) do středu každého filtru, aniž byste se ho dotkli.

Poznámka: Nepřidávejte eluční pufr dávkováním po stěně jamky.

Po přidání elučního pufru do všech jamek přitlačte každé víčko. Začněte u závěsu víčka a jemně přitlačte směrem dolů. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete víčko.

23. Eluční stojan inkubujte při pokojové teplotě po dobu minimálně 3 minut po přidání elučního pufru do poslední jamky.
24. Centrifugujte soustavu stojanu filtračních zkumavek po dobu 3 minut při 4600 x g v mikrotitrační destičkové centrifuze. Zrakem zkontrolujte hladinu kapaliny v každé jamce, zda nedošlo k žádnému úniku. Jestliže zjistíte únik, nepokračujte.
25. Vyjměte stojan filtračních zkumavek z elučního stojanu stisknutím obou uzavíracích spojení na horní straně stojanu filtrační zkumavky. Znehodnoťte stojan filtračních zkumavek odpovídajícím způsobem.
26. Umístěte krycí stojan (IIIB, modrý) do elučního stojanu (IIIA, modrý). Silně stiskněte a uzavřete spojení na elučním stojanu. Mírným tlakem na víčko směrem od závěsu víčka uzavřete jamku. Pokračujte v jemném tlaku přes střed víčka a zabezpečením zamykacího mechanismu pevně uzavřete všechna víčka.

27. Zpracované vzorky a kontroly jsou používány přímo pro PCR. Použijte 50 µl zpracovaných vzorků a kontrol pro amplifikaci. Přidejte zpracované vzorky a kontroly k pracovnímu Master Mix do 2 hodin od ukončení přípravy vzorku a kontroly. Amplifikujte zpracované vzorky a kontroly během 1 hodiny po přidání vzorků a kontrol do pracovního Master Mixu a během 3 hodin od dokončení přípravy vzorku.

Poznámka: *Zpracované vzorky HIV-1 mohou být uchovávány při teplotě 4–30 °C po dobu až 2 hodin před přidáním pracovního Master Mixu a mohou být přidány do pracovního Master Mixu až 1 hodinu před amplifikací.*

Reverzní transkripcie, amplifikace a detekce

Poznámka: *K-nosiče a držák K-nosiče by měly být otřeny tkaninou nepouštějící vlas navlhčenou do 70% roztoku isopropanolu.*

C. Příprava činidel

Poznámka: *Vzorky a kontroly zpracované pomocí činidel Master Mix COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (HIV-1 MMX, v2.0), „Pracovní Master Mix“ (pracovní MMX) a Pracovní Master Mix Plus jsou citlivé na světlo. Chraňte tato činidla před světlem.*

Poznámka: *Master Mix COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (HIV-1 MMX, v2.0) a roztok manganu COBAS® TaqMan® (CTM Mn²⁺) musí být temperovány při pokojové teplotě po dobu alespoň 30 minut před přípravou pracovního Master Mixu.*

Poznámka: *Po dokončení přípravy vzorku a kontroly připravte pracovní MMX.*

Poznámka: *Zpracované vzorky jsou stabilní až 2 hodiny před přidáním pracovního MMX.*

Poznámka: *Pracovní MMX musí být použit do 2 hodin od přípravy.*

Poznámka: *Jakmile jsou zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního MMX, musí být amplifikace započata do 1 hodiny.*

1. Temperujte jednu lahvičku HIV-1 MMX, v2.0 a jednu lahvičku CTM Mn²⁺ na teplotu okolí po dobu minimálně 30 minut.
2. Umístěte K-nosič nebo nosič K-zásobníku do držáku na K-nosič.
3. Vložte nové K-zkumavky nebo nový K-zásobník do K-nosiče nebo nosiče K-zásobníku bez toho, abyste se dotkli stran K-zkumavek.

Poznámka: *Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru. Při použití K-zásobníků není nutné termocykler vyvažovat.*

4. Otevřete K-zkumavky pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek.
5. Připravte pracovní MMX dle následujícího návodu:

Na 24 testů, přidejte 170 µl CTM Mn²⁺ do jedné lahvičky s HIV-1 MMX, v2.0. Lahvičku zavřete a dobře promíchejte otočením 10x. Víření k promísení pracovního MMX nepoužívejte. Pracovní Master Mix chraňte před světlem a spotřebujte do 2 hodin od přípravy.

Na 12 testů, odeberte 660 µl HIV-1 MMX, v2.0 a umístěte do zkumavky o objemu 2 ml. Přidejte 80 µl CTM Mn²⁺ do zkumavky o objemu 2 ml obsahující HIV-1 MMX, v2.0, zkumavku zavíckujte a dobře promíchejte otočením 10x. Pracovní MMX chraňte před světlem a spotřebujte do 2 hodin. Uskladněte zbývající nepoužitý HIV-1 MMX, v2.0 a CTM Mn²⁺ v originálních lahvičkách při teplotě 2–8 °C. Po otevření jsou HIV-1 MMX, v2.0 a CTM Mn²⁺ stabilní po dobu 30 dnů při teplotě 2–8 °C nebo do uplynutí doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.

Poznámka: *Objem CTM Mn²⁺ je specifický pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.*

6. Odpipetujte 50 µl pracovního MMX do každé K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku.
7. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku obsahující pracovní MMX; použijte k tomu mikropipetor se špičkou s aerosolovou bariérou nebo s přímým vypuzováním. Jemně promíchejte každý vzorek nebo kontrolu nahoru a dolů třikrát pomocí mikropipetoru, který nevytváří bubliny.

- Opakujte krok 7 pro každý zpracovaný vzorek a kontrolu, pokud není vše přeneseno do K-zkumavek. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Proveďte vizuální kontrolu přítomnosti bublinek a dle potřeby je odstraňte. Uzavřete K-zkumavky nebo K-zásobníky pomocí pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek nebo K-zásobníků. Vizuálně si ověřte, že byly přidány odpovídající objemy.
- S amplifikací je třeba začít do 1 hodiny od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do K-zkumavek nebo K-zásobníků obsahujících pracovní MMX.

D. Plnění a provoz analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

- Zapněte počítač pracovní stanice a přihlaste se k Windows XP za použití odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
- Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® 48. Ověřte, zda se přístroj inicializuje a je připraven pro použití. Jsou-li K-nosiče nebo nosiče K-zásobníků z předchozích měření nadále umístěny v některém z termocyklerů, odstraňte je pomocí přemísťovače K-nosičů.
- Spustte software AMPLILINK na počítači. Přihlaste se pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
- Pro vytvoření objednávek pro K-nosiče nebo K-zásobníky pro analyzované vzorky klikněte na ikonu **Orders**. Vyberte záložku **Sample**, pak klikněte na na tlačítko **New** a zadejte číslo objednávky pro každý vzorek pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Zvolte definiční soubor testu pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Zopakujte pro každý vzorek. Klikněte myší na tlačítko **Save**.
- Zadejte informace o kontrole kvality výběrem záložky **Quality Control** v okně **Orders**. Klikněte na tlačítko **New** pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu zadejte informaci z *karty kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure* dodávané se soupravou. Zadejte číslo šarže testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure, datum použitelnosti, rozmezí Low (+) a High (+) kontroly a také kalibrační koeficienty specifické pro šarži v navržených prostorech. Klikněte na „**OK**“.
- Přifaďte číslo K-nosiče nebo K-zásobníku k danému testovacímu cyklu kliknutím na záložku **K-Carrier** v okně **Orders**. V okně **K-Carrier** klikněte na **New**. Do pole napravo od „**K-Carrier ID**“ zadejte číslo K-nosiče nebo K-zásobníku pomocí klávesnice nebo naskenujte čárový kód K-nosiče nebo K-zásobníku pomocí čtečky čárového kódu. Vyberte definici testu pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure z panelu testů v dolní části okna.

Poznámka: Jestliže používáte K-nosič použitý pro předchozí cyklus, musíte výsledky přijmout předtím, než bude možné stejné číslo K-nosiče přiřadit novému cyklu.

- V seznamu **Worklist** vyberte první řadu ve sloupci Type (T). Označte toto pole, abyste se dostali do rozbalovací nabídky a pak vyberte požadovaný typ kontroly. Pak klikněte dvakrát na pole ID vzorku pro stejnou řadu. Zobrazí se okno **Lookup Control** se všemi dostupnými kontrolami. Jakmile je kontrola vybrána, odpovídající kalibrační a kontrolní hodnoty budou zobrazeny v dolním pravém informačním panelu. Opakujte tento proces pro všechny požadované kontroly.
- Pro poklepání na první pozici (řadu) pro zadání vzorku budete moci zadat vzorky do seznamu **Worklist**. Tím se zobrazí okno **Lookup Sample** obsahující přiřazené objednávky pro vzorek. Použijte klávesy **Shift + Arrow** pro označení více než jednoho čísla objednávky. Zkontrolujte, zda definici testu pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byly přiřazeny všechny objednávky.
- Kliknutím na **Save** uložíte přiřazení objednávky K-nosiče.

Poznámka: Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru. Při použití K-zásobníků není nutné termocykler vyvažovat.

E. Reverzní transkripce, amplifikace a detekce

1. Vyberte ikonu **Systems** na záložce **System**, kliknutím na **Open** otevřete termocykler. Jakmile se kryt termocykleru zcela otevře a objeví se nápis „**Ready to Load**“ v okně **Systems**, zvedněte a přidržte víko termocykleru otevřené. Pomocí přemísťovače K-nosiče přemístěte naplněný K-nosič nebo nosič K-zásobníku obsahující uzavřené K-zkumavky nebo K-zásobník s pracovním Master Mixem, vzorky a kontrolami do termocykleru. Zavřete víko termocykleru.
2. Kliknutím na **Start** v okně **Systems** pod ikonou TC uzavřete kryt termocykleru a spustíte cyklus analýzy.
3. Reverzní transkripci, amplifikaci a detekci provádí automaticky analyzátor COBAS® TaqMan® 48.

VÝSLEDKY

Kalkulace výsledku

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje titer HIV-1 RNA v každém vzorku a kontrole. **Titr HIV-1 RNA je vyjádřen v kopiích/ml.** Konverzní faktor mezi kopiemi RNA HIV-1 /ml a HIV-1 v mezinárodních jednotkách (IU)/ml je 0,6 kopii/IU, za použití 1 mezinárodní normy WHO pro RNA HIV-1 pro technologie analýzy nukleových kyselin (NAT) (NIBSC 97/656)^{1,2}. Tento konverzní faktor by stanoven pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a testu COBAS® TaqMan® HIV-1 pro použití na systéme High Pure.

Software AMPLILINK

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro HIV-1 RNA a kvantifikační standard HIV-1 RNA.
- Stanovuje titer HIV-1 RNA na základě hodnot Ct pro HIV-1 RNA a kvantifikační standard HIV-1 RNA a kalibračních koeficientech specifických pro danou šarži.
- Určuje, že vypočtená hodnota titru v kopiích/ml pro **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** a **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** spadá do vymezeného rozmezí.

Validace cyklu

Zkontrolujte přítomnost příznaků a komentářů ve výsledkovém okně AMPLILINK nebo výtisku, abyste se ujistili, že je cyklus měření platný. Cyklus je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Cyklus není platný, pokud se u kontrol COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 objeví některé z následujících příznaků:

Negativní kontrola

Příznak	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo platný výsledek jiný než „Target Not Detected“

HIV-1 níže pozitivní kontrola, v2.0

Příznak	Výsledek	Interpretace
LPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

HIV-1 vysoce pozitivní kontrola, v2.0

Příznak	Výsledek	Interpretace
HPCINVALID	Invalid	Neplatný výsledek nebo kontrola mimo rozsah

Pokud je měření neplatné, je třeba celý běh, tj. včetně přípravy vzorků a kontrol, reverzní transkripce, amplifikace a detekce, zopakovat.

Interpretace výsledků

Pro platný cyklus zkontrolujte u každého jednotlivého vzorku přítomnost příznaků nebo komentářů ve výtisku výsledku. Výsledky se interpretují takto:

- Platný může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky resp. komentáře nebo ne.

Výsledky vzorků se interpretují takto:

Výsledek titru	Interpretace
Target Not Detected	Výsledky uvádějte jako „HIV-1 RNA nedetekována“.
< 3.4E+01 C/mL	Vypočtená hodnota kopií/ml je pod kvantifikační hranici testu. Výsledky uveďte jako "HIV-1 RNA detekována, méně než 34 HIV-1 RNA kopií/ml".
≥ 3.4E+01 C/mL a ≤ 1.00E+07 C/mL	Vypočítané výsledky větší než nebo rovny 34 kopií/ml a menší než nebo rovny 1,00E+07 kopií/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy.
> 1.00E+07 C/mL	Vypočtená hodnota kopií/ml leží nad rozsahem testu. Výsledky uveďte jako „vyšší než 1,00E+07 HIV-1 RNA kopií/ml“. Jsou-li žádané kvantitativní výsledky, musí být původní vzorek rozředěn HIV-1 negativní lidskou EDTA plazmou v poměru 1:100 a test zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.

Poznámka: *Vzorky nad rozsahem testu, které vykazují neplatný výsledek s příznakem „QS_INVALID“, nesmí být vykázány jako > 1,00E+07 kopií/mL. Původní vzorek je nutné rozředit lidskou EDTA plazmou negativní na HIV-1 v ředění 1:100 a test musí být zopakován. Vynásobte uvedený výsledek faktorem ředění.*

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

KONTROLA KVALITY

Jeden replikát negativní kontroly COBAS® TaqMan®, HIV-1 nížce (+) kontroly COBAS® TaqMan®, v2.0 HIV-1 vysoce (+) kontroly COBAS® TaqMan®, v2.0 musí být zahrnuty do každého cyklu testu s až 24 vzorky a kontrolami. Jak je tomu při každém novém laboratorním postupu, noví pracovníci obsluhy by měli zvážit, jestli by nebylo dobře při každém testování použít ještě další kontroly až do doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Neexistují žádné požadavky týkající se pozice kontrol na K-nosiči nebo K-zásobníku. Zkontrolujte, zda výtisk cyklu neobsahuje příznaky a poznámky, abyste se přesvědčili, že byl cyklus platný.

Negativní kontrola

CTM (-) C musí vést k výsledku **Target Not Detected**, tzn. Ct hodnota pro HIV-1 RNA byla nad hranicí analýzy nebo žádná Ct hodnota pro HIV-1 RNA nebyla získána, ale platná Ct hodnota byla získána pro kvantifikační standard HIV-1 RNA. Jestliže **CTM (-) C** toto kritérium nespĺňuje, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CTM (-) C** trvale neplatná, kontaktujte místní zastoupení Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontroly

Přifažené rozmezí pro **HIV-1 L(+)**C, v2.0 a **HIV-1 H(+)**C, v2.0 je uvedeno na *kartě kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure* dodávané se soupravou. Tyto rozsahy se vloží do Datové stanice pro software AMPLILINK.

Množství kopií HIV-1 RNA na ml pro **HIV-1 L(+)**C, v2.0 a **HIV-1 H(+)**C, v2.0 musí spadat do rozmezí uvedeného na *kartě kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure* dodávané se soupravou. Jestliže jedna nebo obě pozitivní kontroly nespĺňují toto kritérium, je celé měření neplatné. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže je vypočtený titr HIV-1 RNA pro jednu nebo obě pozitivní kontroly trvale mimo přifažené rozmezí, obraťte se o technickou pomoc na místní zastoupení firmy Roche.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

1. Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické senzitivitě tohoto testu je třeba věnovat mimořádnou péči zachování čistoty činidel soupravy či amplifikačních směsí a zamezit křížové kontaminaci vzorků. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je podezření na kontaminaci, je třeba činidlo zlikvidovat. Používejte rukavice, které obsluze dobře padnou. Často měňte rukavice, zvláště po manipulaci s pozitivními kontrolami a otevření plných zkumavek z lytického stojanu. Nikdy se nedotýkejte vnitřní části víček (např. při otvírání nebo zavírání).

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je validován pouze pro používání s lidskou plazmou odebranou do EDTA jako antikoagulantu. Testování jiných typů vzorků může vést k nepřesným výsledkům.
2. Používáte-li zkumavky pro přípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™, skladujte zkumavky s plnou krví ve svislé poloze při teplotě 2–25 °C ne déle než 24 hodiny před centrifugací. Plazmu přesuňte po centrifugaci do sterilní polypropylenové zkumavky. Nezmrazujte zkumavky BD PPT™. Míchání nebo manipulace se zkumavkami BD PPT™ jiným než uvedeným způsobem může vést k odchylkám výsledků virové nálože HIV-1.
3. Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití se systémem High Pure nebyla vyhodnocena se vzorky obsahujícími HIV-1 skupiny N.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
5. Díky přítomnosti enzymu AmpErase v Master Mixu pro test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 se snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HIV-1 pozitivních kontrol a klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v tomto příbalovém letáku.
6. S tímto výrobkem mohou pracovat pouze pracovníci proškolení v technice PCR.
7. Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® TaqMan® 48.
8. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté primery testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a/nebo sondami mohou vést k podhodnocení množství nebo selhání detekce viru.
9. Detekce HIV-1 RNA závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což mají vliv metody odběru vzorku a status pacienta (např. věk, přítomnost symptomů a/nebo stádium infekce).
10. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a kvantifikovali rozdíly mezi technologiemi.
11. Některé izoláty HIV-1 skupiny O mohou být podkvantifikovány až o 2 log. Některé izoláty HIV-1 o vysokém titru skupiny M subtypu G mohou být podkvantifikovány až o 0,6 log.

INTERFERENČNÍ LÁTKY

Při zvýšených hladinách triglyceridů (až do 3500 mg/dl), bilirubinu (až do 18 mg/dl), albuminu (až do 6200 mg/dl), hemoglobinu (až do 250 mg/dl) a lidské DNA (až do 0,4 mg/dl) ve vzorcích a také při přítomnosti autoimunních onemocnění nebo příslušných markerů, jako je systémový lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritida (RA) a antinukleární protilátky (ANA) bylo zjištěno, že nedochází k interferenci s kvantifikací HIV-1 RNA ani dopadu na specifitu testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP7-A2 pomocí jedné šarže činidel testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.

Byly testovány složky léčiv uvedené v tabulce 1 v trojnásobku špičkové koncentrace v plazmě (C_{max}) a nedošlo k interferenci s kvantifikací HIV-1 RNA nebo ovlivnění specifity testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure.

Tabulka 1
Léčiva testovaná na interferenci

Nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy a DNA polymerázy Tenofovir DF Adefovir dipivoxil	Nukleozidové inhibitory reverzní transkriptázy a DNA polymerázy Lamivudin, 3TC Zidovudin Stavudin, 4dT Abacavir sulfát Didanosin, ddl Telbivudin Entekavir Emtricitabin
Inhibitory HIV proteázy Saquinavir Ritonavir Lopinavir/Ritonavir Atazanavir Nelfinavir mesylát Darunavir Tiplranavir Fosamprenavir	Nenukleozidové inhibitory HIV reverzní transkriptázy Nevirapin Efavirenz
Inhibitor HIV integrázy Raltegravir	Inhibitory HIV fúze Enfuvirtid
Imunomodulátory Ribavirin Peginterferon alfa-2a Peginterferon alfa-2b	Inhibitory vstupu HIV Maraviroc
	Látky pro léčbu herpetických virů Gancyklovir Valganciclovir HCl Acyklovir

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Mez detekce

Detekční hranice neboli mez detekce testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla stanovena testováním 2. mezinárodního standardu HIV-1 RNA dle WHO, zákona NIBSC 97/650^{2,37}, o HIV-1 subtypu B, ředěného v HIV-1-negativní lidské EDTA plazmě. Mez detekce byla stanovena pro tři šarže činidel. Pro každou šarži činidel bylo analyzováno pět nebo více sérií ředění. Celkově bylo testováno 183 replikátů na hladinu koncentrace. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP17-A.

Koncentrace HIV-1 RNA, kterou je možné detekovat s mírou pozitivity větší než 95%, jak je určeno analýzou PROBIT, je 17 kopií/ml nebo 29 IU/ml. Výsledky jednotlivých šarží v kopiích na ml byly 15,6 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 13,3–20,3 kopií/ml), 20,1 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 16,8–27,0 kopií/ml) a 15,8 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 13,4–20,7 kopií/ml) pro šarže 1, 2 a 3. Výsledky jednotlivých šarží v IU na ml byly 26,1 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 22,2–33,9 IU/ml), 33,6 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 28,0–45,1 IU/ml) a 26,4 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 22,3–34,6 IU/ml) pro šarže 1, 2 a 3. Kombinované výsledky všech tří šarží činidel jsou uvedeny v tabulce 2. **Konverzní faktor mezi IU/ml a kopiemi/ml byl stanoven pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a testu COBAS® TaqMan® HIV-1 pro použití na systému High Pure.**

Tabulka 2
Mez detekce testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure pomocí mezinárodního standardu WHO a analýzy PROBIT

Nominální vstup (HIV-1 RNA IU/ml)	Nominální vstup (HIV-1 RNA kopií/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra positivity
83	50	183	183	100,0%
62	37	182	181	99,5%
45	27	183	181	98,9%
33	20	182	174	95,6%
25	15	183	174	95,1%
17	10	183	146	79,8%
PROBIT 95% úspěšnost detekce		29 IU/ml (95% interval spolehlivosti: 26,0–32,9) 17 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 15,6–19,7)		

Mez detekce byla potvrzena na subtypech skupiny M HIV-1 testováním kultivovaných izolátů subtypů A, B, C, D, CRF01_AE, F, G a H skupiny M při nominálních koncentracích přibližně 10, 15, 20, 40 a 60 kopií/ml v HIV-1 negativní lidské EDTA plazmě, s nejméně 48 replikáty na koncentraci. Nominální koncentrace byly stanoveny pro kultivované izoláty na základě průměrných titrů HIV-1 RNA získaných pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a dvou srovnávacích diagnostických testů *in vitro* pro HIV-1 RNA. Pozitivní hodnoty 95% a vyšší byly u všech subtypů skupiny M při koncentracích 15 až 40 kopií/ml a vyšších. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3
Ověření meze detekce testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure pomocí subtypů A-H HIV-1 skupiny M a 95% analýzy úspěšnosti detekce

Subtyp	Označení izolátu	Nejnižší hladina koncentrace ≥ 95% úspěšnost detekce (kopie/ml)
A	92UG029	20
B	8E5/LAV	40
C	92BR025	10
D	92UG021	15
CRF01_AE	92TH022	15
F	93BR020	20
G	ARP173/RU570	15
H	HIV V1557	15

B. Přesnost

Přesnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla stanovena analýzou sériových ředění vzorku supernatantu buněčné kultury HIV-1 (HIV-1 subtyp B), v HIV-1 negativní lidské EDTA plazmě. Přiřazení titru vzorku supernatantu buněčné kultury (zásobní koncentrace) bylo provedeno metodou, která zajišťuje sledovatelnost dle 2. mezinárodního standardu WHO pro HIV-1 RNA, zákona NIBSC 97/650^{2,37}. Byly analyzovány tři šarže činidel a bylo provedeno 15 cyklů na šarži činidla, každý se skládal z 6 úrovní ředění a 3 replikátů každé úrovně. Každý vzorek prošel celou procedurou testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure zahrnující přípravu vzorku, amplifikaci a detekci. Zde uváděná přesnost tedy zahrnuje všechny aspekty testovacího postupu. Kombinované výsledky těchto tří šarží činidel jsou uvedeny v tabulce 4.

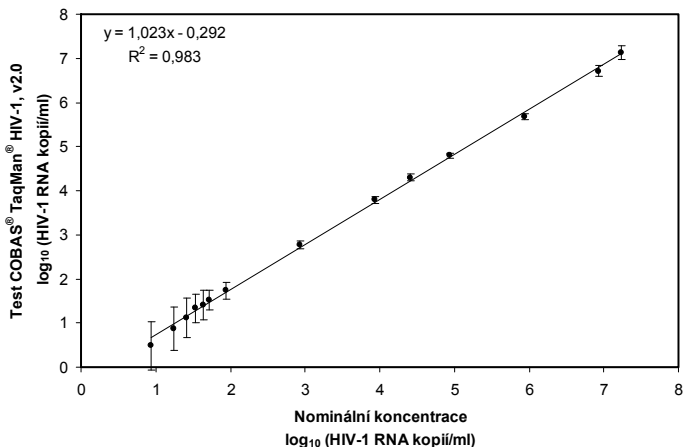
Tabulka 4
Přesnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure

Titř (kopii/ml)	Log ₁₀ titř (Log ₁₀ kopii/ml)	Kombinace všech tří šarží		
		Počet	Celková směrodatná odchylka (Log ₁₀ titř)	Celkové lognormální rozložení CV (%)
8,6E+01	1,93	135	0,19	46
8,6E+02	2,93	136	0,09	22
8,6E+03	3,93	136	0,09	22
8,6E+04	4,93	136	0,07	17
8,6E+05	5,93	136	0,07	17
8,6E+06	6,93	136	0,14	33

C. Lineární rozmezí

Linearita testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla stanovena analýzou sériových ředění vzorku supernatantu buněčné kultury HIV-1 o vysokém titru (HIV-1 subtyp B), v HIV-1 negativní normální lidské EDTA plazmě. Přiřazení titru vzorku supernatantu buněčné kultury (zásobní koncentrace) bylo provedeno metodou, která zajišťuje sledovatelnost dle 2. mezinárodního standardu WHO pro HIV-1 RNA, zákona NIBSC 97/650^{2,37}. Zjistilo se, že test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure dává lineární odpověď od 9 ($\log_{10} = 0,93$) HIV-1 RNA kopií/ml do 1,7E+07 ($\log_{10} = 7,24$) HIV-1 RNA kopií/ml, s dolní hranicí kvantifikace 34 ($\log_{10} = 1,54$) HIV-1 RNA kopií/ml a horní hranicí kvantifikace 1,0E+07 ($\log_{10} = 7,00$) HIV-1 RNA kopií/ml. Vyhodnocení bylo provedeno podle směrnice CLSI EP6-A a EP17-A pomocí dvou šarží čidel testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Bylo provedeno 15 cyklů na šarži čidel, každý se skládal ze 14 úrovní ředění a 3 replikátů na každou úroveň. Kombinované výsledky obou šarží čidel jsou uvedeny na obrázku 9.

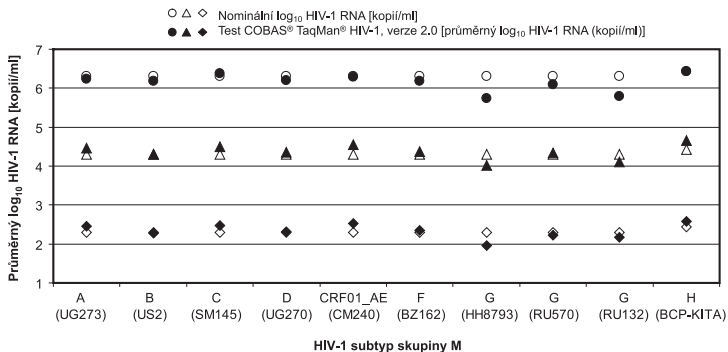
Obrázek 9
Linearita testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure



D. Inkluzivita pro HIV-1 skupiny M

Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure u subtypů HIV-1 skupiny M byla vyhodnocena analýzou kultivovaných izolátů HIV-1 subtypů A, B, C, D, CRF01_AE, F, G a H skupiny M v nominálních koncentracích 2,0E+02, 2,0E+04 a 2,0E+06 kopií/ml v EDTA plazmě. Nominální koncentrace byly stanoveny na základě průměrných titrů HIV-1 RNA získaných pomocí testu COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 a srovnávacího diagnostického testu *in vitro* na HIV-1 RNA. Bylo testováno sedm replikátů každého vzorku pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a průměrné log₁₀ titrů byly srovnány s nominálními titry. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure vykázal výsledky ekvivalentní s nominálními koncentracemi subtypů HIV-1 skupiny M (obrázek 10). Průměrné log₁₀ výsledků koncentrace všech vzorků byly v rozsahu $\pm 0,3$ log₁₀ nominální koncentrace, kromě vzorků s nejvyšší koncentrací dvou ze tří subtypů G testovaných izolátů, které byly 0,51 a 0,56 log₁₀ pod nominální koncentrací 6,30 (2,0E+06 kopií/ml).

Obrázek 10
Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure
Testování inkuzivity – supernatanty buněčné kultury skupiny M



Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure pro subtypy skupiny M ve srovnání s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 byla rovněž vyhodnocena na 308 vzorcích známého subtypu, včetně 141 vzorků subtypu skupiny M jiných než subtypu B. Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 vykazaly ekvivalentní výsledky u všech subtypů (obrázek 12).

E. Detekce HIV-1 skupiny O

Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure na vzorcích HIV-1 skupiny O byla vyhodnocena pomocí testování tří kultivovaných izolátů HIV-1 skupiny O ředěných v různých koncentracích v lidské EDTA plazmě. Každému izolátu byly přiřazeny nominální koncentrace pomocí testování komparačním diagnostickým testem HIV-1 RNA *in vitro* s požadavkem na stanovení HIV-1 skupiny O. Mez detekce testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure u vzorků HIV-1 skupiny O byla stanovena testováním každého izolátu v nominálních koncentracích mezi 10 a 200 kopiemi/ml (tabulka 5). V každé koncentraci bylo testováno 48 replikátů. U dvou ze tří izolátů skupiny O byla pozitivní míra detekce 94% nebo vyšší při koncentracích 15 až 20 kopií/ml a vyšších. U jednoho ze tří izolátů skupiny O (MVP5180) byla pozitivní míra detekce 92% nebo vyšší při koncentracích 100 kopií/ml a vyšších a 95% mez detekce stanovený analýzou pomocí metody Probit byl 112 kopií/ml.

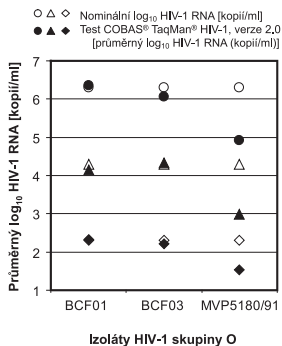
Linearita testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure u HIV-1 skupiny O byla stanovena testováním stejných tří izolátů při 2,0E+2, 2,0E+4 a 2,0E+6 kopiích/ml v lidské EDTA plazmě. V každé koncentraci bylo testováno sedm replikátů (obrázek 11). U dvou ze tří izolátů průměrné log₁₀ výsledků koncentrace byly u všech vzorků v rozsahu ± 0,3 log₁₀ nominální koncentrace. U izolátu MVP5180 byly průměrné log₁₀ výsledků přibližně 1,3 log pod nominálními koncentracemi. Průměrný výsledek u vzorku s nízkou koncentrací MVP5180 na obrázku 11 je zobrazen jako spodní mez kvantifikace (34 kopií/ml). Byly detekovány všechny replikáty, ale všechny výsledky byly pod spodní mezí kvantifikace.

Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla u vzorků HIV-1 skupiny O dále testována na šesti dalších kultivovaných izolátech skupiny O ředěných v lidské EDTA plazmě a to pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a pomocí komparačního diagnostického testu *in vitro* HIV-1 RNA s požadavkem na stanovení HIV-1 skupiny O (tabulka 6). V případě pěti ze šesti izolátů test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a komparační test vykazaly shodné výsledky; v případě jednoho izolátu výsledky testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byly nízké.

Tabulka 5
Mez detekce testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure u izolátů HIV-1 skupiny O

Izolát skupiny O	Nominální vstup (HIV-1 RNA kopií/ml)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Míra positivity	PROBIT 95% úspěšnost detekce
BCF01	100	48	48	100%	20 kopií/ml (95% interval spolehlivosti není k dispozici)
	80	48	48	100%	
	60	48	48	100%	
	40	48	48	100%	
	20	48	45	94%	
BCF03	100	47	47	100%	13 kopií/ml (95% interval spolehlivosti 0,7–24 kopií/ml)
	80	48	48	100%	
	60	48	48	100%	
	40	48	48	100%	
	20	48	46	96%	
	15	48	47	98%	
	10	48	44	92%	
MVP5180	200	47	47	100%	112 kopií/ml (95% interval spolehlivosti 90–156 kopií/ml)
	175	48	47	98%	
	150	48	48	100%	
	100	48	44	92%	
	80	47	43	91%	
	60	48	38	79%	
	40	48	33	69%	
20	48	25	52%		

Obrázek 11
Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure
Testování inkuzivity – supernatanty buněčné kultury skupiny O



Tabulka 6
Srovnání testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure a komparačního diagnostického testu in vitro na izolátech HIV-1 skupiny O

Izolát skupiny O	Zředění	Log ₁₀ HIV-1 RNA kopií/ml		
		Test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0	Komparační test	Rozdíl (test COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 – komparační test)
BCF02	1,0E+4	4,16	4,20	-0,04
BCR06	1,0E+4	4,43	4,34	0,10
BCF07	1,0E+4	3,98	4,10	-0,12
BCF11	1,0E+4	4,35	4,58	-0,23
BCF13	1,0E+4	2,79	4,69	-1,90
I2478B	100	3,25	3,40	-0,15

F. Specifická

Specifická testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla stanovena analýzou HIV-1-negativních vzorků EDTA plazmy od normálních dárců krve při použití 2 šarží činidel. Celkem bylo pomocí testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure testováno 547 jednotlivých vzorků EDTA plazmy. 543 vzorků vykazalo výsledek „Cíl nebyl detekován“, 3 měly výsledky „<34 kopií/ml“ a 1 byl neplatný. Na základě těchto výsledků je specifická testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure 99,5% (jednostranná nižší mez spolehlivosti 95%: 98,45%).

G. Analytická specifická

Analytická specifická testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla hodnocena přidáním kultivovaných organizmů (virů, bakterií, kvasinek) nebo DNA (HTLV-2) s 1E+06 částic/ml do HIV-1 negativní lidské EDTA plazmy a do HIV-1 pozitivní lidské EDTA plazmy s 2,4E+02 kopií/ml HIV-1 (tabulka 7). Žádný z testovaných organizmů zkříženě nereagoval ani neinterferoval s účinností testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. Všechny testované organizmy vykazaly v HIV-1 negativních vzorcích výsledky „Cíl nebyl detekován“. V HIV-1 pozitivních vzorcích všechny testované organizmy vykazaly titry RNA v rozsahu 0,2 log₁₀ HIV-1 RNA kopií/ml HIV-1 pozitivních kontrol.

Tabulka 7
Analytická specifická vzorků

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

H. Metoda korelace

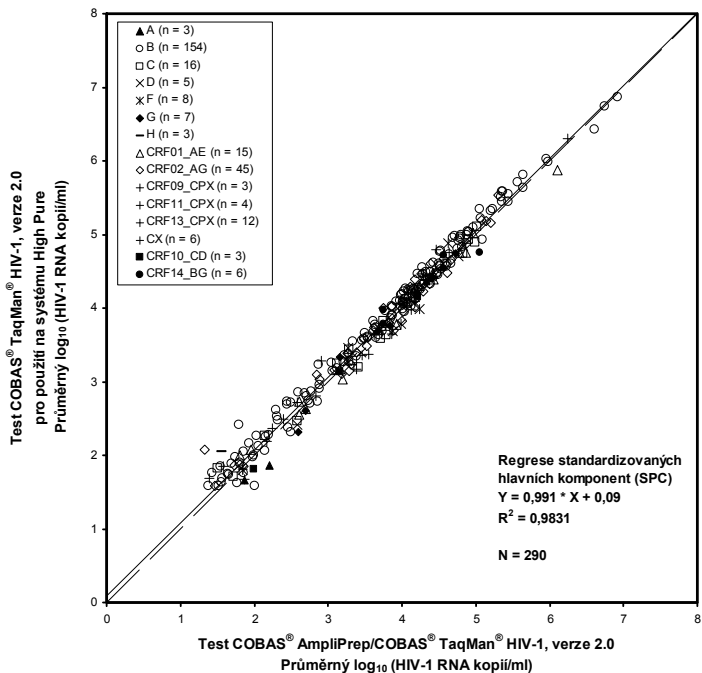
Účinnost testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure byla porovnána s testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pomocí analýzy 308 HIV-1 pozitivních klinických vzorků. Všechny vzorky byly zředěny 1:5 v HIV-1 negativní EDTA plazmě a testovány v duplikátu testem COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a testem COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure. 290 vzorků vykazalo alespoň jeden platný výsledek v lineárním rozmezí obou platform. Demingova regresní analýza výsledků průměrného log titru viru měla sklon křivky 0,991, úsek 0,09 a Index determinace (R-squared) 0,983 (Obrázek 12). Průměrný rozdíl log mezi metodami byl 0,06 (95% interval spolehlivosti 0,04 až 0,07).

Byly známé subtypy všech vzorků. Zahrnovaly 167 vzorků subtypu B (54%) a 141 vzorků (46%) subtypů hlavní skupiny M jiného než B. Vzorky nepatřící k subtypu B zahrnovaly všechny subtypy hlavní skupiny M a rekombinantní formy (tabulka 8). Průměrný rozdíl log mezi metodami byl 0,09 u vzorků subtypu B a 0,02 u vzorků jiného subtypu než B.

Tabulka 8
Distribuce subtypů klinických vzorků ve srovnání pomocí klinických metod

Subtyp	Počet	Subtyp	Počet	Subtyp	Počet
A	3	G	8	CRF10_CD	3
B	167	H	3	CRF11_CPX	4
C	16	CRF01_AE	15	CRF13_CPX	12
D	5	CRF02_AG	47	CRF14_BG	6
F	10	CRF09_CPX	3	CX	6

Obrázek 12
Korelace testu COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pro použití na systému High Pure
a testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



LITERATURA

1. Holmes H, Davis C, Heath A, Hewlett I, Lelie N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* **92**: 141-150
2. National Institute for Biological Standards and Control. Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar Hertfordshire, EN6 3QG United Kingdom,
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, 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
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503
5. Popovic M, Sarnagadharan MG, Read E, Gallo RC. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**: 497-500
6. Curran JW, Jaffe HW, Hardy AM, Morgan WM, Selik RM, Dondero TJ. 1988. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* **239**: 610-616
7. Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV, Biberfeld G, Bottiger B, Hansson LO, Lundbergh P, Sonnerborg AB, Wasserman J, Strannegaard OO. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *Aids* **4**: 995-999
8. Tindall B, Cooper DA. 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *Aids* **5**: 1-14
9. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**: 961-964
10. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, Kappes JC, Hahn BH, Shaw GM. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**: 954-960
11. Horsburgh CR, Jr., Ou CY, Jason J, Holmberg SD, Longini IM, Jr., Schable C, Mayer KH, Lifson AR, Schochetman G, Ward JW, et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **2**: 637-640
12. Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, Thompson L, Baseler M, Massari F, Fox CH, Salzman NP, Fauci AS. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**: 305-308
13. Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos MC, Baseler M, Salzman NP, Fauci AS, Lane HC. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann Intern Med* **113**: 438-443
14. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **328**: 327-335
15. Piatak M, Jr., Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**: 1749-1754
16. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. 1991. NIH conference. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* **114**: 678-693
17. Coffin JM. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**: 483-489
18. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]. *Nature* **373**: 123-126

19. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emimi EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**: 117-122
20. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, Rubin M, Simberkoff MS, Hamilton JD. 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. *N Engl J Med* **334**: 426-431
21. Welles SL, Jackson JB, Yen-Lieberman B, Demeter L, Japour AJ, Smeaton LM, Johnson VA, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, Reichelderfer PA, Richman DD, Reichman R, Fischl M, Dolin R, Coombs RW, Kahn JO, McLaren C, Todd J, Kwok S, Crumacker CS. 1996. Prognostic value of plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no prior zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *J Infect Dis* **174**: 696-703
22. Coombs RW, Welles SL, Hooper C, Reichelderfer PS, D'Aquila RT, Japour AJ, Johnson VA, Kuritzkes DR, Richman DD, Kwok S, Todd J, Jackson JB, DeGruttola V, Crumacker CS, Kahn J. 1996. Association of plasma human immunodeficiency virus type 1 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. *J Infect Dis* **174**: 704-712
23. Hammer S, Crumacker 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. *J Clin Microbiol* **31**: 2557-2564
24. Schochetman G, George JR. 1994. *AIDS testing : a comprehensive guide to technical, medical, social, legal, and management issues*. New York: Springer-Verlag. xiv, 411 p. pp.
25. 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. *J Clin Microbiol* **32**: 292-300
26. Dewar RL, Highbarger HC, Sarmiento MD, Todd JA, Vasudevachari MB, Davey RT, Jr., Kovacs JA, Salzman NP, Lane HC, Urdea MS. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J Infect Dis* **170**: 1172-1179
27. van Gemen B, Kievits T, Schukkink R, van Strijp D, Malek LT, Sooknanan R, Huisman HG, Lens P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *J Virol Methods* **43**: 177-187
28. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
29. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
30. Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
31. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, Cheng L, Ramankutty T, Clarke D, Yawata H, Sakakura Y, Hirose T, Impraim C. 2001. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* **39**: 2937-2945
32. Smith ES, Li AK, Wang AM, Gelfand DH, Myers TW. 2003. Amplification of RNA: High-temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed. CW Dieffenbach, GS Dveksler, pp. 211-219. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
33. Kwok S, Sninsky JJ. 1993. PCR Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA Sequences. In *Diagnostic molecular microbiology : principles and applications*, ed. DH Persing, TF Smith, FC Tenover, TJ White, pp. 309-315. Washington, D.C.: American Society for Microbiology

34. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125-128
35. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**: 413-417
36. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994
37. Davis C, Berry N, Heath A, Holmes H. 2008. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sang* **95**: 218-225
38. Richmond JY, McKinney RW, Centers for Disease Control (U.S.), National Institutes of Health (U.S.). 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Washington: U.S. G.P.O. : For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O. ix, 250 p. pp.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-5674]*. Wayne, PA 19087-1898 USA, 2005: CLSI. viii, 111 p. pp.
40. International Air Transport Association. 2010. *Dangerous Goods Regulations*

Informace k revizi dokumentuDoc Rev. 2.0
04/2011

První publikace.



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILINK, COBAS, HIGH PURE a TAQMAN jsou obchodní značky společnosti Roche.

ARMORED RNA je patentovaná technologie vyvinutá ve spolupráci Ambion, Inc. a Cenetron Diagnostics, LLC. U.S. patenty č.5,677,124, č. 5,919,625, č. 5,939,262, č.6,214,982, č.6,399,307, a ostatní patenty v jednání. ARMORED RNA je obchodní značka společností Ambion a Cenetron.

MICROSOFT a WINDOWS jsou obchodní značky společnosti Microsoft.

PROCLIN je obchodní značka společnosti Rohm and Haas Company.

VACUTAINER a PPT jsou obchodní značky společností Becton, Dickinson and Company.

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare Bio-Sciences Corp. a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společností Roche pouze za účelem výzkumu a jako součást diagnostických souprav *in vitro*. Jakékoli užití jiné než za účelem výzkumu a jako součást diagnostických souprav *in vitro* vyžaduje sublicence od GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, USA a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvánie, USA.

Některé části tohoto výrobku jsou chráněny jedním nebo více patenty US a jejich zahraničními ekvivalenty, které vlastní Chiron Corporation a jsou licencovány společností Roche Molecular Systems, Inc. a F. Hoffman-La Roche Ltd.

Některé části tohoto výrobku jsou chráněny jedním nebo více patenty US a jejich zahraničními ekvivalenty, které vlastní Isis Pharmaceuticals a jsou licencovány společností Roche Molecular Systems, Inc. Licencované pod US patentovým číslem 5,407,796, další patenty jsou v jednání.

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

04/2011

(05923573001-02ENGL)

Doc Rev. 2.0

05923573041-02



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

