

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



FÖR *IN VITRO*-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

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

HI2CAP

48 Tests

P/N: 05212294 190

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
Wash Reagent

PG WR

5.1 Liters

P/N: 03587797 190

AVSEDD ANVÄNDNING

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (v2.0) är ett *in vitro*-test för nukleinsyra-amplifiering för kvantifiering av humant immunbristvirus typ 1 (HIV-1) RNA i human EDTA-plasma eller från torkad plasma som erhållits via ett **cobas®**-plasmasepareringskort (**PSC**), där instrumentet COBAS® AmpliPrep används för automatisk provextraktion och analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 används för automatisk amplifiering och detektion. Med testet kan HIV-1 RNA kvantifieras i intervallet 20–10 000 000 kopior/ml (33 till $1,67 \times 10^7$ internationella enheter [IU]/ml i EDTA-plasma och 738–10 000 000 kopior/ml (1 230 till $1,67 \times 10^7$ internationella enheter [IU]/ml) i ett torkat **PSC**-plasmaprov). En kopia av HIV-1 RNA motsvarar 1,67 IU baserat på WHO:s första internationella standard för HIV-1 RNA för NAT-testning (Nucleic Acid-Based Techniques) (NIBSC 97/656)³⁶.

Testet är avsett att användas i kombination med en klinisk bedömning och andra laboratoriemarkörer för sjukdomsförloppet för den kliniska hanteringen av patienter infekterade med HIV-1-grupp M och HIV-1-grupp O. Testet kan användas för att bedöma patientprognosen genom att mäta baseline HIV-1 RNA-nivån eller övervaka effekterna av antiretroviral behandling genom att mäta förändringar i HIV-1 RNA-nivåer under den antiretrovirala behandlingen.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 är inte avsett att användas som screeningtest för förekomst av HIV-1 i blod eller blodprodukter eller som ett diagnostiskt test för att bekräfta förekomst av HIV-1-infektion.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Humant immunbristvirus (HIV) är etiologiskt agens för förvärvat immunbristsyndrom (AIDS)^{1–3}. HIV-infektion kan överföras genom sexuell kontakt, exponering för infekterat blod eller blodprodukter, eller från en infekterad gravid kvinna till barnet⁴. Inom tre till sex veckor efter exponering för HIV utvecklar infekterade personer vanligtvis ett akut syndrom som karakteriseras av influensaliknande symptom, tillsammans med höga nivåer av viremi i det perifera blodet^{5–8}. Hos de flesta infekterade personerna åtföljs detta av en HIV-spezifisk immunrespons och en minskning av plasmaviremi, vanligtvis fyra till sex veckor efter de första symptomen^{9,10}. Efter serokonversion går infekterade personer oftast in i en kliniskt stabil, asymptomatisk fas som kan vara under flera år^{11–13}. Den asymptomatiske perioden karakteriseras av en bestående låg nivå av plasmaviremi¹⁴ och en gradvis minskning av CD4⁺ T-lymfocyter, vilket leder till svår immunbrist, flera opportunistiska infektioner, malignitet och dödsfall¹⁵. Även om virusnivåerna i det perifera blodet är relativt låga under den asymptomatiske fasen av infektionen, verkar virusreplikering och rening vara dynamiska processer där stora delar av virusproduktionen och infektion av CD4⁺-celler balanseras av lika stora delar virusrening, celdöd hos infekterade celler och förnyelse av CD4⁺-celler, vilket resulterar i relativt stabila nivåer av både plasmaviremi och CD4⁺-celler^{16–18}.

Kvantitativa mätningar av HIV-viremi i det perifera blodet har visat att högre virusnivåer kan korrelera med ökad risk för klinisk progression av HIV-sjukdom, och att minskning i plasmavirusnivåer kan associeras med en ökad risk för klinisk progression¹⁹⁻²¹. Virusnivåer i det perifera blodet kan kvantifieras genom mätning av HIV p24-antigen i serum, genom kvantitativ odling av HIV från plasma eller genom direkt mätning av viralt RNA i plasma med hjälp av teknikerna nukleinsyraamplifiering eller signalamplifiering²²⁻²⁶.

WHO rekommenderar nu även användning av torkade prover för att göra det möjligt att testa virusmängd i en större omfattning i områden med begränsade resurser där det saknas möjligheter till flebotomi eller där tillförlitlig transport av EDTA-plasmaprover inte kan garanteras²⁷. Torkade **PSC**-plasmaprover, där även HIV RNA i den torkade plasman stabiliseras, kan utöka täckningsområdet för testning av virusmängd genom att det blir möjligt att transportera proverna längre sträckor och i mer krävande miljöer än EDTA-plasma.

p24-antigen är det huvudsakliga proteinet för HIV och finns i serum, antingen fritt eller bundet till anti-p24-antikropp. Fritt p24-antigen kan mätas med i handeln tillgängliga enzymimmunanalyser (EIA), men möjligheten att använda p24-antigen som en markör för virusmängd är begränsad, eftersom antigenet endast kan upptäckas hos 20 % av asymptomatiska patienter och 40-50 % av symptomatiska patienter. Förfaranden för att dissociera antigen-antikroppskomplex förbättrar känsligheten hos p24-antigentesterna, men virusproteinet förblir oupptäckt hos de flesta asymptomatiska patienter²².

Infektiös HIV i plasma kan odlas genom inokulering till aktiverade perifera mononukleära blodceller (PBMC) från normala blodgivare. Kvantifiering erhålls genom att PBMC inokuleras med seriella spädnings av plasmaprovet. Kvantitativ odling har begränsad användbarhet för monitorering av virusnivåer hos infekterade personer, eftersom endast en liten fraktion viruspartiklar är infektiösa *in vitro*. Infektiöst virus kan ofta inte påvisas hos asymptomatiska personer²².

HIV RNA i plasma kan kvantifieras genom metoder som använder amplifiering med nukleinsyra, som till exempel Polymerase Chain Reaction (PCR)²⁸⁻³⁰. I COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 används PCR-teknik för att uppnå största möjliga känslighet och dynamiskt intervall för kvantitativ detektion av HIV-1 RNA i EDTA-antikoagulerad plasma och i ett torkat **PSC**-plasmaprov.

ANVÄNDNINGSPRINCIPER

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 är ett test för nukleinsyraamplifiering för att mäta kvantiteten av humant immunbristvirus typ 1 (HIV-1) RNA i human EDTA-plasma eller från ett torkat **PSC**-plasmaprov. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 baseras på tre grundläggande principer: (1) extraktion för att isolera HIV-1 RNA; (2) reverse transcription av target RNA för att skapa kompletterande DNA (cDNA) och (3) samtidig PCR-amplifiering av target cDNA och detektion av klyvd dubbelmärkt oligonukleotiddetekteringsproben som är specifik för target.

Med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 kan automatisk extraktion utföras följt av automatisk reverse transcription, PCR-amplifiering och detektion av HIV-1 target RNA och HIV-1 Quantitation Standard (QS) Armored RNA. Master Mix-reagenset innehåller primer och prover som är specifika för både HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA. Master Mix har utvecklats för att säkerställa likvärdig kvantifiering av grupp M-subtyper av HIV-1 och av HIV-1-grupp O. Detektion av amplifierat DNA utförs med hjälp av målspecifika och QS-specifika dubbelmärkta oligonukleotidprober som tillåter oberoende identifiering av HIV-1-amplicon och HIV-1 QS-amplicon.

Kvantifiering av HIV-1 viralt RNA utförs med hjälp av HIV-1 QS. Den kompenserar för hämningseffekter och kontrollerar extraktionen och amplifieringen så att kvantifieringen av HIV-1 RNA blir korrekt i varje prov. HIV-1 QS är en icke smittbärande Armored RNA-konstruktion som innehåller HIV-sekvenser med primerbindningsställena som är identiska med HIV-1 RNA target och en unik probbindningsregion som gör att HIV-1 QS-amplicon kan särskiljas från HIV-1 target amplicon.

HIV-1 QS tillsätts i varje prov med ett känt antal kopior och genomgår alla steg i extraktionen, reverse transcription, samtidig PCR-amplifiering och detektion av klyvda dubbelmärkta oligonukleotidprober. Analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 beräknar HIV-1 RNA-koncentrationen i testproverna genom att jämföra HIV-1-signalen med HIV-1 QS-signalen för varje prov och kontroll.

Val av målsekvens

Vilken target RNA-sekvens som ska väljas för HIV-1 beror på identifiering av regioner inom HIV-1-genomet som visar maximal sekvenskonservering bland de olika HIV-1-grupp M-subtyperna och HIV-1-grupp O-prover. För att hantera virusets höga genetiska föränderlighet görs amplifiering och detektion av två regioner av HIV-genomet samtidigt med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Två målspecifika och en QS-specifik dubbelmärkt oligonukleotidprob möjliggör oberoende identifiering av HIV-1-amplicon och av HIV-1 QS-amplicon. Följaktligen är rätt val av primers och den dubbelmärkta oligonukleotidproben mycket viktigt för testets möjlighet att amplifiera och detektera HIV-1-grupp M-subtyper och HIV-1-grupp O. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 använder reverse transcription och PCR-amplifieringsprimers för att definiera sekvenser inom de maximalt konserverade regionerna av HIV-1 *gag*-genen³³ och av HIV-1 LTR-regionen.

Extraktion

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 använder automatisk extraktion i instrumentet COBAS® AmpliPrep med hjälp av en generisk kiselbaserad extraktionsteknik. I proceduren bearbetas 850 µl plasma eller SPEX-baserat extrakt från **PSC**. HIV-1-viruspartiklar lyseras genom inkubering i förhöjd temperatur med en proteas- och kaotropisk lyserings-/bindningsbuffert som frigör nukleinsyran och skyddar extraherat HIV-1 RNA mot RNaser i plasma. Proteas och ett känt antal HIV-1 QS Armored RNA-molekyler tillsätts i varje prov tillsammans med lyseringsreagenset och magnetiska glaspartiklar. Därefter inkuberas blandningen, och HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA binds till de magnetiska glaspartiklarnas yta. Obundna ämnen, t.ex. salter, proteiner och andra cellulära föroreningar tas bort när de magnetiska glaspartiklarna tvättas. När de magnetiska glaspartiklarna har separerats och tvättningen är klar elueras de adsorberade nukleinsyorna i förhöjd temperatur med en vattenbaserad lösning. Det extraherade provet, som både innehåller de magnetiska glaspartiklarna samt det frigjorda HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA, läggs till i amplifieringsblandningen och överförs till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48. HIV-1 target RNA och HIV-1 QS RNA genomgår därefter reverse transcription, amplifiering och samtidigt detektion genom klyvning av två målspecifika och en QS-specifik dubbelmärkt oligonukleotidprob.

Reverse transcription och PCR-amplifiering

Reverse transcription och PCR-amplifieringsreaktionen utförs med det värmebeständiga rekombinanta enzymet *Thermus specie* Z05 DNA-polymeras (Z05). Vid förekomst av mangan (Mn^{2+}) och under korrekta buffertförhållanden har Z05 både reverse transkriptas- och DNA-polymerasaktivitet^{31,32}. På så sätt kan både reverse transcription och PCR-amplifiering ske tillsammans med realtidsdetektion av amplicon.

Extraherade prover tillsätts till amplifieringsblandningen i amplifieringsrör (K-tubes) i vilka såväl reverse transcription som PCR-amplifiering sker. Reaktionsblandningen värms så att nedströmsprimers kan binda specifikt till HIV-1 RNA target och till HIV-1 QS RNA. Vid förekomst av Mn^{2+} och överskott av deoxinukleotidtrifosfater (dNTPs), inklusive deoxiadenosin-, deoxiguanosin-, deoxicytidin-, deoxiuridin- och deoxitymidintrifosfater, förlänger Z05-polymeras bundna primers och bildar DNA-strängar som är komplementära till RNA target.

Målsekvensamplifiering

Extraherade prover tillsätts i amplifieringsblandningen i amplifieringsrör (K-tubes) där PCR-amplifiering sker. Efter reverse transcription av HIV-1 target RNA och HIV-1 QS RNA värms reaktionsblandningen av termocykeln i analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 för att denaturera RNA:cDNA-hybriderna och exponera de specifika primer-målsekvenserna. När blandningen svalnar binder primers till målsekvens-DNA. Vid förekomst av Mn^{2+} och överskott av deoxinukleotidtrifosfater (dNTPs), inklusive deoxiadenosin-, deoxiguanosin-, deoxicytidin-, deoxiuridin- och deoxitymidintrifosfater, förlänger Z05 bundna primers längs målmallarna och producerar dubbelsträngade DNA-molekyler som kallas amplicon. Analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 upprepar automatiskt proceduren ett bestämt antal cykler, varvid varje cykel effektivt fördubblar mängden amplicon-DNA. Det erforderliga antalet cykler förprogrammeras i analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48. Amplifiering förekommer endast i de två regionerna för HIV-1-genomet mellan primers. Hela HIV-1-genomet amplifieras inte.

Selektiv amplifiering

Selektiv amplifiering av target-nukleinsyra från provet kan göras med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 genom användning av AmpErase-enzym (uracil-N-glykosylas) och deoxiuridin-trifosfat (dUTP). AmpErase-enzymet identifierar och katalyserar nedbrytning av DNA-strängar som innehåller deoxiuridin³⁴, men inte DNA som innehåller deoxitymidin.

Deoxiuridin finns inte i naturligt förekommande DNA men finns däremot alltid i amplicon på grund av att deoxiuridintrifosfat används som en dNTP i Master Mix-reagenset, varför endast amplicon innehåller deoxiuridin. Deoxiuridin gör kontaminerande amplicon känsligt för nedbrytning av AmpErase-enzymet före amplifiering av mål-DNA. Eventuella ickespecifika produkter som bildas efter den initiala aktiveringen av Master Mix genom mangan förstörs dessutom av AmpErase-enzymet. AmpErase-enzymet, som ingår i Master Mix-reagenset, katalyserar klyvning av DNA innehållande deoxiuridin vid deoxiuridinresterna genom att öppna deoxiriboskedjan vid C1-positionen. Vid uppvärmning i det första termocyklersteget bryts genom-DNA-kedjan vid deoxiuridinets position vilket ger icke amplifierbart DNA. AmpErase-enzymet är fortsatt inaktivt under en förlängd tidsperiod när det en gång har exponerats för temperaturer över 55 °C, dvs. genom värmecykelstegen, och förstör därför inte target amplicon som bildas under amplifiering.

Detektion av PCR-produkter i ett COBAS® TaqMan®-test

I COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 används PCR-teknik i realtid^{35,36}. Användning av prober märkta med två olika fluorokromer möjliggör realtidsdetektion av PCR-produktansamling genom monitorering av emissionsintensitet av reporterfluorokromer som frigörs under amplifieringen. Proberna består av HIV-1 och HIV-1 QS-specifika oligonukleotidprober med en reporterfluorokrom och en quencherfluorokrom. I COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 märks HIV-1- och HIV-1-proberna med olika reporterfluorokromer. Om proberna är intakta hämmas reporterfluorokromen av quencherfluorokromens närhet på grund av energiöverföringseffekter av Förster-typ. Medan PCR pågår hybridiserar proben till en målsekvens och klyvs med 5' → 3' nukleasaktivitet hos det värmestabila Z05 DNA-polymeraset. När reporterfluorokromen och quencherfluorokromen har frigjorts och separerats förhindras quenching och den fluorescerande aktiviteten hos reporterfluorokromen ökar. Amplifiering av HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA mäts oberoende vid olika våglängder. Proceduren upprepas för ett bestämt antal cykler, varvid varje cykel effektivt ökar emissionsintensiteten hos de enskilda reporterfluorokromerna, vilket ger oberoende identifiering av HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA. PCR-cykeln, där en tillväxtkurva startar exponentiellt tillväxt, relateras till mängden startmaterial i början av PCR.

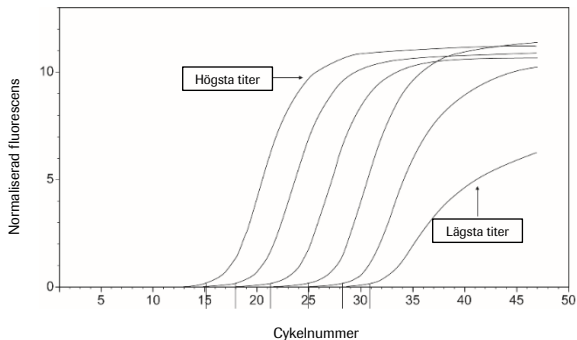
Grundprinciper för COBAS® TaqMan®-testets kvantifiering

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 är till sin natur kvantitativt i ett mycket dynamiskt intervall eftersom kontroll av amplicon sker under amplifieringens exponentiella fas. Ju högre provets HIV-1-titer är, desto tidigare når reporterfluorokromets fluorescens i HIV-1-prober över fluorescensnivåns baslinje (se bild 1). Eftersom mängden HIV-1 QS RNA är konstant mellan alla prover bör reporterfluorokromens fluorescens i HIV-1 QS-proben framträda under en liknande cykel för alla prover (se bild 2). I prover där QS-fluorescensen påverkas justeras koncentrationen på motsvarande sätt. Framträdandet av de specifika fluorescenssignalerna rapporteras som ett kritiskt tröskelvärde (Ct). Ct definieras som det fraktionerade cykelnumret där reporterfluorokromens fluorescens överstiger en fastställd tröskel (angiven fluorescensnivå) och startar faser med exponentiell tillväxt för signalen (se bild 3). Ett högre Ct-värde indikerar en låg titer hos det ursprungliga HIV-1-målmaterialet. En tvåfaldig ökning av titer korrelerar med en minskning med 1 Ct för target HIV-1 RNA, medan en tiofaldig ökning av titer korrelerar med en minskning med 3,3 Ct.

I bild 1 visas måltillväxtkurvan för en spädningsserie över ett 5-log₁₀-intervall. När viruskoncentrationen ökar växlar tillväxtkurvorna till tidigare cykler. Därför motsvarar tillväxtkurvan längst till vänster den högsta virusnivån medan tillväxtkurvan längst till höger motsvarar den lägsta virusnivån.

Bild 1

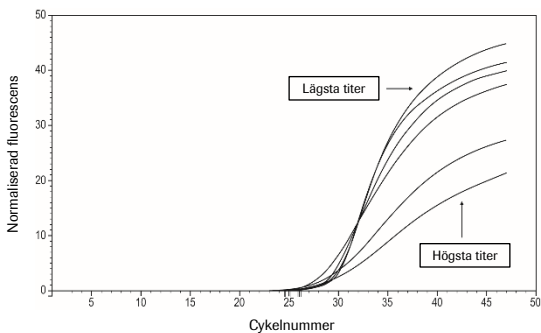
Måltillväxtkurvan för en spädningsserie som sträcker sig över ett 5-log₁₀-intervall



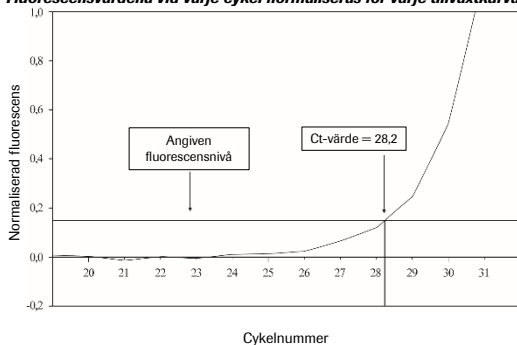
I bild 2 visas Quantitation Standard-tillväxtkurvorna för prover från en virusspädningsserie som täcker ett 5-log₁₀-intervall. Mängden Quantitation Standard som tillsätts i varje prov är konstant för varje reaktion. Ct-värdet för Quantitation Standard är likadant oberoende av virustitern.

Bild 2

Quantitation Standard-tillväxtkurvorna för en spädningsserie virus som sträcker sig över ett 5-log₁₀-intervall



I bild 3 visas ett exempel på hur fluorescensvärdena vid varje cykel normaliseras för varje tillväxtkurva. Det fraktionerade cykelnumret (Ct) beräknas där fluorescenssignalen korsar den angivna fluorescensnivån.

Bild 3**Fluorescensvärdena vid varje cykel normaliseras för varje tillväxtkurva**

HIV-1 RNA-kvantifiering

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 kvantifierar HIV-1-viralt RNA genom att utnyttja en andra målsekvens (HIV-1 Quantitation Standard) som tillsätts i varje prov i känd koncentration. HIV-1 QS är en icke smittbärande, Armored RNA-konstruktion som innehåller fragment av HIV-1-sekvenser med primerbindningsregioner som är identiska med HIV-1-*gag*-målsekvensens. HIV-1 QS innehåller HIV-1-primerbindningsregioner och genererar en amplifieringsprodukt med samma längd- och baskomposition som HIV-1 *gag* target RNA. Detektionsprobbindningsregionen hos HIV-1 QS har modifierats så att HIV-1 QS-amplicon kan särskiljas från HIV-1 *gag* target amplicon.

Under bindningsfasen för PCR i analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 belyses och exciteras proverna av filtrerat ljus och data för filtrerad emissionsfluorescens samlas in för varje prov. Avläsningarna från varje prov korrigeras sedan för instrumentella variationer. Fluorescensavläsningarna skickas automatiskt till programmet AMPLILINK och sparas i en databas. Förkontroller används för att bestämma om HIV-1 RNA- och HIV-1 QS RNA-data motsvarar giltiga uppsättningar. Flaggor genereras när data ligger utanför de angivna gränserna. När alla förkontroller har utförts och avslutats startar fluorescensavläsningarna som genererar Ct-värden för HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA. De lotspecifika kalibreringskonstanterna som medföljer COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 används för beräkning av provernas och kontrollernas titervärde baserat på Ct-värdena för HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 har standardiserats enligt World Health Organizations internationella standard för HIV-1 RNA. Titerresultat anges i kopior/ml (cp/ml) eller internationella enheter/ml (IU/ml). Omvandlingsfaktorn för omvandling mellan rapporterade HIV-1 RNA cp/ml och IU/ml för HIV-1 har fastställts till 0,6 cp/IU (1,67 IU/cp) av Roche Molecular Systems, Inc.

REAGENS

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

HI2CAP

48 tester

HIV-1 v2.0 CS1

(Reagenskassett för HIV-1-magnetiska glaspartiklar)

Magnetiska glaspartiklar
93 % isopropanol

1 x 48 tester

HIV-1 v2.0 CS2

(HIV-1-lyseringsreagenskassett)

Natriumcitrat-dihydrat
42,5 % guanidintiocyanat
< 14 % polydokanol
0,9 % ditiotritol

1 x 48 tester

HIV-1 v2.0 CS3

HIV-1-multireagenskassett som innehåller:

Pase

(proteinaslösning)

Trisbuffert
< 0,05 % EDTA
Kalciumklorid
Kalciumacetat
≤ 7,8 % proteinas
Glycerol

1 x 3,8 ml

EB

(elueringsbuffert)

Tris-bas-buffert
0,2 % metylparaben

1 x 7,0 ml

HIV-1 v2.0 CS4

HIV-1-testspecifik reagenskassett som innehåller:

HIV-1 QS

(HIV-1 Quantitation Standard)

Tris-HCl-buffert
EDTA
< 0,005 % poly rA RNA (syntetiskt)
< 0,001 % Armored HIV-1 RNA-konstruktion innehållande
HIV-1-primerbindningssekvenser samt en unik
probbindningsregion (icke smittbärande RNA i MS2-
bakteriofag)
0,05 % natriumazid

1 x 3,6 ml

HIV-1 MMX

(HIV-1 Master Mix)

Tricinbuffert
Kaliumacetat
Kaliumhydroxid
20 % dimetylsulfoxid
Glycerol
< 0,04 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP
< 0,003 % uppströms- och nedströmsprimers till *gag* och LTR-
regionen av HIV-1
< 0,003 % oligonukleotid-aptamer

1 x 2,5 ml

< 0,003 % fluorescensmärkta oligonukleotidprober specifika för HIV-1 och HIV-1 Quantitation Standard
 < 0,05 % Z05 DNA-polymeras (mikrobiellt)
 < 0,1 % AmpErase-enzym (uracil-N-glykosylas) (mikrobiellt)
 0,09 % natriumazid

CAP/CTM Mn²⁺

(manganlösning för CAP/CTM)

< 0,5 % manganacetat
 Isättika
 0,09 % natriumazid

1 x 19,8 ml

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

(HIV-1-högpositiv kontroll, v2.0)

< 0,001 % Armored HIV-1 RNA-konstruktion
 innehållande HIV-1-sekvenser (icke smittbärande
 RNA i MS2-bakteriofag).

Negativ human plasma, icke-reaktiv enligt tester för
 antikropp mot HCV, antikropp mot HIV-1/2, HIV p24-
 antigen och HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA och HBV
 DNA som inte PCR-metoder kan detektera

0,1 % ProClin® 300 konserveringsmedel

4 x 1,0 ml

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

(HIV-1-lågpositiv kontroll, v2.0)

< 0,001 % Armored HIV-1 RNA-konstruktion
 innehållande HIV-1-sekvenser (icke smittbärande
 RNA i MS2-bakteriofag).

Negativ human plasma, icke-reaktiv enligt tester för
 antikropp mot HCV, antikropp mot HIV-1/2, HIV p24-
 antigen och HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA och HBV
 DNA som inte PCR-metoder kan detektera

0,1 % ProClin® 300 konserveringsmedel

4 x 1,0 ml

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® negativ kontroll (human plasma)]

Negativ human plasma, icke-reaktiv enligt tester för
 antikropp mot HCV, antikropp mot HIV-1/2, HIV p24-
 antigen och HBsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA och HBV
 DNA som inte PCR-metoder kan detektera

0,1 % ProClin® 300 konserveringsmedel

4 x 1,0 ml

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

(HIV-1-högpositiv kontroll, v2.0 streckkodsmärkt klämma)

1 x 4 klämmor

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

(HIV-1-lågpositiv kontroll, v2.0 streckkodsmärkt klämma)

1 x 4 klämmor

HIV-1 (-) C Clip

(HIV-1-negativ kontroll, v2.0 streckkodsmärkt klämma)

1 x 4 klämmor

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent
 (P/N: 03587797 190)

PG WR

1 x 5,1 l

PG WR

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® tvättreagens)
 Natriumcitrat-dihydrat
 < 0,1 % N-metylisotiazolon-HCl

SPEX

(cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent)

42,5 % guanidintiocyanat

0,79 % natriumcitrat

0,01 % citronsyra

3,6 % polydokanol

1,8 % ditiotreitolt

Obs! Detta reagens är valfritt och ska endast användas tillsammans med PSC för att ta fram torkade plasmaprover. Se PSC-metodbladet ms_07963084190.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

A. FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

- B. Detta test är endast avsett att användas med human plasma som samlats i EDTA-antikoagulantia eller erhållits från ett torkat **PSC**-plasmaprov.
- C. Pipettera inte med munnen.
- D. Ät, drick eller rök inte i laboratoriet. Använd engångshandskar, laboratorierock och ögonskydd när du hanterar prover och kitets reagens. Tvätta händerna nogga efter hantering av prover och testreagens.
- E. **Undvik mikrobiell smitta och ribonukleassmitta av reagens när portioner tas från kontrollflaskor.**
- F. **Användning av sterila engångspipetter och RNase-fria pipettspetsar rekommenderas.**
- G. Sammanför inte kontroller från olika loter eller från olika flaskor i samma lot.
- H. Blanda inte reagenskassetter eller kontroller från olika kit.
- I. Öppna inte kassetter från COBAS® AmpliPrep eller byt ut, blanda, ta bort eller lägg till flaskor.
- J. Kassera oanvända reagens, avfall och prover enligt gällande nationella, regionala och lokala föreskrifter.
- K. Använd inte kit efter utgångsdatum.
- L. Säkerhetsdatablad (SDS) erhålls på begäran hos närmaste Roche-kontor.
- M. Prover och kontroller ska behandlas som smittbärande material i enlighet med exempelvis de laboratorierutiner som beskrivs i *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ och i CLSI-dokumentet M29-A3³⁹. Rengör och desinficera noga alla arbetsytor med nyberedd lösning bestående av 0,5 % natriumhypoklorit i avjoniserat eller destillerat vatten.

Obs! Vanliga hushållsblekmedel innehåller normalt 5,25 % natriumhypoklorit. En utspädning 1:10 med hushållsblekmedel ger en lösning med 0,5 % natriumhypoklorit.

Obs! Om spill sker av torkade PSC-plasmaprover i cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPEX) (som innehåller guanidintiocyanat) ska du se till att det inte kommer i kontakt med desinficeringsmedel som innehåller natriumhypoklorit, till exempel blekmedel. Denna blandning kan bilda en mycket giftig gas.

- N. **WARNING: CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 och HIV-1 H(+)C, v2.0** innehåller human plasma som härstammar från humant blod. Källmaterialet har testats och befunnits icke-reaktivt för hepatit B-antigen (HBsAg), antikropp mot HIV-1/2 och HCV samt HIV p24-antigen. Testning av negativ human plasma med PCR-metoder visade inte något detekterbart HIV-1 RNA, HCV RNA eller HBV DNA. Det finns inga testmetoder som ger fullständig säkerhet för att produkter från humant blod inte kan överföra smitta. Allt material av humant ursprung ska därför anses som potentiellt smittsamt. **CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 och HIV-1 H(+)C, v2.0** ska behandlas som smittbärande material i enlighet med exempelvis de laboratorierutiner som beskrivs i *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ och i CLSI-dokumentet M29-A3³⁹. Rengör och desinficera noga alla arbetsytor med nyberedd lösning bestående av 0,5 % natriumhypoklorit i avjoniserat eller destillerat vatten.
- O. **HIV-1 QS, CAP/CTM Mn²⁺ och HIV-1 MMX** innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparrör och bilda mycket explosiva metallazider. Förhindra aziduppyggnad genom att spola med mycket vatten om lösningar som innehåller natriumazid hålls ut i avloppet.
- P. Använd skyddsglasögon, laboratorierock och engångshandskar vid hantering av reagens. Undvik att dessa material kommer i kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Tvätta omedelbart med stora mängder vatten vid eventuell kontakt. Brännskador kan annars uppstå. Vid spill av dessa reagens ska du spåda med vatten innan spillet torkas upp.
- Q. Se till att inte **HIV-1 v2.0 CS2, SPEX** (som används i proceduren med torkade **PSC**-plasmaprover) och vätskeavfall från instrumentet COBAS® AmpliPrep, som innehåller guanidintiocyanat, kommer i kontakt med natriumhypokloritlösning (blekmedel). Dessa blandningar kan bilda en mycket giftig gas.
- R. **SPEX** är ljuskänsligt och levereras i ljusskyddade flaskor.
- S. Undvik all kontakt med natriumhypokloritlösning (blekmedel) när använda COBAS® AmpliPrep-SPU (Sample Processing Units) kasseras. Dessa blandningar kan bilda en mycket giftig gas.
- T. Fler varningar och säkerhetsåtgärder finns i **PSC**-metodbladet ms_07963084190.

FÖRVARING OCH HANTERING

- A. **Reagens och kontroller får inte frysas.**
- B. Kontrollera varje reagenskassett och -behållare före användning och försäkra dig om att det inte finns tecken på läckage. Använd inte material om det finns tecken på läckage.
- C. Förvara **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 och HIV-1 v2.0 CS4** i 2–8 °C. Oanvända är dessa reagens hållbara till angivet utgångsdatum. Efter användning är dessa reagens hållbara i 28 dagar i 2–8 °C, dock längst till angivet utgångsdatum. **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 och HIV-1 v2.0 CS4** kan användas för högst 4 instrumentcykler, upp till 64 timmar sammanlagt i instrumentet COBAS® AmpliPrep. Reagens ska förvaras i 2–8 °C mellan instrumentcykler.
- D. Förvara **HIV-1 H(+)C, v2.0, HIV-1 L(+)C, v2.0 och CTM (-) C** i 2–8 °C. Dessa kontroller är hållbara till angivet utgångsdatum. När förpackningen öppnats ska eventuella oanvända delar av innehållet kasseras.
- E. Förvara streckkodsmärkta klämmor [**HIV-1 H(+)C, v2.0 Clip, HIV-1 L(+)C, v2.0 Clip och HIV-1 (-) C Clip**] i 2–30 °C.
- F. Förvara **PG WR** i 2–30 °C. **PG WR** är hållbart till angivet utgångsdatum. Efter att förpackningen öppnats är reagenset hållbart i 28 dagar i 2–30 °C, dock längst till angivet utgångsdatum.
- G. Förvara **SPEX** (som används i proceduren med torkade **PSC**-plasmaprover) i 2–8 °C. **SPEX** är hållbart till angivet utgångsdatum. Efter att förpackningen öppnats är reagenset hållbart i 28 dagar i 2–30 °C, dock längst till angivet utgångsdatum.
- H. Kraven för förvaring och hantering av **PSC** anges i **PSC**-metodbladet ms_07963084190.

MATERIAL SOM MEDFÖLJER

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

HI2CAP

HIV-1 v2.0 CS1

(Reagenskassett för HIV-1-magnetiska glaspartiklar)

HIV-1 v2.0 CS2

(HIV-1-lyseringsreagenskassett)

HIV-1 v2.0 CS3

(HIV-1-multireagenskassett)

HIV-1 v2.0 CS4

(HIV-1-testspecifik reagenskassett)

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

(HIV-1-högpositiv kontroll, v2.0)

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

(HIV-1-lågpositiv kontroll, v2.0)

CTM (-) C

[COBAS® TaqMan® negativ kontroll (human plasma)]

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

(HIV-1-högpositiv kontroll, v2.0 streckkodsmärkt klämma)

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

(HIV-1-lågpositiv kontroll, v2.0 streckkodsmärkt klämma)

HIV-1 (-) C Clip

(HIV-1-negativ kontroll, streckkodsmärkt klämma)

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

PG WR

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

SPEX

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

Instrument och programvara

- Instrumentet COBAS® AmpliPrep
 - Analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48
 - Tillval: Instrumentet **cobas p 630**
 - Tillval: Docking Station
 - Programmet AMPLILINK, version 3.3- eller version 3.4-serien
 - Kontrollenhet för programmet AMPLILINK, med skrivare
 - Instrument- och programhandböcker:
 - Instrumenthandbok till COBAS® AmpliPrep för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien
 - Instrumenthandbok till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien
 - Instrumenthandbok till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien
 - Applikationshandbok till programmet AMPLILINK version 3.3-serien för användning med instrumentet COBAS® AmpliPrep, analysinstrumentet COBAS® TaqMan®, analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48, analysinstrumentet COBAS® AMPLICOR® och instrumentet **cobas p 630**.
- eller
- Applikationshandbok till programmet AMPLILINK, version 3.4-serien
 - Tillval: Användarhandbok till instrumentet **cobas p 630**, programversion 2.2
- Testdefinitionsfil (TDF). Namn och aktuell version på TDF-filen anges på produktinformationskortet som medföljer kitet.

Engångsartiklar

- Sample Processing Units: SPU
- S-tubes (Sample input tubes) med streckodsklämmer
- Rack för K-tips
- K-tube, förpackning 12 x 96

ÖVRIGT MATERIAL SOM BEHÖVS (ENDAST FÖR ANVÄNDNING AV EDTA-PLASMAPROVER) MEN INTE MEDFÖLJER

- Provrack (SK24 rack)
- Reagensrack
- SPU-rack
- K-tube-öppnare/tillslutare, motordriven
- K-tube-öppnare/tillslutare
- K-carrier
- K-carrier-transportör
- K-carrier-rack
- Pipetter med RNase-fria spetsar och aerosolbarrär eller positiv förskjutning (kapacitet 1 000 µl)*
- Engångshandskar, puderfria
- Vortexmixer

* Pipetterna ska ha en noggrannhet inom 3 % av angiven volym. RNase-fria spetsar med aerosolbarrär eller positiv förskjutning ska användas då så anges för att hindra överföring av smitta mellan prov och amplicon.

ÖVRIGT MATERIAL OCH FÖRBRUKNINGSARTIKLAR SOM BEHÖVS (ENDAST FÖR ANVÄNDNING AV TORKADE PSC-PLASMAPROVER) MEN INTE MEDFÖLJER

- **cobas®**-plasmasepareringskort*
- Tänger eller pincetter, antingen sterila eller avsedda för engångsbruk**
- 140 µl-kapillär (t.ex. Vitrex-plaströr) med kompatibel dispenser (t.ex. Vitrex-pipethållare)*
- Lansett för engångsbruk (t.ex. Greiner Bio-one: MiniCollect®-säkerhetslansett med penetrationsdjup 2,00 mm)*
- Provpåse (av transparent plast, med återförslutningsbart ziplock) och torkmedelspåsar med kiselgel (för totalt 4 gram). För förvaring och transport av **PSC**, se **PSC**-metodbladet ms_07963084190.
- Transportpåse (t.ex. Wicoseal 180 x 60 x 240 mm)
- Pipett (t.ex. Multistepper-pipett)
- Eppendorf Thermomixer® (t.ex. modell R 5355 eller C eller motsvarande) med termoblock för 24 kryorör

* Mer information om **PSC**-provtagning finns i **PSC**-metodbladet ms_07963084190.

** Använd en ny tång för varje patient för att förhindra överföring av smitta! Vi rekommenderar att du använder metalltänger som autoklaveras efter att de har använts en gång.

PROVTAGNING, TRANSPORT OCH FÖRVARING AV EDTA-PLASMAPROVER

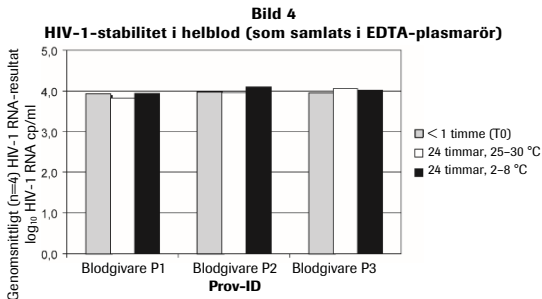
Obs! Hantera alla prover och kontroller som potentiellt smittbärande.

Obs! Detta test är endast validerat för användning med human plasma som samlats i EDTA-antikoagulantia eller erhållits från ett torkat PSC-plasmaprov. Testning av andra provtyper kan resultera i felaktiga resultat.

A. Provtagning

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 är avsett att användas med plasmaprover. Blod ska uppsamlas i sterila rör med EDTA som antikoagulant och blandas enligt provrörstillverkarens instruktioner.

Förvara helblod i 2–25 °C i högst 24 timmar. Separera plasma från helblod inom 24 timmar efter provtagning genom centrifugering i 800–1 600 x g i 20 minuter i rumstemperatur. Överför plasman till ett sterilt polypropylenrör. I bild 4 visas provstabilitetsdata från provstabilitetsstudier som utförts med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).

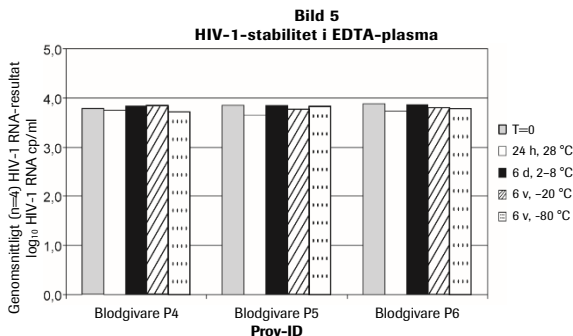


B. Transport av prover

Vid transport av helblod eller plasma ska gällande bestämmelser för transport av etiologiska agens följas⁴⁰. Helblod ska transporteras i 2–25 °C och centrifugeras inom 24 timmar efter provtagning. Plasma kan transporteras i 2–8 °C eller frusen i –20 °C till –80 °C.

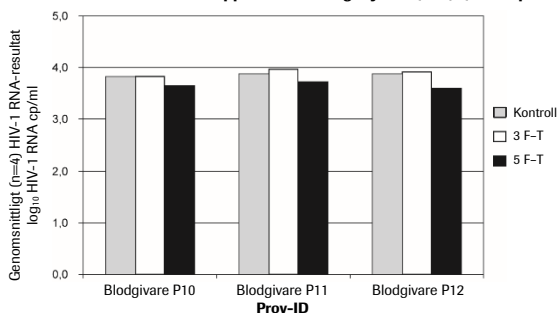
C. Förvaring av prover

Plasmaprover kan förvaras i rumstemperatur (25–30 °C) i upp till 1 dag eller i 2–8 °C i upp till 6 dagar. Plasmaprover visade sig vara hållbara i sex veckor om de förvaras frysta i –20 °C till –80 °C. Vi rekommenderar att prover förvaras i portioner om 1 100–1 200 µl i sterila, 2,0 ml polypropylenrör med skruvkork (till exempel Sarstedt 72.694.006). I bild 5 visas provhållbarhetsdata från provförvaringsstudier som utförts med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).



Plasmaprover kan frysas och tinas upp till fem gånger utan signifikant förlust av HIV-1 RNA. I bild 6 visas data från en tinningsstudie som utförts med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).

Bild 6
HIV-1-resultat efter upp till fem tinningscykler (F-T) (EDTA-plasma)



PROVTAGNING, TRANSPORT OCH FÖRVARING AV TORKADE PSC-PLASMAPROVER

Obs! Hantera alla prover och kontroller som potentiellt smittbärande.

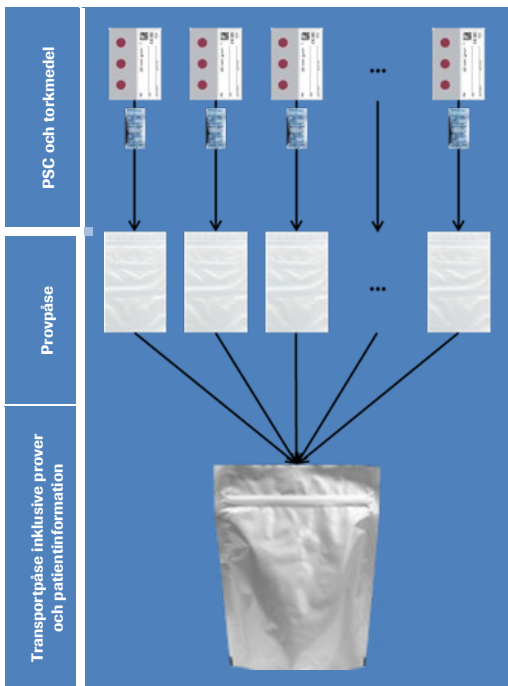
Obs! Detta test är endast validerat för användning med human plasma som samlats i EDTA-antikoagulantia eller erhållits från ett torkat PSC-plasmaprov. Testning av andra provtyper kan resultera i felaktiga resultat.

A. Provtagning

Torkade **PSC**-plasmaprover tas med lämpliga kliniska procedurer. Utgångsdatum för **PSC** måste kontrolleras innan användning. Fortsätt endast om **PSC** inte har passerat utgångsdatum och om den förseglade påsen med **PSC** är helt försluten och oskadad. Märk **PSC** med patientens namn, födelsedatum samt datum och tid för provtagningen. Använd ett lämpligt kapillärlinje och dispenser för att tillsätta 140 µl helblod i varje cirkel på **PSC**-membranet som avgränsas av spotting-lagret. Vi rekommenderar att du tillsätter blod på alla tre skivorna på **PSC** för att möjliggöra omtestning. Tillsätt inte blodprover från mer än en patient på ett **PSC**. Kontrollera att BÅDA sidorna på **PSC**-skivorna (framsidan: membran med blod; baksidan: skiva med plasma) är mättade efter 5 minuter. Kontrollera baksidan genom det transparenta lagret på baksidan. Se till att membranet inte kommer i kontakt med handskar, instrument eller andra ytor som kan vara kontaminerade under processen.

Låt **PSC** torka i rumstemperatur i minst 4 timmar (som längst över natten) och skydda det mot direkt solljus. Ta inte bort spotting-lagret. Detta görs på laboratoriet. Efter torkningen ska **PSC** läggas i en individuell provpåse tillsammans med 4 gram torkmedel, och påsen ska förslutas (bild 7). De insamlade provpåsar måste förpackas i en transportpåse tillsammans med de tillhörande patientinformationsbladen. Vi rekommenderar att maximalt 25 **PSC**-kort förpackas i en transportpåse.

Bild 7
Översikt över förpackningsproceduren för transport av PSC



B. Transport av prover

Om prover ska transporteras ska de förpackas och etiketteras i enlighet med nationella och/eller internationella föreskrifter för transport av prover och etiologiska agens. Transportpåsar som innehåller **PSC**-kort ska transporteras inom 28 dagar i 18–45 °C och upp till 85 % luftfuktighet.

C. Förvaring av prover

PSC-kort i individuella propåsar med 4 gram torkmedel som i sin tur ligger i en transportpåse kan förvaras i rumstemperatur (18–30 °C) i 2–8 °C eller i ≤ -10 °C i upp till 56 dagar efter transport (med och utan lagerseparering).

BRUKSANVISNING

Obs! Detaljerad information om användning, vilka konfigurationer som kan väljas, utskrift av resultat samt tolkning av flaggor, kommentarer och felmeddelanden finns i: (1) instrumenthandboken till instrumentet COBAS® AmpliPrep för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien; (2) instrumenthandboken till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien; (3) instrumenthandboken till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 för användning med programmet AMPLILINK, version 3.3- och 3.4-serien; (4) applikationshandboken till programmet AMPLILINK, version 3.3-serien för användning med instrumentet COBAS® AmpliPrep, analysinstrumentet COBAS® TaqMan®, analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48, analysinstrumentet COBAS® AMPLICOR® och instrumentet cobas p 630 eller applikationshandboken till programmet AMPLILINK, version 3.4-serien; (5) Tillval: användarhandbok till instrumentet cobas p 630, programversion 2.2.

Informationen i del A–C och F–J gäller för båda provtyperna (EDTA-plasma och torkade PSC-plasmaprover). Del D innehåller information om beställning och laddning av endast EDTA-plasmaprover. Del E innehåller information om beställning och laddning av endast torkade PSC-plasmaprover.

Omgångsstorlek

Varje kit innehåller reagens som räcker till 48 tester som kan utföras i omgångar om 12 till 24 tester. Minst en kontroll vardera av [CTM (–) C, HIV-1 L(+)C, v2.0 och HIV-1 H(+)C, v2.0] måste ingå i varje omgång (se avsnittet "Kvalitetskontroll").

Arbetsflöde

Körningen med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 måste startas inom 120 minuter efter att prov- och kontrollextraktionen har slutförts.

Obs! De extraherade proverna och kontrollerna får inte frysas eller förvaras i 2–8 °C.

Prov- och kontrollpreparation

Obs! Om frysta prover används ska proverna placeras i rumstemperatur tills de är helt tinade och vortexas i 3–5 sekunder innan de används. Kontrollerna ska tas bort från förvaringen i 2–8 °C och värmas till rumstemperatur innan de används.

Installera instrumentet COBAS® AmpliPrep

Del A. Underhåll och prime

- A1. Instrumentet COBAS® AmpliPrep är färdigt att användas i standbyläge.
- A2. Slå **PÅ** kontrollenheten för programmet AMPLILINK. Förbered kontrollenheten på följande sätt:
 1. Logga in på Microsoft Windows-operativsystemet.
 2. Dubbelklicka på programikonen AMPLILINK.
 3. Logga in på AMPLILINK-programmet genom att ange ditt användar-id och lösenord.
- A3. Kontrollera förrådet av **PG WR** med hjälp av fönstret **Status** och byt om det behövs.
- A4. Utför det underhåll som anges på fliken Due. Instrumentet COBAS® AmpliPrep utför automatiskt prime på systemet.

Del B. Ladda reagenskassetter

Obs! *Alla reagenskassetter ska tas bort från förvaringen i 2–8 °C, omedelbart sättas in i instrumentet COBAS® AmpliPrep och ekvilibreras till rumstemperatur i instrumentet i minst 30 minuter innan det första provet bearbetas. Ställ inte reagenskassetterna utanför instrumentet när de ska uppnå rumstemperatur eftersom kondens kan bildas på streckkodsetiketterna. Torka inte av kondensen om sådan uppstår på streckkodsetiketterna.*

- B1. Placera **HIV-1 v2.0 CS1** på ett reagensrack. Placera **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** och **HIV-1 v2.0 CS4** på ett separat reagensrack.
- B2. Ladda det reagensrack som innehåller **HIV-1 v2.0 CS1** i rackposition **A** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.
- B3. Ladda det reagensrack som innehåller **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** och **HIV-1 v2.0 CS4** i rackposition **B**, **C**, **D** eller **E** i instrumentet COBAS® AmpliPrep. (Ytterligare information finns i tabell 1).

Del C. Ladda engångsartiklar

Obs! *Fastställ hur många COBAS® AmpliPrep reagenskassetter, SPU (Sample Processing Units), Input Sample tubes (S-tubes), K-tips och K-tubes som behövs. En SPU, ett Input S-tube, en K-tip och ett K-tube behövs för varje prov eller kontroll.*

Det finns flera olika arbetsflöden för användning av instrumentet COBAS® AmpliPrep med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48. Se tabell 1 nedan. Sätt in det antal reagens-kassettrack, provrack med Input S-tubes, SPU-rack, K-tip-rack, K-tube-rack och K-carriers i K-carrier-rack som krävs för det arbetsflöde som valts, i respektive rackposition i instrumentet COBAS® AmpliPrep (ytterligare information finns i Tabell 1).

- C1. Placera SPU i SPU-racken och ladda racken i rackposition **J**, **K** eller **L** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.
- C2. Ladda fyllda K-tube-rack i rackposition **M**, **N**, **O** eller **P** enligt valt arbetsflöde i instrumentet COBAS® AmpliPrep.
- C3. Ladda fyllda K-tip-rack i rackposition **M**, **N**, **O** eller **P** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.
- C4. Vid arbetsflöde 3, när analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 används, ska K-carriers laddas i K-carrier-rack i rackposition **M** och **N** eller **O** och **P** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.

Tabell 1
Möjliga arbetsflöden när instrumentet COBAS® AmpliPrep används
med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48

Arbetsflöde		Överföringsläge till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48	Rack, carriers och engångsartiklar	Position i instrumentet COBAS® AmpliPrep
1	Instrumentet COBAS® AmpliPrep plus Docking Station plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan®	Automatisk överföring av K-carrier	K-tubes i fulla K-tube-rack	M-P
			K-tips i fulla K-tip-rack	M-P
			Input S-tubes som innehåller patientprover och kontroller i provrack	F-H
			SPU i SPU-rack	J-L
			CS1 i kassettrack	A
			CS2, CS3, CS4 i kassettrack	B-E
2	Instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan®	Manuell överföring av K-tubes via provrack till analysinstrumentet COBAS® TaqMan®	K-tubes i fulla K-tube-rack	M-P
			K-tips i fulla K-tip-rack	M-P
			Input S-tubes som innehåller patientprover och kontroller i provrack	F-H
			SPU i SPU-rack	J-L
			CS1 i kassettrack	A
			CS2, CS3, CS4 i kassettrack	B-E
			När provextraktionen har slutförts: K-tubes i provrack (färdiga för manuell överföring)	Samma som ovan (F-H)
3	Instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48	Manuell överföring av K-carrier via K-carrier-rack till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48	K-tubes i provrack	F-H
			K-tips i fulla K-tip-rack	M-P
			Input S-tubes som innehåller patientprover och kontroller i provrack	F-H
			SPU i SPU-rack	J-L
			CS1 i kassettrack	A
			CS2, CS3, CS4 i kassettrack	B-E
			Tom K-carrier med streckkod i K-carrier-rack	M-P
			När provextraktionen har slutförts: K-tubes i K-carrier i K-carrier-rack	Samma som ovan (M-P)

Del D. Beställa och ladda prover: EDTA-plasmaprover

- D1. Bered provrack på följande sätt: Fäst en streckkodsklämma i de provrackspositioner där ett prov (S-tube) ska placeras. Anslut en av de specifika streckkodsklämmorna för kontroller [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0** och **HIV-1 H(+)C, v2.0**] till de provrackspositioner där kontrollerna (S-tube) ska placeras. Streckkodsklämmorna för kontroller ska ha samma kontrollotsnummer som lotnumret på kontrollflaskorna i kitet. Var noga med att tilldela varje kontroll positionen med motsvarande kontrollstreckkodsklämma. Placera ett Input S-tube i varje position som är märkt med en streckkodsklämma.
- D2. Använd programmet AMPLILINK och välj testdefinitionsfil (HI2CAP96 för instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan®, HI2CAP48 för instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48), skapa provbeställningar för varje prov och kontroll på filen **Sample** i fönstret **Orders** och avsluta genom att spara.
- D3. Tilldela prov- och kontrollbeställningarna rackpositioner på filen **Sample Rack** i fönstret **Orders**. Provracksnumret måste gälla det rack som bereddes i steg D1.
- D4. Skriv ut **rapporten för provracksbeställning** som ett arbetsblad.
- D5. Bered prov- och kontrollrack i det område som är avsett för överföring av prover och kontroller på följande sätt: Vortexa varje prov och kontroll [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0** och **HIV-1 H(+)C, v2.0**] i 3 till 5 sekunder. Undvik att förorena handskena när du hanterar prover och kontroller.
- D6. Överför 1 000 till 1 050 µl av varje prov och kontroll [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)C, v2.0** och **HIV-1 H(+)C, v2.0**] i rätt streckkodsmärkt Input S-tube med hjälp av en mikropipett med RNase-fri spets med aerosolbarriär eller positiv förskjutning. **Undvik att överföra partiklar och/eller fibrinkoagel från ursprungsproverna till Input S-tube.** Prover och kontroller ska överföras till de rörpositioner som tilldelats och antecknats på arbetsbladet i steg D4. Streckkodsklämmorna för kontroller ska ha samma kontrollotsnummer som lotnumret på kontrollflaskorna i kitet. Tilldela varje kontroll positionen med motsvarande kontrollstreckkodsklämma. **Undvik att kontaminera den övre delen av S-tube med prover eller kontroller.** Läs användarhandboken till instrumentet **cobas p 630** om du använder **cobas p 630** för extraktion.
- D7. Om arbetsflöde 1 eller 2 används ska provracken som är fyllda med Input S-tubes placeras i rackposition **F, G** eller **H** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.
- D8. Om arbetsflöde 3 används med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 ska provracken laddas med Input S-tubes och K-tubes (ett för varje Input S-tube, i den högra positionen intill Input S-tubes) i rackposition **F, G** eller **H** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.

Del E. Beställa och ladda prover: Torkade PSC-plasmaprover

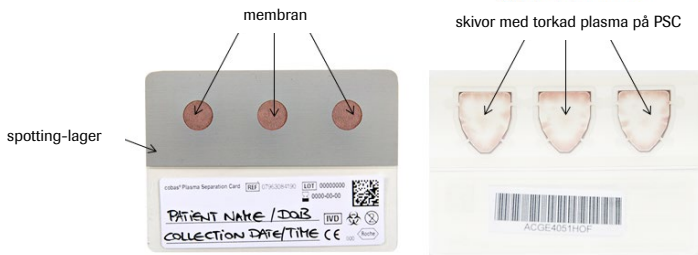
- E1. Kontrollera att transportpåsen är intakt innan du öppnar den. Fortsätt endast om transportpåsen är fullständig försluten.

Öppna transportpåsen och fortsätt sedan endast om följande villkor är uppfyllda för varje provpåse:

- Laboratoriets beställningsformulär är helt ifyllt.
- Streckkoden på laboratoriets beställningsformulär och **PSC** överensstämmer.
- Provpåsen är helt försluten och innehåller ett **PSC** med 4 gram torkmedel.
- Ett datum för provtagningen är angivet, och provtagningen utfördes de senaste 28 dagarna och innan utgångsdatum för **PSC**.
- **PSC** har inte passerat utgångsdatum.
- Skivan med torkad plasma på **PSC** ser homogen ut på framsidan och är helt täckt med plasma när den observeras från baksidan (se Bild 8).

Bild 8

**Skivor med torkad plasma på PSC som ska bearbetas
(till vänster: framsidan, till höger: baksidan)**

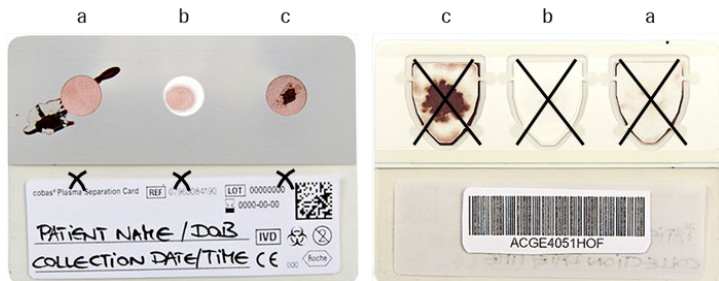


- E2. Skivorna med torkad plasma på **PSC** ska markeras och avvisas om:
- det syns blodspill (bild 9a) och/eller om membranet inte är helt täckt med blod (bild 9b) och området på **PSC**-skivans framsida därför inte är homogent och/eller om en baksida inte är helt täckt med plasma (syns genom racket).
 - membranet är skadat (bild 9c) och området på **PSC**-skivans framsida därför inte är homogent och baksidan är mörkröd-brunaktig (syns genom racket).

Obs! De tre skivorna är avsedda för att möjliggöra omtestning. Ett PSC kan innehålla en skiva med dålig kvalitet, men tillhandahåller ändå prover som är bra testmaterial. Märk ut skivorna med dålig kvalitet tydligt så att det är enkelt att känna igen dem. Märk dem inte på spotting-lagret. Jämför alltid de tre skivorna med varandra för att bedöma kvaliteten på dem.

Bild 9

Avvisningskriterier för PSC-kort (till vänster: framsida; till höger: baksida). Skivor där det finns blodspill (a) eller där membranet inte är täckt (b) eller där membranet (c) är synligt skadat ska inte bearbetas. Skivor som avvisas ska markeras tydligt.



- E3. Bered provrack på följande sätt: Fäst en streckodsklämma i de provrackspositioner där ett prov (S-tube) ska placeras. Anslut en av de specifika streckodsklämmorna för kontroller [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)-C, v2.0** och **HIV-1 H(+)-C, v2.0**] till de provrackspositioner där kontrollerna (S-tube) ska placeras. Streckodsklämmorna för kontroller ska ha samma kontrollotsnummer som lotnumret på kontrollflaskorna i kitet. Var noga med att tilldela varje kontroll positionen med motsvarande kontrollstreckodsklämma. Placera ett Input S-tube i varje position som är märkt med en streckodsklämma.
- E4. Använd programmet AMPLILINK och välj rätt testdefinitionsfil (HI2PSC96 för instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan®, HI2PSC48 för instrumentet COBAS® AmpliPrep plus analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48), skapa provbeställningar för varje prov och kontroll på fliken **Sample** i fönstret **Orders** och avsluta genom att spara.
- E5. Tilldela prov- och kontrollbeställningarna rackpositioner på fliken **Sample Rack** i fönstret **Orders**. Provracksnymret måste gälla det rack som bereddes i steg E1. Patientstreckkoden på baksidan av **PSC** kan skannas genom provpåsen (Bild 10). Öppna inte provpåsen i detta läge och avsluta genom att spara.

Bild 10

Skanning av provstreckkod för beställning av torkade PSC-plasmaprover



- E6. Skriv ut rapporten **Sample Rack Order** för att använda som arbetsblad och verifiera igen att rätt testfil används.

- E7. Utför steg E7 till E11 under en säkerhetshuv. Öppna provpåsen för det valda **PSC** och ta bort spotting-lagret (bild 11). Böj **PSC** något och ta bort en skiva med torkad plasma med en steril tång eller pincett genom att dra den uppåt. Böj den borttagna skivan med torkad plasma på **PSC** för att göra det enklare att föra in den i röret (bild 12).

Bild 11
Borttagning av spotting-lagret



Bild 12
Borttagning och böjning av PSC-skivan med torkad plasma



Obs! Använd en tång eller pincett per patient.

- E8. Överför en böjd **PSC**-skiva med torkad plasma till motsvarande Input S-tube så att den nedre spetsen på **PSC**-skivan med torkad plasma når ned till botten på röret och fäster på rörets vägg. Detta görs för att förhindra pipetteringsfel (bild 13 och bild 14).

Obs! Skivor med torkad plasma kan bli sköra vid förvaring. Se information om krav på förvaring för PSC. Hantera dem varsamt när de sätts in i röret

Bild 13
Överföring av PSC-skiva med torkad plasma till röret

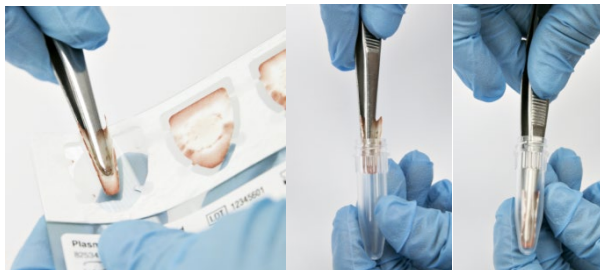
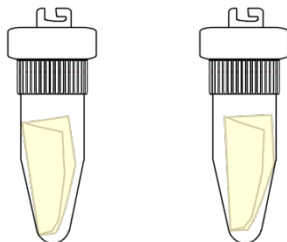


Bild 14
Bästa placering av PSC-skiva med torkad plasma i S-Tube



Godkänt

Potentiell risk för koagel

Obs! *Säkerställ att positionsnumret för Input S-tube i rapporten Sample Rack Order är detsamma som SK24-rackpositionen.*

- E9. Lägg tillbaka **PSC** med de återstående skivorna med torkad plasma i den ursprungliga provpåsen med 4 gram nytt torkmedel för eventuell omtestning (Bild 15). **PSC**-kort kan förvaras i 56 dagar efter transport med och utan separerat spotting-lager (i 18–30 °C, 2–8 °C eller i ≤ -10 °C).

Bild 15
PSC i provpåse för eventuell omtestning



- E10. Stäng Input S-tube och flytta röret som innehåller **PSC**-skivan med torkad plasma till position 4–24 i SK24-racket (mer information finns i tabell 2). Upprepa proceduren tills alla prover har bearbetats.

Obs! *Låt SPEX värmas till rumstemperatur innan det används.*

- E11. Öppna Input S-tubes ett i taget, spara locket på en ren plats och tillsätt 1 100 µl **SPEX** i varje Input S-tube (Bild 16). Förslut Input S-tube. Upprepa proceduren tills alla prover har bearbetats.

Bild 16
1 100 µl SPEX tillsatt i varje torkat PSC-plasmaprov



Obs! Undvik att kontaminera den övre delen av Input S-tubes med prover och kontrollera att rören är ordentligt förslutna för att förhindra avdunstning.

- E12. Flytta Input S-tubes till en Eppendorf Thermomixer och inkubera preparerade Input S-tubes i 56 °C och med kontinuerlig skakning i 1 000 rpm i 10 minuter för att extrahera viruset från den torkade plasman (Bild 17).

Bild 17
Inkubering utförs i 10 minuter.



Obs! Starta inkuberingen direkt efter tillsättningen av SPEX.

- E13. Bered kontrollerna på följande sätt när inkuberingen pågår.

Obs! Inkubera inte kontrollerna.

Placera ett Input S-tube i varje position (1 till 3) i det förberedda SK24-racket som är märkt med en streckkodsklämma.

Blanda 1 flaska med **CTM (-) C** noggrant i 20 sekunder genom att vortexa. Överför 1 000 µl **CTM (-) C** till Input S-tube 1 i SK24-racket. Förslut detta Input S-tube omedelbart.

Blanda 1 flaska med **HIV-1 L(+)C, v2.0** noggrant i 20 sekunder genom att vortexa. Överför 1 000 µl **HIV-1 L(+)C, v2.0** till Input S-tube 2 i SK24-racket. Förslut detta Input S-tube omedelbart.

Blanda 1 flaska med **HIV-1 H(+)C, v2.0** noggrant i 20 sekunder genom att vortexa. Överför 1 000 µl **HIV-1 H(+)C, v2.0** till Input S-tube 3 i SK24-racket. Förslut detta Input S-tube omedelbart.

Tabell 2
Beställning och laddning av torkade PSC-plasmaprover

Prov	AMPLILINK- beställningsposition	Eppendorf IsoRack- position	SK24-rackposition
Prov	Input S-tube	Input S-tube	Input S-tube
CTM(-)C	1	Tom	1
HIV-1 L(+)C, v2.0	2	Tom	2
HIV-1 H(+)C, v2.0	3	Tom	3
Torkat PSC - plasmaprov + 1 100 µl SPEG	4-24	4-24	4-24

E14. Efter inkuberingen överför du proverna i rätt ordning till SK24-racket som innehåller kontrollerna (steg E13) (mer information finns i tabell 2).

Obs! Kontrollera att PSC-skivan med torkad plasma fortfarande är korrekt placerad (bild 14) och ändra läge för den med en steril pipettspets om det behövs. Om det finns bubblor tar du bort dem med en steril pipettspets.

E15. Ladda provracken som är fyllda med Input S-tubes i rackposition **F, G** eller **H** i instrumentet COBAS® AmpliPrep.

Del F. Starta körning med instrumentet COBAS® AmpliPrep

F1. Starta instrumentet COBAS® AmpliPrep med hjälp av programmet AMPLILINK.

Del G. Avsluta körning med instrumentet COBAS® AmpliPrep och överföring till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 (endast för arbetsflödena 2 och 3 i Tabell 1)

G1. Kontrollera om det finns flaggor eller felmeddelanden.

G2. Ta bort extraherade prover och kontroller från instrumentet COBAS® AmpliPrep, antingen i provrack (för analysinstrumentet COBAS® TaqMan® utan Docking Station) eller i K-carrier-rack (för analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48) enligt aktuellt arbetsflöde (mer information finns i del G).

G3. Avlägsna avfall från instrumentet COBAS® AmpliPrep.

Obs! Alla extraherade prover och kontroller ska skyddas mot ljus efter att prov- och kontrollextraktionen har slutförts.

Amplifiering och detektion

Förberedelse av analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48

Körningen med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 måste startas inom 120 minuter efter att prov- och kontrollextraktionen har slutförts.

Obs! De extraherade proverna och kontrollerna får inte frysas eller förvaras i 2–8 °C.

Del H. Ladda extraherade prover

- H1. Överför K-tubes till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 genom att utföra de steg som krävs för det arbetsflöde som används:

Arbetsflöde 1: Automatisk överföring av K-carrier via Docking Station till analysinstrumentet COBAS® TaqMan®. Det krävs inga manuella insatser.

Arbetsflöde 2: Manuell överföring av K-tubes i provrack till analysinstrumentet COBAS® TaqMan®.

Arbetsflöde 3: Manuell överföring av K-carrier i K-carrier-rack till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48. Manuell överföring av K-carriers till analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 med hjälp av K-carrier-transportören.

Del I. Starta körning med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48

- I1. Starta analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 med ett av alternativen nedan beroende på vilket arbetsflöde som används:

Arbetsflöde 1: Inga insatser krävs.

Arbetsflöde 2: Automatisk start av analysinstrumentet COBAS® TaqMan® efter insättning av provrack.

Arbetsflöde 3: Fyll K-carriern med tomma K-tubes om det finns färre än 6 K-tubes på K-carriern. Du får information om hur det ska göras av programmet AMPLILINK. Öppna termocyklerskyddet, sätt in K-carriern i termocyklern och stäng locket. Starta körningen med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48.

Del J. Avsluta körning med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48

- J1. När körningen i analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48 har slutförts ska resultatrapporten skrivas ut. Kontrollera att rätt testdefinitionsfil har använts och leta efter flaggor eller felmeddelanden i rapporten Result. Hur prover med flaggor och kommentarer ska tolkas beskrivs i avsnittet Resultat. Efter att data har godkänts ska de sparas.
- J2. Ta bort använda K-tubes från analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48.

RESULTAT

HIV-1 RNA-koncentrationen för proverna och kontrollerna fastställs automatiskt i analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48. **HIV-1 RNA-koncentrationen uttrycks i cp/ml eller IU/ml, beroende på testdefinitionsfilen som används. Omvandlingsfaktorn för omvandling mellan HIV-1 RNA cp/ml och IU/ml för HIV-1 är 0,6 cp/IU, enligt WHO:s första internationella standard för HIV-1 RNA för NAT-testning (NAT) (NIBSC 97/656)³⁷. Denna omvandlingsfaktor bestämdes med COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5 och COBAS® TaqMan® HIV-1 Test för användning med High Pure System.**

Programmet AMPLILINK:

- Fastställer cykeltröskelvärdet (Ct) för HIV-1 RNA och HIV-1 QS RNA.
- Fastställer HIV-1 RNA-koncentrationen baserat på Ct-värdena för HIV-1 RNA och HIV-1 RNA samt de lotspecifika kalibreringskoefficienter som anges på kassetten streckkoder.
- Fastställer att beräknade cp/ml för **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** och **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** ligger inom tilldelat intervall.

Validering av omgång – AMPLILINK version 3.3- och version 3.4-serien

Försäkra dig om att omgången är giltig genom att kontrollera om det förekommer flaggor eller kommentarer i utskriften eller i resultatfönstret i programmet AMPLILINK. För kontrollbeställningar utförs en kontroll för att bestämma om kontrollens kopior/ml- eller IU/ml-värde ligger inom dess angivna intervall. Om kontrollens kopior/ml- eller IU/ml-värde ligger utanför intervallet genereras en flagga som visar att kontrollen har misslyckats.

Omgången är giltig om inga flaggor visas för någon av kontrollerna **[HIV-1 L(+)**C**, v2.0; HIV-1 H(+)**C**, v2.0 och CTM (-)**C**]**.

Omgången är inte giltig om någon av följande flaggor visas för HIV-1-kontrollerna:

Negativ kontroll

Flagga	Resultat	Betydelse
NC_INVALID	Invalid	Ett ogiltigt resultat eller ett "giltigt" resultat som inte var negativt för HIV-1 target

HIV-1-lågpositiv kontroll, v2.0

Flagga	Resultat	Betydelse
LPCINVALID	Invalid	Ett ogiltigt resultat eller en kontroll som ligger utanför intervallet

HIV-1-högpositiv kontroll, v2.0

Flagga	Resultat	Betydelse
HPCINVALID	Invalid	Ett ogiltigt resultat eller en kontroll som ligger utanför intervallet

Om omgången är ogiltig måste du upprepa hela körningen inklusive prov- och kontrollextraktion, amplifiering och detektion.

Tolkning av resultat

För en giltig omgång ska varje enskilt prov kontrolleras avseende flaggor eller kommentarer på resultatutskriften. Tolkta resultaten så här:

- En giltig omgång kan innehålla både giltiga och ogiltiga provresultat, beroende på om flaggor och/eller kommentarer erhålls för de enskilda proverna.

Provresultaten tolkas på följande sätt:

	Titerresultat	Betydelse
	Target Not Detected	Ct-värde för HIV-1 över gränsen för analysen eller inget Ct-värde för HIV-1 har erhållits. Rapportera resultat som "HIV-1 RNA inte detekterat".
Kopior/ml	< 2,00E+01 cp/ml (plasma) < 738 cp/ml (PSC)	Beräknat cp/ml ligger under analysens detektionsgräns. Rapportera resultat som "HIV-1 RNA detekterat, mindre än 20 HIV-1 RNA cp/ml" för plasma och "HIV-1 RNA detekterat, mindre än 738 HIV-1 RNA cp/ml" för PSC .
	≥ 2,00E+01 cp/ml och ≤ 1,00E+07 cp/ml (plasma) ≥ 738 cp/ml och ≤ 1,00E+07 cp/ml (PSC)	Beräknade resultat som är större än eller lika med 20 cp/ml och mindre än eller lika med 1,00E+07 cp/ml ligger inom analysens linjära intervall vid användning med plasma. Beräknade resultat som är större än eller lika med 738 cp/ml och mindre än eller lika med 1,00E+07 cp/ml ligger inom analysens linjära intervall vid användning med PSC .
	> 1,00E+07 cp/ml (plasma och PSC)	Beräknat cp/ml ligger över analysens intervall. Rapportera resultat som "större än 1,00E+07 HIV-1 RNA cp/ml". Om kvantitativa resultat önskas ska det ursprungliga provet spädas 1:100 med HIV-1-negativ human EDTA-plasma och testet upprepas. Multiplicera det rapporterade resultatet med spädningsfaktorn.
Internationella enheter/ml	< 3,34E+01 IU/ml (plasma)	Beräknat IU/ml ligger under analysens detektionsgräns. Rapportera resultat som "HIV-1 RNA detekterat, mindre än 33,4 HIV-1 RNA IU/ml" för plasma.
	≥ 3,34E+01 IU/ml och ≤ 1,67E+07 IU/ml (plasma)	Beräknade resultat som är större än eller lika med 33,4 IU/ml och mindre än eller lika med 1,67E+07 IU/ml ligger inom analysens linjära intervall vid användning med plasma.
	> 1,67E+07 IU/ml (plasma)	Beräknat IU/ml ligger över analysens intervall. Rapportera resultat som "större än 1,67E+07 HIV-1 RNA IU/ml". Om kvantitativa resultat önskas ska det ursprungliga provet spädas 1:100 med HIV-1-negativ human EDTA-plasma och testet upprepas. Multiplicera det rapporterade resultatet med spädningsfaktorn.

Obs! Prover som ligger ovanför analysens intervall och som genererar ett ogiltigt resultat med flaggan "QS_INVALID" ska inte rapporteras som > 1,00E+07 cp/ml eller 1,67E+07 IU/ml. Det ursprungliga provet ska spädas 1:100 med HIV-1-negativ human EDTA-plasma och testet upprepas. Multiplicera det rapporterade resultatet med spädningsfaktorn.

Obs! Titerresultat "Failed". Betydelse: Provet bearbetades inte på rätt sätt vid extraktionen i instrumentet COBAS® AmpliPrep.

Obs! Titerresultat "Invalid". Betydelse: Ett ogiltigt resultat.

KVALITETSKONTROLL

En **CTM (-) C**, en **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** och en **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** måste ingå i varje testomgång. Omgången är giltig om inga flaggor visas för någon av kontrollerna [**HIV-1 L(+)**C**, v2.0**; **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** och **CTM (-) C**].

Kontrollera om det finns flaggor och kommentarer i utskriften så att du säkerställer att omgången är giltig.

Negativ kontroll

CTM (-) C måste ge ett "Target Not Detected"-resultat. Om **CTM (-) C** flaggas som ogiltig är hela omgången ogiltig. Upprepa hela förfarandet (prov- och kontrollpreparation, amplifiering och detektion). Om **CTM (-) C** är konsekvent ogiltig i flera omgångar ska du kontakta Roche kundsupport och begära teknisk hjälp.

Positiva kontroller

Det tilldelade titerintervallet för **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** och **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** är unikt för varje reagenslot och anges på reagenskassetten streckkod i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

HIV-1 RNA cp/ml för **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** och **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** ska ligga inom tilldelat titerintervall. Om den ena eller båda av de positiva kontrollerna flaggas som ogiltig är hela omgången ogiltig. Upprepa hela förfarandet (prov- och kontrollpreparation, amplifiering och detektion). Kontakta Roche kundsupport och begär teknisk hjälp om HIV-1 RNA-titern för en eller båda positiva kontrollerna konsekvent ligger utanför intervallet i flera omgångar.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Liksom för alla testmetoder är det mycket viktigt att använda god laboratorieteknik för att denna analys ska fungera korrekt.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Detta test har endast validerats för användning med human plasma som samlats i EDTA-rör med antikoagulerande medel. Testning av andra provtyper kan resultera i felaktiga resultat.
2. Egenskaperna hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 har varken utvärderats med prover som innehåller HIV-1-grupp N eller med prover som innehåller HIV-2.
3. Resultatens tillförlitlighet förutsätter rätt provtagning, transport, förvaring och behandling av prover.
4. Förekomsten av AmpErase-enzym i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 Master Mix minskar risken för amplicon-kontaminering. Smitta från HIV-1-positiva kontroller och kliniska prover kan dock endast undvikas om god laboratoriesed iakttas och de förfaranden som beskrivs i denna bipacksedel nogt följs.
5. Endast personal med erfarenhet av PCR-teknik bör använda produkten.
6. Denna produkt kan endast användas tillsammans med instrumentet COBAS® AmpliPrep och analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48.
7. Mutationer inom de maximalt konserverade regionerna på det virusgenom som täcks av primers och/eller prover för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 är visserligen sällsynta, men kan göra att ett lägre kvantifieringsresultat erhålls eller att viruset inte kan detekteras.
8. Detektion av HIV-1 RNA är beroende av antalet viruspartiklar i provet och kan påverkas av provtagningsmetoder och patientfaktorer (t.ex. ålder, förekomst av symptom och/eller infektionsstadium). Den kliniska specificiteten för testet är 99,3 % (95 % KI = 98,2 % till 99,8 %), men vissa falskt positiva resultat för låg koncentration hos HIV-negativa personer har observerats.
9. På grund av skillnader mellan metoder rekommenderas användaren, innan en metod byts ut mot en annan, att genomföra metodkorrelationsanalyser i laboratoriet för att bestämma skillnaderna mellan metoderna.

INTERFERERANDE ÄMNEN

Förhöjda nivåer av triglycerider (upp till 3 500 mg/dl), bilirubin (upp till 28 mg/dl), albumin (upp till 8 900 mg/dl), hemoglobin (upp till 900 mg/dl) och humant DNA (upp till 0,4 mg/dl) i prover samt förekomst av autoimmuna sjukdomar eller respektive markörer, t.ex. systemisk lupus erythematosus (SLE), reumatoid artrit (RA) och antinukleära antikroppar (ANA) har visat sig inte interferera med kvantifiering av HIV-1 RNA eller påverka specificiteten hos testet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Utvärderingen utfördes enligt riktlinjen CLSI Guideline EP7-A2 med en reagenslot i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Följande läkemedelsföreningar som testats 3 gånger vid topplasmanivå (Cmax) har visat sig inte interferera med kvantifiering av HIV-1 RNA eller påverka specificiteten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0:

HIV-läkemedel:	
Proteashämmare Atazanavir Darunavir Fosamprenavir Lopinavir/Ritonavir Nelfinavirmesyilat Ritonavir Sakvinavir Tipranavir	Nukleosidanalog reverse transkriptas-hämmare Abakavirsulfat Didanosin, ddl Emtricitabin Lamivudin, 3TC Stavudin, 4dT Tenofovir DF Zidovudin
Integrashämmare Raltegravir	Ikke-nukleosidanalog reverse transkriptas-hämmare Efavirenz Nevirapin
Inträdeshämmare Maraviroc	Fusionshämmare Enfuvirtid
HBV- och/eller HCV-läkemedel:	
Nukleotidanalog Adefovir dipivoxil	Nukleosidanalog Entecavir Telbivudin
Immunmodulatorer Peginterferon α -2a Peginterferon α -2b Ribavirin	
Föreningar för behandling av herpesvirus:	
Nukleotidanalog Acyklovir	Nukleotidderivat Ganciklovir Valganciklovir HCl

UTVÄRDERING AV ICKE-KLINISKA EGENSKAPER

Viktiga prestandaegenskaper för EDTA-plasmaprover

A. Detektionsgräns

Detektionsgränsen för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 bestämdes genom att testa den andra internationella WHO-standard för HIV-1 RNA, NIBSC-kod 97/650⁴², HIV-1-subtyp B, utspädd i HIV-1-negativ human EDTA-plasma. Detektionsgränsen fastställdes för tre reagensloter. Tre spädningar analyserades för varje reagenslot. Totalt testades cirka 126 replikat per koncentrationsnivå. Utvärderingen utfördes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A.

Koncentrationen av HIV-1 RNA som kan detekteras med ett positivitetsvärde som är större än 95 % enligt PROBIT-analys är 20 cp/ml eller 33 IU/ml. Resultatet för de enskilda loterna var 17,7 cp/ml (95-procentigt konfidensintervall: 13,7–26,9 cp/ml) för lot 1, 17,0 cp/ml (95-procentigt konfidensintervall: 14,0–22,6 cp/ml) för lot 2 och 14,2 cp/ml (95-procentigt konfidensintervall: 11,2–22,1 cp/ml) för lot 3. De kombinerade resultaten för alla tre reagensloterna visas i Tabell 3. **Omvandlingsfaktorn mellan IU/ml och cp/ml bestämdes med COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5 och COBAS® TaqMan® HIV-1 Test för användning med High Pure System.**

Tabell 3
Detektionsgräns för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Nominell input (HIV-1 RNA IU/ml)	Nominell input (HIV-1 RNA cp/ml)	Antal replikat	Antal positiva	Positivitetsvärde
100	60	126	126	100 %
67	40	186	185	99 %
50	30	126	125	99 %
33	20	126	124	98 %
25	15	59	53	90 %
17	10	126	108	86 %
8	5	125	66	53 %
0	0	126	0	0 %
PROBIT 95 % träffsannolikhet		27,5 IU/ml (95-procentigt konfidensintervall: 23,8–33,0 IU/ml)		
		16,5 cp/ml (95-procentigt konfidensintervall: 14,3–19,8 cp/ml)		

Dessutom analyserades spädningar av cellodlingssupernatanter som representerade HIV-1-grupp M-subtyperna A–H i HIV-1-negativ human EDTA-plasma med två reagensloter. För varje HIV-1-subtypisolat testades flera koncentrationsnivåer (nominella titrar mellan 10 och 75 cp/ml) i 24 replikat per reagenslot. Tilldelningen av nominella koncentrationer till cellodlingsstammamaterial utfördes med ett genomsnitt av titrarna för COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, titern för analysen VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) och analysen Abbott RealTime HIV-1. Träffsannolikhetsanalys visar ett positivitetsvärde som är större än 95 % för alla subtyper vid 20 cp/ml eller lägre. De kombinerade resultaten för de två reagensloterna visas i tabell 4.

Tabell 4
Detektionsgränsverifiering för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Subtyp	Isolatbeteckning	Lägst koncentration ≥ 95 % träffsannolikhet (cp/ml)
A	92UG029	10
A	4 237A/98	20
B	92TH026	20
B	8E5/LAV	20
C	92BR025	20
C	3 777A/97	11
D	92UG021	20
D	92UG035	11
CRF01_AE	92TH022	12
CRF01_AE	92TH009	14
F	93BR020	20
G	ARP173/RU570	13
H	HIV V1557	16

B. Precision

Precisionen för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 bestämdes genom analys av seriella spädningsprover av ett HIV-1-celldodningssupernatantprov (HIV-1 subtyp B) i HIV-1-negativ human EDTA-plasma. Titertilldelningen för celldodningssupernatant (stamkoncentration) utfördes med en metod som garanterar spårbarhet till WHO:s 1:a internationella standard för HIV-1 RNA, NIBSC-kod 97/656³⁶. Tre reagensloter analyserades och 15 körningar per reagenslot utfördes, var och en bestående av 6 spädningsnivåer och 3 replikat på varje nivå. Varje prov genomgick hela testproceduren med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, inklusive extraktion, amplifiering och detektion. Därför representerar den precision som anges här alla aspekter av testproceduren. Resultaten för varje reagenslot och för de tre reagensloterna i kombination visas i Tabell 5.

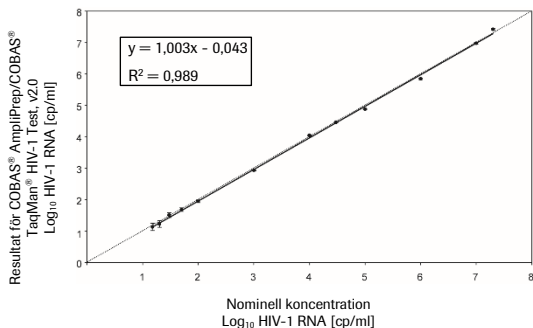
Tabell 5
Precision för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Titer (cp/ml)	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Alla tre lotterna i kombination	
	Total SD i log	Total SD i log	Total SD i log	Total SD i log	Total lognormal CV (%)
1,0E+02	0,19	0,16	0,17	0,17	41
1,0E+03	0,07	0,09	0,07	0,08	20
1,0E+04	0,07	0,07	0,06	0,07	16
1,0E+05	0,04	0,05	0,07	0,06	15
1,0E+06	0,10	0,09	0,10	0,10	25
1,0E+07	0,11	0,12	0,14	0,13	33

C. Linjärt intervall

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 visade sig ge ett linjärt svar från 20 ($\log_{10} = 1,30$) HIV-1 RNA cp/ml till $1,0 \times 10^7$ ($\log_{10} = 7,00$) HIV-1 RNA cp/ml. Utvärderingen utfördes enligt CLSI-riktlinjen EP6-A med två reagensloter från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och seriella spädningsnivåer av ett HIV-1 RNA (+)-cellodlingssupernatantprov med hög titer. Två reagensloter analyserades och 15 körningar per reagenslot utfördes, var och en bestående av 12 spädningsnivåer och 3 replikat på varje nivå. Resultaten för en reagenslot visas i bild 18.

Bild 18
Linjäritet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0



D. Inklusivitet för HIV-1 grupp M

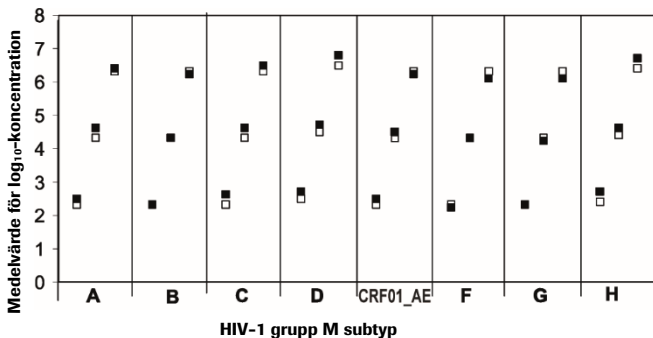
Åtta subtypskategorier har föreslagits för HIV-1 grupp M baserat på nukleotiddivergens. Subtyperna betecknas med stora bokstäver från A till H⁴¹.

Egenskaperna hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 för HIV-1-subtyper utvärderades genom analys av cellodlingsstammamaterial från representanter ur var och en av HIV-1 grupp M-subtyperna A-H. Tilldelningen av nominella koncentrationer till cellodlingsstammamaterial utfördes med ett genomsnitt av titrarna för COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, titern i VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) och analysen Abbott RealTime HIV-1. Varje cellodlingsstammamaterial späddes till nominella koncentrationer på cirka $2,00 \times 10^2$, $2,00 \times 10^4$ och $2,00 \times 10^6$ cp/ml i EDTA-plasma. Koncentrationerna testades sedan i 10 replikat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, med en reagenslot. Medelvärdet för $\log_{10}$ titrar för alla koncentrationer och subtyper jämfördes med respektive $\log_{10}$ nominell titer.

Utvärderingen av de 8 HIV-1-subtypisolaten med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 visar likvärdiga resultat för alla testade representanter av HIV-1 grupp M-subtyperna (se bild 19). Medelvärdet för $\log_{10}$ -koncentrationen låg inom $\pm 0,3 \log_{10}$ av den tilldelade input-koncentrationen.

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

□ nominell koncentration ■ COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

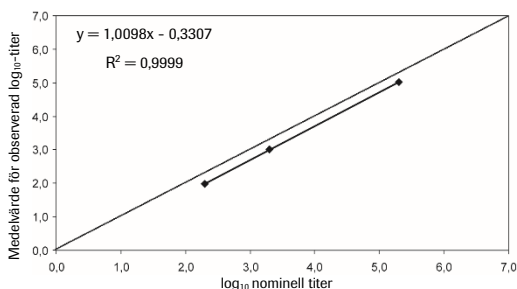


E. Detektion av HIV-1 grupp O

Spädningar av en HIV-1 grupp O-celldodlingssupernatant (isolat MVP5180) i human EDTA-plasma analyserades med två reagensloter. Flera koncentrationer (nominella titrar mellan 10 och 75 cp/ml) testades i 24 replikat per reagenslot. Tilldelningen av den nominella koncentrationen till celldodlingsstammaterialet utfördes med analysen Abbott RealTime HIV-1. Träffsannolikhetsanalys visar ett positivitetsvärde som är större än 95 % vid 20 cp/ml.

HIV-1 grupp O-celldodlingsstammaterialet späddes till nominella koncentrationer på cirka 2,00E+02, 2,00E+03 och 2,00E+05 cp/ml i EDTA-plasma. Koncentrationerna testades sedan i 10 replikat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, med en reagenslot. Medelvärdet för log₁₀-titrar för alla koncentrationer var linjära och inom $\pm 0,3 \log_{10}$ av respektive nominell log₁₀-titer (se Bild 20).

Bild 20
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
Linjäritet subtyp O (MVP5180)



Dessutom testades 10 cellodlingsmaterial och ett utspätt patientprov (11613) representerande HIV-1 grupp O parallellt i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och Abbott RealTime HIV-1 Assay. Alla 11 prover befanns positiva med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 (se Tabell 6). Båda testerna returnerade ett medelvärde för $\log_{10}$ titer för de 11 proverna som ligger inom 0,1 $\log_{10}$.

Tabell 6
Identifiering av HIV-1 grupp O-isolat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

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

F. Specifitet

Specifiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 fastställdes med två reagensloter genom analys av HIV-1-negativ EDTA-plasma från bloddonatorer. Totalt 660 enskilda EDTA-plasmaprover visade giltiga resultat och samtliga var negativa för HIV-1 RNA i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Baserat på dessa resultat är specifiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 100 % (ensidig nedre 95-procentig konfidsensgräns: $\geq 99,6$ %).

G. Analytisk specifitet

Den analytiska specifiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 utvärderades genom att odlade organismer (virus, bakterier, svamp) eller DNA (HTLV-2) tillsattes med input-koncentrationen $5E+04$ partiklar/ml i HIV-1-negativ human EDTA-plasma och med koncentrationen $1,5E+02$ cp/ml (HIV-1) i HIV-1-positiv EDTA-plasma (se Tabell 7).

Ingen av de organismer som testades visade korsreaktivitet med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. HIV-1-positiva prover returnerade titerresultat som ligger inom $\pm 0,5 \log_{10}$ från en HIV-1-positiv kontroll.

Tabell 7
Prover för bestämning av analytisk specifitet

Virus	Bakterier
<i>Adenovirus typ 5</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Epstein-Barr-virus</i>	
<i>Humant herpesvirus typ 6</i>	
<i>Herpes simplex-virus typ 1</i>	
<i>Herpes simplex-virus typ 2</i>	
<i>Humant T-cellymfotropvirus typ 1</i>	
<i>Humant T-cellymfotropvirus typ 2</i>	
<i>Influensa A</i>	
<i>Hepatit A-virus</i>	
<i>Hepatit B-virus</i>	
<i>Hepatit C-virus</i>	

	Svamp
	<i>Candida albicans</i>

H. Metodkorrelation

Egenskaperna hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfördes med COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test och med Abbott RealTime HIV-1 Assay genom analys av 92 prospektivt insamlade, utspädda HIV-1-positiva kliniska prover och genom analys av 34 utspädda cellodlingssupernatanter. Proven bestod av HIV-1 grupp M-subtyperna A till H och av cirkulerande rekombinanta former av viruset, och analyserna utfördes på två externa ställen. Totalt 126 prover från hela det dynamiska intervallet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 testades med de fyra testerna. Endast giltiga titerpar inom de linjära intervallen för båda de jämförda analyserna användes för Demings regressionsanalys (se bild 21 till bild 23).

Bild 21
Korrelation för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

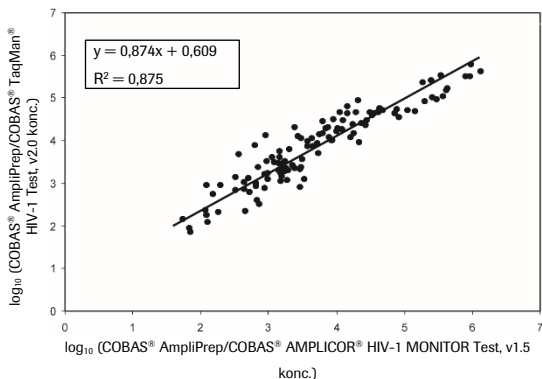


Bild 22
Korrelation för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

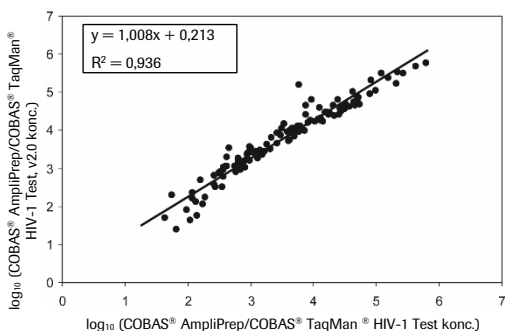
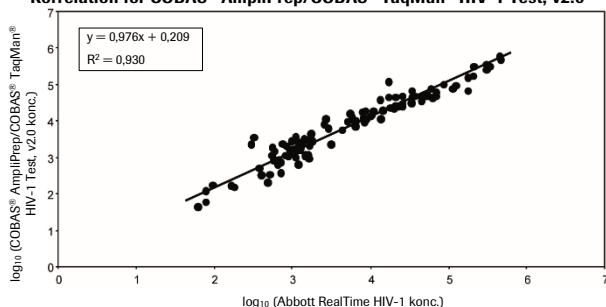


Bild 23

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



I. Felfrekvens inom hela systemet

Felfrekvensen inom hela systemet för två kitloter av COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2 bestämdes genom att testa 113 replikat för lot 1 och 114 replikat för lot 2 av EDTA-plasma spikad med HIV-1 grupp M subtyp B. De här proverna testades vid en målkonzentration på ungefär $3 \times \text{LoD}$. De kombinerade resultaten (lot 1 och 2) i den här studien fastställde att ett replikat gav ett negativt resultat för HIV-1-målet, vilket gav en felfrekvens inom hela systemet på 0,4 %.

Viktiga prestandaegenskaper för torkade PSC-plasmaprover

A. Detektionsgräns för plasma med plasmasepareringskortet

Plasmadetekteringsgränsen för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** bestämdes genom analys av plasmatitrar som hade tilldelats till seriespädningar av celloddningssupernatanter som representerade HIV-1 grupp M i HIV-negativt humant helblod. Paneler med fem koncentrationer plus ett negativt prov testades med tre loter av **PSC**-kort och tre loter av COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test-reagens under flera körningar och dagar och med olika användare och instrument. En del av panelprovet med det högsta värdet centrifugerades och plasmatitern tilldelades med hjälp av CBM-metoden (Calibrator Bracketing Method) och **cobas**® HIV-1 (på **cobas**® 6800/8800 Systems) enligt WHO:s tredje internationella HIV-1-standard för HIV-1 grupp M, subtyp B för beredning av den höga och låga kalibratorm.

Resultaten för **PSC** visas i Tabell 8. Studien visar att COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** detekterade HIV-1 RNA vid en koncentration på 737,9 cp/ml fastställt med Probit-analys med en träffsannolikhet på 95 %.

Tabell 8
Detektionsgräns för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

HIV-1 grupp M tilldelad plasmakonzentration (cp/ml)	Antal reaktiva	Antal giltiga replikat	% reaktiva
1691,1	61	61	100 %
1098,1	51	51	100 %
2276,4	61	62	98,39 %
845,6	59	60	98,33 %
549,1	46	49	93,88 %
1138,2	59	60	98,33 %
563,7	54	60	90,00 %
366	49	53	92,45 %
758,8	56	61	91,80 %
281,9	46	62	74,19 %
183	36	49	73,47 %
379,4	50	62	80,65 %
140,9	38	63	60,32 %
91,5	22	54	40,74 %
189,7	37	63	58,73 %
0	0	63	0,00 %
0	0	54	0,00 %
0	0	59	0,00 %
PROBIT 95 % träffsannolikhet		737,9 cp/ml (95-procentigt konfidensintervall: 614,3–938,5 cp/ml) 1 230 IU/ml (1023,8–1564,2 IU/ml)	

Uppskattning av LoD i helblod:

Det går inte att exakt fastställa de motsvarande titrarna i helblod för samma prov, eftersom helblod inte är en provtyp för testning av virusmängd. Helblodstitrar baserade på mängden HIV-1 RNA som spikats i helblodsserum användes inte för uppskattning av LoD eftersom mängden spikat RNA inte nödvändigtvis motsvarar mängden RNA i plasma. Det kan återstå RNA i buffy-coaten även efter centrifugering eller associerat med cellfraktionen i helblod. Men eftersom spikade helblodstitrar har använts i andra metoder (t.ex. torkade blodprover) för att bestämma detektionsgränsen i helblod kan en uppskattning av LoD i helblod för **PSC** tillhandahållas med hjälp av en empirisk faktor som antas vara relaterad till den genomsnittliga erytrocytvolymfractionen (45 %) för proverna (Tabell 9).

LoD-värden för helblod uppskattas baserat på förhållandet:

Uppskattad LoD för helblod = LoD för **PSC**-plasma/1,8

Tabell 9
Uppskattad LoD för helblod

LoD vid PROBIT-analys (95 % träffsannolikhet)	439,0 cp/ml
95-procentigt konfidensintervall	366,1–557,6 cp/ml

B. Precision med plasmasepareringskortet

Precisionen för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** bestämdes genom analys av seriella spädningar av ett HIV-1-högpositivt prov (ett HIV-1 RNA-positivt celledodlingsupernatantprov med hög titer) i HIV-negativt EDTA-helblod. Fem spädningsnivåer testades i 48 replikat för varje nivå och provbearbetningsvolymer i två loter från **PSC** och två reagensloter från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 med två CAP/CTM Systems och två användare under 12 dagar. Varje prov genomgick hela **PSC**-arbetsflödet och proceduren för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Precisionresultaten som anges här representerar alla aspekter av testproceduren. Resultaten visas i Tabell 10.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** visade hög precision för två loter av **PSC** och reagens som testades i ett koncentrationsintervall från 7,38+02 cp/ml till 1,00E+07 cp/ml.

Tabell 10
Precision inom laboratoriet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med PSC

Uppmätt koncentration (cp/ml)	Källmaterial	Poolad SD
6,31E+06	Cellodling	0,08
1,05E+06	Cellodling	0,09
1,02E+05	Cellodling	0,12
1,05E+04	Cellodling	0,19
2,29E+03	Cellodling	0,25

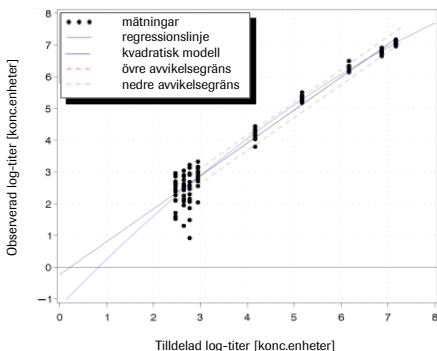
C. Linjäritet intervall med plasmasepareringskortet

Studien av linjäritet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** utfördes med hjälp av en spädningsserie som bestod av 9 panelprover som omfattade det linjära intervallet för den dominerande HIV-1-gruppen M subtyp B. Panelproverna bereddes från ett HIV-1 RNA-positivt cellodlingssupernatantprov med hög titer. Utvärderingen utfördes enligt CLSI-riktlinjen EP06-A²⁰. Två **PSC** och två reagensloter analyserades på två CAP/CTM Systems, av tre användare och med totalt 20 replikat per koncentrationsnivå.

En del av ett panelprov centrifugerades och plasmatitern tilldelades med hjälp av CBM-metoden (Calibrator Bracketing Method) och **cobas®** HIV-1 (på **cobas®** 6800/8800 Systems) enligt WHO:s tredje internationella HIV-1-standard för HIV-1-grupp M, subtyp B för beredning av den höga och låga kalibratoren.

I kombination med **PSC** är COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 linjärt från 7,38+02 cp/ml till 1,00E+07 cp/ml och visar en absolut avvikelse från den bättre passande icke-linjära regressionen på mindre än $\pm 0,16 \log_{10}$ med **PSC** (se Bild 24). Över hela det linjära intervallet var noggrannheten för testet inom $\pm 0,3 \log_{10}$.

Bild 24
Linjäritet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med plasmasepareringskortet



D. Verifiering av subtyp med plasmasepareringskortet

Även om HIV-subtypen inte ska påverka **PSC**-prestandan späddes odlade HIV-1-prover för de vanliga HIV-1M-subtyperna (A, C och D) till en koncentrationsnivå i helblod. Bestämningen av precision och noggrannhet utfördes med 12 replikat för varje prov. Testningen utfördes med 1 lot av **PSC** och 1 lot av reagens för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Varje helblodsprov centrifugerades och plasmatitern tilldelades med hjälp av CBM-metoden (Calibrator Bracketing Method) och **cobas**® HIV-1 (på **cobas**® 6800/8800 Systems) enligt WHO:s tredje internationella HIV-1-standard för HIV-1-grupp M, subtyp B för beredning av den höga och låga kalibratorm.

Resultaten visas i Tabell 11. De här resultaten bekräftar att COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** detekterade HIV för HIV-1M (A, C och D).

Tabell 11
Verifiering av HIV-1-grupp M-subtyperna A, C och D

HIV-1 M-subtyp	Antal giltiga replikat	Noggrannhet	Precision	Plasma jämfört med PSC-plasma Ekvivalens
Subtyp A	12	-0,02	0,09	0,17
Subtyp C	12	0,13	0,16	0,06
Subtyp D	12	0,07	0,15	0,05

E. Specifitet med plasmasepareringskortet

Specifiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** bestämdes genom analys av HIV-negativa EDTA-helblodsprover från individuella blodgivare. 160 individuella EDTA-helblodsprover testades med två loter av **PSC** och två loter av reagens för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Ett prov testade positivt och 159 negativt för HIV-1 RNA. I testpanelen var specifiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** 99,4 % (95-procentig konfidensgräns: $\geq 97,07$ %).

F. Felfrekvens inom hela systemet med plasmasepareringskortet

Felfrekvensen inom hela systemet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 i kombination med **PSC** bestämdes genom att testa 100 replikat av EDTA-helblod spikat med HIV-1-grupp M subtyp B. De här proverna testades vid en målkonzentration på ungefär 3 x LoD. Resultaten i den här studien fastställde att inga replikat gav ett negativt resultat för HIV-1-målet, vilket gav en felfrekvens inom hela systemet på 0 %.

UTVÄRDERING AV KLINISKA EGENSKAPER

Viktiga prestandaegenskaper för EDTA-plasmaprover

Reproducerbarhet

Reproducerbarheten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 utvärderades i EDTA-plasma med 2 olika arbetsflöden (analysinstrumentsystemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® och analysinstrumentsystemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48). Studien genomfördes med paneler som utformats med välkarakteriserat odlat HIV-1-virus grupp M, subtyp B och med EDTA-plasma som var negativ för HIV1 RNA och antikroppar mot HIV-1/2. Panelen täcker in det dynamiska intervallet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, och de viktigaste medicinska beslutspunkterna för den avsedda användningen stöds av 2008 års riktlinjer från Department of Health and Human Services för användning av antiretrovirala läkemedel på HIV-1-infekterade vuxna och tonåringar¹³. Studien var utformad för att utvärdera viktiga variabler som bidrar till varians för den totala precisionen, till exempel lot, laboratorium/instrument, användare, dag/körning och variation inom körning. Ytterligare analyser utfördes för att jämföra egenskaper och varierande precision mellan de två arbetsflödena. Två användare på 3 olika laboratorier vardera utförde tester i 5 dagar med var och en av de 3 reagens-kitloterna med vart och ett av arbetsflödena. Varje körning bestod av en uppsättning kontroller (1 högpositiv, 1 lågpositiv och 1 negativ) och en panel med 7 prover som testades tre gånger (21 provresultat) på instrumentet COBAS® AmpliPrep. De extraherade proverna och kontrollerna amplifierades och detekterades med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® eller med analysinstrumentet COBAS® TaqMan® 48.

Reproducerbarheten utvärderades genom användning av en så kallad random effects-modell med villkor för (a) lot, (b) laboratorium/instrument, (c) användare relaterad till laboratorium/instrument, (d) dag/körning relaterad till lot, laboratorium/instrument och användare och (e) inom körning-komponenter för portioner, med hjälp av PROC MIXED och log₁₀-omvandlade resultat. Procentandelen för variabiliteten orsakad av variationen för varje komponent och koefficient för den log₁₀-omvandlade HIV-1 RNA-koncentrationen beräknades. Endast data inom analysintervallet (2,00E+01 till 1,00E+07 cp/ml) undersöktes.

I Tabell 12 visas variansen för den totala precisionen och standardavvikelsen för den totala precisionen som erhöles med analysinstrumentsystemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® vid bestämning med variansanalys. Generellt sett bidrog inom körning-komponenten med mer variabilitet än andra komponenter.

Tabell 12
Tillämpbar procentandel av den totala variansen, standardavvikelse
för den totala precisionen och lognormal CV för HIV-1 RNA-koncentrationen ($\log_{10}$ cp/ml)
från tester inom analysintervallet

HIV-1 RNA-koncentration ($\log_{10}$ cp/ml)			Bidrag till den totala variansen (%)					Total precision
Förväntad	Observerad (genomsnitt)	Antal giltiga tester ¹	Lot	Laboratorium/ instrument	Användare	Dag/ körning	Inom körning	Standard- avvikelse (lognormal % CV)
1,699	1,832	270	5 %	2 %	0 %	8 %	85 %	0,20 (48 %)
2,602	2,676	275	6 %	1 %	0 %	17 %	77 %	0,11 (25 %)
3,000	3,067	274	16 %	0 %	4 %	12 %	69 %	0,10 (24 %)
3,699	3,822	273	20 %	6 %	0 %	17 %	57 %	0,10 (23 %)
4,699	4,746	273	27 %	0 %	0 %	14 %	59 %	0,07 (17 %)
5,699	5,644	274	33 %	10 %	0 %	19 %	38 %	0,10 (23 %)
6,699	6,751	259	27 %	14 %	0 %	20 %	39 %	0,12 (27 %)

Obs! Resultat inom analysintervallet är från 20 cp/ml till 1,00E+07 cp/ml (1,30 $\log_{10}$ cp/ml till 7,00 $\log_{10}$ cp/ml).

¹ Antal tester inom analysintervallet.

Resultat erhållna från arbetsflödet med systemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 sammanfattas i Tabell 13. Generellt sett bidrog inom körning-komponenten med mer variabilitet än andra komponenter, med undantag för panelprovet med den högsta titern.

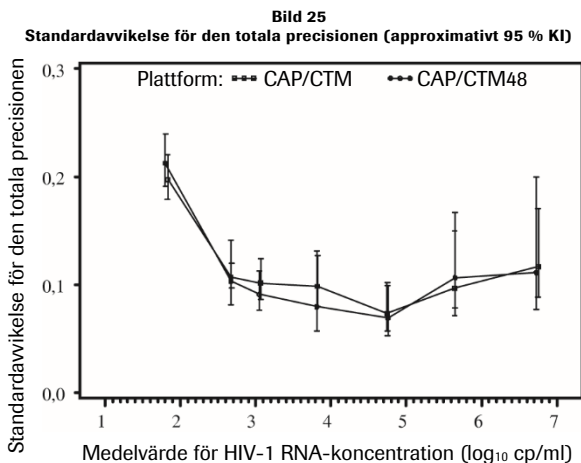
Tabell 13
Tillämpbar procentandel av den totala variansen, standardavvikelse
för den totala precisionen och lognormal CV för HIV-1 RNA-koncentrationen ($\log_{10}$ cp/ml)
från tester inom analysintervallet

HIV-1 RNA-koncentration ($\log_{10}$ cp/ml)			Bidrag till den totala variansen (%)					Total precision
Förväntad	Observerad (genomsnitt)	Antal giltiga tester ¹	Lot	Laboratorium/ instrument	Användare	Dag/ körning	Inom körning	Standard- avvikelse (lognormal % CV)
1,699	1,804	266	7 %	2 %	0 %	2 %	89 %	0,21 (52 %)
2,602	2,672	273	26 %	0 %	2 %	5 %	68 %	0,10 (24 %)
3,000	3,048	272	17 %	0 %	0 %	6 %	77 %	0,09 (21 %)
3,699	3,814	271	39 %	0 %	2 %	13 %	46 %	0,08 (19 %)
4,699	4,756	272	30 %	0 %	0 %	10 %	61 %	0,07 (16 %)
5,699	5,647	272	35 %	0 %	6 %	16 %	43 %	0,11 (25 %)
6,699	6,727	269	45 %	0 %	4 %	13 %	38 %	0,11 (26 %)

Obs! Resultat inom analysintervallet är från 20 cp/ml till 1,00E+07 cp/ml (1,30 $\log_{10}$ cp/ml till 7,00 $\log_{10}$ cp/ml).

¹ Antal tester inom analysintervallet.

Resultaten i bild 25 visar den plottade kurvan för standardavvikelsen för den totala precisionen med de motsvarande approximativa 95-procentiga konfidensintervallen relaterat till de genomsnittliga $\log_{10}$ HIV-1 RNA-koncentrationerna. De här resultaten indikerar jämförbara precisionsegenskaper mellan systemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) och systemet COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 (CAP/CTM48).



Obs! Det approximativa 95-procentiga konfidensintervallet för standardavvikelsen för den totala precisionen beräknades genom att ta kvadratroten ur 95 %-KI-gränsvärdena för variansen för den totala precisionen.

Klinisk känslighet, specificitet och metodjämförelse

Metodologi

Det främsta målet med den här studien var att utvärdera den kliniska specificiteten och känsligheten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 med prover från HIV-negativa och HIV-1-positiva personer. Både färska (aldrig frusna) och frusna EDTA-plasmaprover testades i båda utvärderingarna. De sekundära målen var att jämföra resultaten och utvärdera överensstämmelsen för den positiva procentandelen och den negativa procentandelen för resultaten från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 med de resultat som erhöllits med de FDA-godkända testerna COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test och COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5.

Den kliniska specificiteten utvärderades med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 genom att testa 148 färska (aldrig frusna) prover och 418 frusna prover som samlats in från blodgivare som var negativa för antikroppar mot HIV-1/2. Den kliniska känsligheten hos testet utvärderades med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 genom att testa 117 färska prover och 301 frusna prover i EDTA-plasma som samlats in från HIV-1-infekterade personer (frusna prover fördelades slumpmässigt på laboratorierna genom CD4-cellräkning). Testresultaten från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfördes med de resultat som erhöllits med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test och COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5. Testningen genomfördes på 3 laboratorier, med 1 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®-system per laboratorium. Tre reagensloter från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 användes.

Statistiska metoder

Färska och frusna prover från HIV-negativa och HIV-1-positiva personer testades med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test och COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5. HIV-negativa personer var lämpliga för statistiska analyser av specificiteten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 om de genererade giltiga resultat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. HIV-1-positiva personer var lämpliga för statistiska analyser av känsligheten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 om de genererade giltiga resultat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och hade giltiga resultat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test inom analysens linjära intervall.

Den kliniska specificiteten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 beräknades som procentandelen utvärderingsbara HIV-negativa personer som hade "Target Not Detected"-resultat med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Det associerade 95-procentiga exakta konfidsensintervallet (KI) tillhandahölls också. Den kliniska känsligheten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 beräknades som procentandelen utvärderingsbara HIV-1-positiva personer som hade detekterbara HIV-1-virusmängder med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Det associerade 95-procentiga exakta konfidsensintervallet (KI) tillhandahölls också. I metodjämförelsen utvärderades resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 separat med de båda jämförande plattformarna (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test och COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5). Överensstämmelsen för den positiva och den negativa procentandelen beräknades mellan COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och varje jämförande plattform. Parade prover från HIV-1-positiva personer med resultat inom det linjära intervallet för både COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test jämfördes med hjälp av sambandsdiagram och analyserades med Deming-regression.

Resultat

Totalt 566 utvärderingsbara HIV-negativa och 418 HIV-1-positiva patientprover inkluderades i analysen av klinisk specificitet och känslighet. Ca 75 % av patientproverna var frusna och 25 % var färska. Den specifika fördelningen för varje plattform sammanfattas i Tabell 14.

Tabell 14
Utvärderingsbara HIV-1-negativa och -positiva personer ordnade efter provtyp

Provtyp	HIV-negativa prover	HIV-1-positiva prover
Färska	148 (26,1 %)	117 (28,0 %)
Frusna	418 (73,9 %)	301 (72,0 %)
Totalt	566	418

De demografiska egenskaperna för de 418 utvärderingsbara HIV-1-positiva proverna sammanfattas i Tabell 15. CD4-celleräkningarna för patienterna var jämnt fördelade över de olika kategorierna för CD4-celleräkningarna (< 200, 200–500, > 500 celler/µl). De flesta patienterna var män (74,2 %) och mellan 30 till 49 år gamla (72,5 %). Den etniska fördelningen är jämförbar med fördelningen hos HIV-1-infekterade personer i USA³².

Tabell 15
Demografiska egenskaper för utvärderingsbara HIV-1-positiva personer

Demografisk egenskap	Kategori	HIV-1-positiva personer
Generellt	Totalt	418
CD4-celleräkning (celler/µl)	< 200	130 (31,1 %)
	200–500	152 (36,4 %)
	> 500	136 (32,5 %)
Provtyp	Färska	117 (28,0 %)
	Frusna	301 (72,0 %)
Kön	Man	310 (74,2 %)
	Kvinna	108 (25,8 %)
Ålder (år)	18–29	23 (5,5 %)
	30–39	100 (23,9 %)
	40–49	203 (48,6 %)
	50–59	74 (17,7 %)
	≥ 60	18 (4,3 %)
Etnicitet	Kaukasier	129 (30,9 %)
	Latinamerikan	46 (11,0 %)
	Svart	223 (53,3 %)
	Asien/Stillahavsområdet	3 (0,7 %)
	Övriga	17 (4,1 %)
Behandlas med antiretrovirala läkemedel	Yes	240 (57,4 %)
	No	178 (42,6 %)

Den kliniska specificiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 (Tabell 16) var 99,3 % (562/566; 95 % KI = 98,2 % till 99,8 %), med 4 prover klassificerade som falskt positiva. Tre av de här proverna rapporterades vid < 20 cp/ml, under analysens nedre kvantifieringsgräns (LLoQ). Det återstående enda provet av de 566 som testades låg inom det linjära intervallet men vid en mycket låg titer (28,8 cp/ml). Den kliniska specificiteten för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 var likadan för både de färska proverna (99,3 % [147/148; 95 % KI = 96,3 % till 100 %]) och de frusna proverna (99,3 % [415/418; 95 % KI = 97,9 % till 99,9 %]).

Tabell 16
Klinisk specificitet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Patientgrupp	CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0		Totalt antal	Klinisk specificitet (95 % exakt KI)
	Positive	Negative		
HIV-negativa	4 (0,7 %)	562 (99,3 %)	566	99,3 % (98,2 %, 99,8 %)

Den kliniska känsligheten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 definierades som procentandelen utvärderingsbara HIV-1-positiva personer som hade ett positivt resultat för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och sammanfattas i Tabell 17. Den kliniska känsligheten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 var 100 % (418/418; 95 % KI = 99,1 % till 100 %). Det fanns inga patienter som hade falskt negativa resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Den kliniska känsligheten testades hos en HIV-patientpopulation som återspeglar samma population i USA avseende kön, ålder, etnicitet och behandling med antiretrovirala läkemedel²⁹. Testet uppvisade 100 % klinisk känslighet oberoende av de ovan angivna kriterierna för demografi, CD4-celleräkning eller provtyp (färska jämfört med frusna).

Tabell 17
Klinisk känslighet för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Patientgrupp	CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0		Totalt antal	Klinisk känslighet (95 % exakt KI)
	Positive	Negative		
HIV-1-positiva	418 (100,0 %)	0 (0,0 %)	418	100,0 % (99,1 %, 100,0 %)

Klinisk metodjämförelse

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

Jämförelsen av resultaten från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test för de 950 patienter som var lämpliga för analys sammanfattas i Tabell 18. Överensstämmelsen för positiv procentandel för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfört med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test var 99,5 % (427/429; 95 % KI = 98,3 % till 99,9 %). Överensstämmelsen för negativ procentandel för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfört med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test var 98,1 % (511/521; 95 % KI = 96,5 % till 99,1 %). Det fanns 10 prover med positiva resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och negativa resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test. Tre prover låg vid titrar under den nedre kvantifieringsgränsen (LLoQ) för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, vilket högst troligen är en återspeglings av den ökade känsligheten hos COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Tre prover var falskt positiva resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 från HIV-negativa personer som identifierades i den kliniska specificitetsanalysen som åter var under den nedre kvantifieringsgränsen (LLoQ). Fyra prover hade titrar från 24,9 cp/ml till 158 cp/ml och återspeglar troligen den kända variabilitet som förknippas med kvantifiering av låg titer.

Tabell 18
Jämförelse mellan COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test

CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0	CAP/CTM HIV-1 Test		Totalt
	Positive	Negative	
Positive	427	10	437
Negative	2	511	513
Totalt	429	521	950
Överensstämmelse för positiv procentandel (95 % exakt KI)	99,5 % (98,3 %, 99,9 %)		
Överensstämmelse för negativ procentandel (95 % exakt KI)		98,1 % (96,5 %, 99,1 %)	

KI = konfidensintervall; CAP/CTM HIV-1 Test = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test; CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Obs! HIV-negativa och HIV-1-positiva personer som bidrog med giltiga resultat för både CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 och CAP/CTM HIV-1 Test inkluderades i den här sammanfattande tabellen.

Totalt 417 parade HIV-1-positiva prover hade resultat som låg inom det linjära intervallet för båda analyserna och var utvärderingsbara för metodjämförelseanalysen. I tabell 19 visas den genomsnittliga differensen för parade och 95 % KI för bias mellan COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 ger högre titrar än COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, utom vid både det högre intervallet ($> 5 \log_{10}$ cp/ml) och det lägre intervallet ($< 2 \log_{10}$ cp/ml) där det ger titrar som är lägre (se tabell 19). Den generella systematiska biasen uppskattas till 0,2591 $\log_{10}$ cp/ml.

Tabell 19
Genomsnittlig differens för parade och 95 % KI för bias mellan
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test

Antal parade HIV-1-positiva prover inom det linjära intervallet för båda analyserna = 417		
Genomsnittlig differens ($\log_{10}$ cp/ml)	Standardfel	95 % KI
0,2591	0,0122	(0,235/0,283)

KI = konfidensintervall; CAP/CTM HIV-1 Test = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test; CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Obs! HIV-1-positiva personer som bidrog med giltiga resultat för både CAP/CTM HIV-1 Test och CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 inom det linjära intervallet för varje analys inkluderades i den här sammanfattande tabellen.

Resultaten från Demings regressionsanalys mellan COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test för parade HIV-1-positiva prover inom det linjära intervallet för båda analyserna anges i Tabell 20 och visas grafiskt i bild 26 (i den här bilden indikerar den streckade linjen perfekt överensstämmelse mellan de två testmetoderna, dvs. $y = x$).

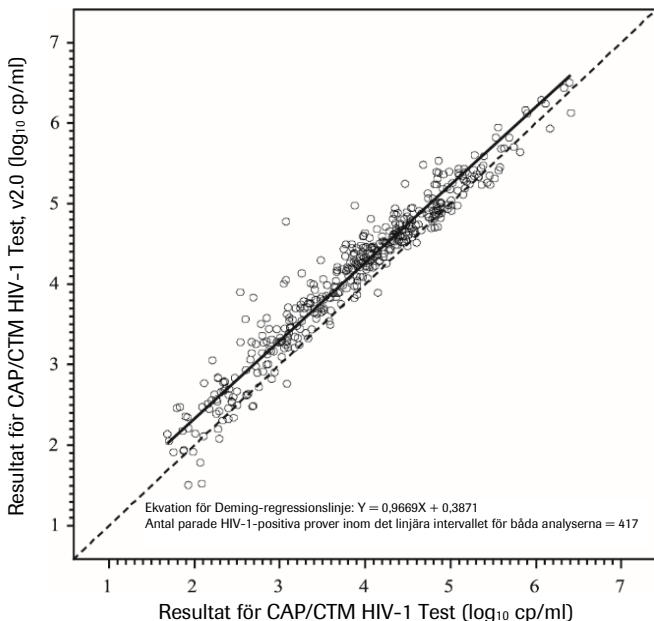
Tabell 20
Parameteruppskattningar från Demings regressionsanalys mellan
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test

Antal parade HIV-1-positiva prover inom det linjära intervallet för båda analyserna = 417				
Parameter	Parameteruppskattning log ₁₀ cp/ml	Standardfel	95 % KI	r ²
Intercept	0,3871	0,0488	(0,291/0,483)	0,9375
Lutning	0,9669	0,0122	(0,943/0,991)	

KI = konfidensintervall; CAP/CTM HIV-1 Test = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test; CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Obst HIV-1-positiva personer som bidrog med giltiga resultat för både CAP/CTM HIV-1 Test och CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 inom det linjära intervallet för varje analys inkluderades i den här sammanfattande tabellen.

Bild 26
Demings regressionsanalys mellan COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
och COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test



Tabell 21 visar jämförelsen mellan resultat från COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 och CA HIV-1 MONITOR Test, v1.5 för 991 personer som var lämpliga för analysen. Överensstämmelsen för positiv procentandel för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfört med COBAS® AMPLICOR (CA) HIV-1 MONITOR Test, v1.5 var 100 % (419/419; 95 % KI = 99,1 % till 100 %). Överensstämmelsen för negativ procentandel för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 jämfört med COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5 var 97,4 % (557/572; 95 % KI = 95,7 % till 98,5 %). Av de 15 personer med positiva resultat för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 och negativa resultat för COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5 var 4 falskt positiva resultat för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 från HIV-negativa personer som identifierats i den kliniska specificitetsanalysen som åter var under den nedre kvantifieringsgränsen (LLOQ). Elva var från HIV-1-positiva personer med resultat för COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 som varierade från under den nedre kvantifieringsgränsen (LLOQ) till 223 cp/ml och negativa resultat för COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5.

Tabell 21
Jämförelse mellan CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 och
COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5

CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0	CA HIV-1 MONITOR Test, v1.5		Totalt
	Positive	Negative	
Positive	419	15	434
Negative	0	557	557
Totalt	419	572	991
Överensstämmelse för positiv procentandel (95 % exakt KI)	100,0 % (99,1 %, 100,0 %)		
Överensstämmelse för negativ procentandel (95 % exakt KI)	97,4 % (95,7 %, 98,5 %)		

KI = konfidensintervall; CAP/CTM HIV-1 Test = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test; CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Obs! HIV-negativa och HIV-1-positiva personer som bidrog med giltiga resultat för både CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0 och CA HIV-1 MONITOR Test, v1.5 inkluderades i den här sammanfattande tabellen.

Slutsats

EDTA-plasma

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 uppvisar höga överensstämmelsenivåer med COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test i kvantitativa analyser ($r^2 = 0,9375$) och i överensstämmelseanalyser (överensstämmelse för positiv procentandel = 99,5 %; överensstämmelse för negativ procentandel = 98,1 %). Testet kvantifierar kliniska prover 0,2591 log₁₀ cp/ml högre generellt än COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, med lägre kvantifiering i det högre intervallet (> 5 log₁₀ cp/ml) och det lägre intervallet (< 2 log₁₀ cp/ml).

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 visar också höga överensstämmelsenivåer med COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5 i överensstämmelseanalyser (överensstämmelse för positiv procentandel = 100,0 %; överensstämmelse för negativ procentandel = 97,4 %).

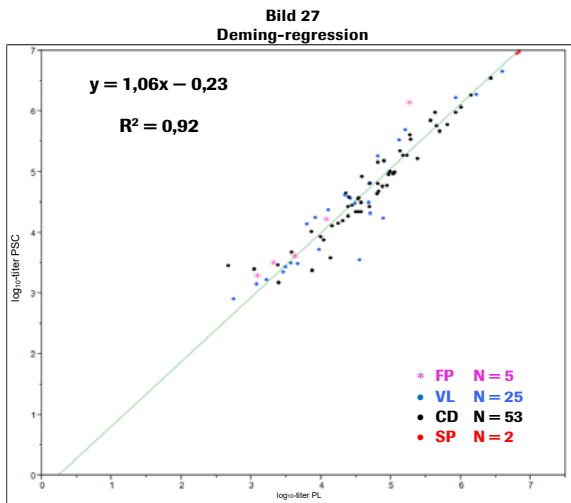
De här testresultaten stödjer användbarheten av testet för avsedd användning för bedömning av sjukdomsprogression och övervakning av antiretroviral behandling av HIV-1-infekterade patienter.

Viktiga prestandaegenskaper för torkade PSC-plasmaprover

Prestanda för torkade PSC-plasmaprover jämfört med EDTA-plasmaprover

Prestandan för torkade **PSC**-plasmaprover jämfördes med centrifugerade EDTA-plasmaprover genom att testa 325 prover från patienter smittade med HIV-1 och 2 HIV-negativa helblodsprover spikade med celloldingssupernatanter. 85 prover som hade en mätbar titer med både plasma och **PSC** analyserades. Proverna bestod av HIV-1 M-prover (FP = prospektiv provtagning med venpunktion och från kapillärblod, VL = rutintestning av virusmängd, CD = räkning av överblivna CD4+-prover, SP = spikade prover) och testades med ett replikat vardera (**PSC** och plasma) på en extern plats. Titrar under kvantifieringsintervallet exkluderades från analysen. Demings regressionsanalys utfördes med hänsyn tagen till log-omvandlade titrar.

Resultaten för Demings regressionsanalys visas i Bild 27. Symbolerna * och • i Bild 27 visar separata bestämmingar.



Tabell 22
Sammanfattning av resultat för matrisekvivalens

Matris- ekvivalens (plasmatype)	Antal prover med giltig titer	Bland-Altman-analys		Demings regressionsanalys		
		Medelvärde för Log ₁₀ - differens	95 % KI [övre/nedre]	Lutning	Intercept	R-squared
PSC jämfört med flytande plasma	85	0,05	[-0,01; 0,11]	1,06	-0,23	0,92

REFERENSER

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.
3. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
4. Curran, J.W., Jaffe, H.W., Hardy, A.M., Morgan, W.M., Selik, R.M., Dondero, T.J. 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610-616.
5. Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995-999.
6. Tindall, B., and Cooper, D.A. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1-14.
7. Daar, E.S., Moudgil, T., Meyer, R.D., Ho, D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:961-964.
8. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* **324**:954-960.
9. Albert J., Abrahamsson B., Nagy K., Aurelius E., Gaines H., Nystrom G., Fenyo E.M. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107-112.
10. Horsburgh, C.R. Jr., Ou, C.Y., Jason, J., Holmberg, S.D., Longini, I.M. Jr., Schable, C., Mayer, K.H., Lifson, A.R., Schochetman, G., Ward, J.W., et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637-640.
11. Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-308. Erratum in: *Science* 1989 245, preceding 694.
12. Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Psallidopoulos, M.C., Baseler, M., Salzman, N.P., Fauci, A.S., Lane, H.C. 1990. Increasing viral burden in CD4⁺ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* **113**:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* **328**:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* **114**:678-693.
16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-489.
17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.

18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-122.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* **334**:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* **174**:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type 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. *Journal of Infectious Diseases* **174**:704-712.
22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2:a uppl. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* **170**:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknaran, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* **43**:177-187.
27. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection – Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. 2016.
28. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354.
29. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
30. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
31. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (8):2937-2945.

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

Information om revidering av dokumentet	
Doc Rev. 17.0 02/2019	Numret för anmält organ under CE-märkningen har uppdaterats. Kontakta Roche kundsupport vid eventuella frågor.
Doc Rev. 18.0 09/2019	Avsnittet FÖRVARING OCH HANTERING har uppdaterats med information om att användaren ska kontrollera produkten visuellt innan användning för att försäkra sig om att det inte finns tecken på läckage, samt att inte använda produkten om det finns tecken på läckage. Sidan med harmoniserade symboler har uppdaterats. Kontakta Roche kundsupport vid eventuella frågor.



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguará, 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

Varumärken och patent

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

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

09/2019
Doc Rev. 18.0

(05328268001-18ENGL)
05447917001-17



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Följande symboler används för närvarande vid märkning av Roche PCR diagnostiska produkter.



Stödprogramvara



Auktoriserad representant
i Europeiska gemenskapen



Streckkodsdatablad



Lotnummer



Biologisk risk



Katalognummer



Se bruksanvisningen



Utrustningen innehåller



Distribueras av



Endast för IVD-egenskapsutvärdering

Rx Only

Endast USA: Särskilda nationella
regler kan gälla för försäljning av
den här enheten.



Denna produkt uppfyller kraven enligt det Europeiska direktivet 98/79/EG
om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik.



Medicinteknisk produkt
för *in vitro*-diagnostik



Lägre gräns för tilldelat intervall



Tillverkare



Förvaras mörkt



Innehåller tillräckligt med reagens
för $<n>$ analyser



Temperaturgräns



Testdefinitionsfil



Övre gräns för tilldelat intervall



Utgångsdatum



GTIN-nummer



Tillverkningsdatum

Teknisk support för kunder i USA 1-800-526-1247