

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

cobas®

Rx Only

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

| | | | |
|---|---------------|------------|-------------------|
| COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 | HI2CAP | 48 Tests | P/N: 05212294 190 |
| COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent | PG WR | 5.1 Liters | P/N: 03587797 190 |

USAGE PRÉVU

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, version 2.0 (v2.0) est un test basé sur l'amplification *in vitro* de l'acide nucléique. Il permet la mesure quantitative de l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) dans du plasma EDTA humain ou à partir d'un spot de plasma séché prélevée sur une **cobas®** Plasma Separation Card (**PSC**) au moyen de l'appareil COBAS® AmpliPrep pour le traitement automatisé des échantillons et de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 pour l'amplification et la détection automatisées. Le test peut quantifier de 20 à 10 000 000 copies/mL d'ARN du HIV-1 (33 à $1,67 \times 10^7$ Unités Internationales [UI]/mL dans du plasma EDTA et 738 à 10 000 000 copies/mL d'ARN du HIV-1 (1 230 à $1,67 \times 10^7$ Unités Internationales [UI]/mL dans un spot de plasma séché sur une **PSC**). Une copie d'ARN du HIV-1 est équivalente à 1,67 UI sur la base des premières normes internationales d'ARN du HIV-1 établies par l'OMS pour les techniques basées sur l'acide nucléique (NAT) (Code NIBSC 97/656)³⁶.

Ce test est destiné à être utilisé en complément du tableau clinique et d'autres marqueurs biologiques indiquant l'évolution de la maladie, en vue du traitement clinique des patients infectés par le HIV-1 de groupe M et le HIV-1 de groupe O. Il permet d'évaluer le pronostic du patient en déterminant le niveau de base d'ARN du HIV-1 ou d'examiner les effets du traitement antirétroviral en fonction du changement des niveaux d'ARN du HIV-1 tout au long du traitement.

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ne doit servir ni de test de dépistage du HIV-1 dans le sang ou les produits sanguins, ni de test de diagnostic pour confirmer la présence d'une infection par le HIV-1.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est l'agent étiologique responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)¹⁻³. Le HIV peut se transmettre par contact sexuel, par exposition à du sang ou à des produits sanguins infectés. Une mère contaminée peut également transmettre ce virus à son fœtus⁴. En général, dans les trois à six semaines qui suivent l'exposition au HIV, les personnes infectées développent un syndrome bref et aigu caractérisé par des symptômes pseudo-grippaux associés à une charge virale importante dans le sang circulant⁵⁻⁸. Chez la plupart des sujets infectés, une réponse immunitaire spécifique au HIV et une baisse de la virémie plasmatique surviennent habituellement dans les quatre à six semaines après l'apparition des symptômes^{9,10}. Après la séroconversion, les sujets infectés entrent généralement dans une phase asymptomatique de stabilité clinique qui peut durer des années¹¹⁻¹³. Cette période asymptomatique est caractérisée par la présence persistante d'une faible virémie dans le plasma¹⁴ et par une déplétion graduelle des lymphocytes CD4⁺ T entraînant une immunodéficience sévère, des infections opportunistes multiples, des affections malignes et finalement la mort¹⁵. Bien que le virus soit présent dans le sang circulant en quantité relativement faible au cours de la phase asymptomatique de l'infection, il s'avère que la réplication du virus et sa clairance constituent un processus dynamique au cours duquel les forts taux de production virale et

d'infection des lymphocytes CD4⁺ sont compensés par des taux tout aussi élevés de clairance virale, de mort des cellules infectées et de renouvellement des lymphocytes CD4⁺, ce qui aboutit à des taux relativement stables de la virémie plasmatique et des lymphocytes CD4⁺¹⁶⁻¹⁸.

Des déterminations quantitatives de la virémie HIV dans le sang circulant ont montré que des taux viraux élevés présentent une corrélation avec un risque accru de progression clinique de la pathologie due au HIV, tandis qu'une réduction des taux plasmatiques du virus est associée à une diminution du risque de progression clinique¹⁹⁻²¹. La charge virale dans le sang circulant peut être déterminée quantitativement par la mesure de l'antigène p24 du HIV dans le sérum, par la culture du HIV plasmatique ou encore par la mesure directe de l'ARN viral dans le plasma grâce à l'amplification de l'acide nucléique ou à des technologies d'amplification des signaux²²⁻²⁶.

L'Organisation mondiale de la Santé recommande aussi désormais l'utilisation d'échantillons de spots de sang séché afin d'étendre l'accessibilité des tests de charge virale dans les milieux à ressources limitées ayant un accès limité aux structures de soin ou ne disposant pas de capacités fiables de transport des échantillons de plasma EDTA²⁷. Un spot de plasma séché sur **PSC**, qui stabilise également l'ARN du HIV dans le plasma séché, peut améliorer la couverture des tests de la charge virale dans ces configurations en permettant le transport d'échantillons sur de plus longues distances et dans des conditions environnementales plus rudes qu'en cas d'utilisation de plasma EDTA.

L'antigène p24 est la principale protéine de noyau du HIV et se trouve dans le sérum, soit à l'état libre, soit lié à l'anticorps anti-p24. Il est possible de mesurer l'antigène p24 libre grâce à des tests immuno-enzymatiques (EIA) commercialisés ; cependant, l'utilité de l'antigène p24 en tant que marqueur de la charge virale est limitée puisque cet antigène n'est décelable que chez 20 % des patients asymptomatiques et chez 40 à 50 % des patients symptomatiques. Certaines techniques de dissociation du complexe antigène-anticorps améliorent la sensibilité des tests de mesure de p24. Toutefois, ce dernier reste indétectable chez la plupart des porteurs asymptomatiques²².

On peut cultiver le HIV infectieux du plasma par inoculation à des cellules mononucléaires activées du sang circulant (PMBC, peripheral blood mononuclear cells) provenant de donneurs sains. La détermination quantitative se fait par inoculation de PMBC avec des dilutions en série d'échantillon plasmatique. Cette méthode ne présente pas un grand intérêt pour surveiller la charge virale chez les sujets infectés puisque seule une faible fraction des particules virales est infectieuse *in vitro*. Le virus infectieux est souvent indétectable chez les porteurs asymptomatiques²².

La quantité d'ARN du HIV présente dans le plasma peut être déterminée grâce à des techniques d'amplification de l'acide nucléique telles que la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)²⁸⁻³⁰. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 recourt à la PCR, qui assure une sensibilité maximale et un domaine de linéarité de détermination quantitative de l'ARN du HIV-1 dans du plasma anticoagulé par EDTA et dans un spot de plasma séché sur une **PSC**.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 est un test d'amplification de l'acide nucléique qui permet la mesure quantitative de l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) dans le plasma EDTA humain ou à partir d'un spot de plasma séché prélevé sur une **PSC**. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 comporte trois opérations principales : (1) la préparation des échantillons dans le but d'isoler l'ARN du HIV-1 ; (2) la transcription inverse de l'ARN cible pour produire l'ADN complémentaire (ADNc) ; et (3) l'amplification par PCR de l'ADNc cible en même temps que la détection de la sonde de détection d'oligonucléotides clivés, doublement marqués, spécifique de la cible.

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 permet la préparation automatisée des échantillons, suivie de la transcription inverse, de l'amplification par PCR et de la détection automatisée de l'ARN cible du HIV-1 et de l'Armored RNA du Standard de Quantification (QS) du HIV-1. Le mélange réactionnel contient des amorces et des sondes spécifiques à la fois de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1. Le mélange réactionnel a été conçu de façon à permettre une détermination quantitative

équivalente des sous-types du HIV-1 du groupe M et du HIV-1 du groupe O. La détection de l'ADN amplifié est réalisée par l'utilisation de sondes oligonucléotidiques doublement marquées spécifiques de la cible et du QS, permettant l'identification indépendante des amplicons du HIV-1 et du QS du HIV-1.

La quantité d'ARN viral du HIV-1 est mesurée à l'aide du QS du HIV-1. Elle compense les effets d'inhibition et contrôle la préparation et le processus d'amplification en permettant une quantification plus exacte de l'ARN du HIV-1 dans chaque échantillon. Le QS du HIV-1 est une construction d'Armored RNA non infectieux qui contient des séquences du HIV avec des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de l'ARN cible du HIV-1 et un site unique de liaison à la sonde qui permet de distinguer l'amplicon du QS du HIV-1 de l'amplicon cible du HIV-1.

Le QS du HIV-1 est ajouté à chaque échantillon en un nombre connu de copies et subit toutes les étapes de préparation d'échantillon, transcription inverse, amplification par PCR et détection simultanée des sondes de détection d'oligonucléotides clivés doublement marqués. L'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 calcule les concentrations en ARN du HIV-1 dans les échantillons à doser en comparant le signal émis par le HIV-1 au signal émis par le QS du HIV-1 pour chaque échantillon et chaque contrôle.

Choix de la cible

La sélection de la séquence d'ARN cible du HIV-1 dépend de l'identification des régions situées dans le génome du HIV-1 qui présentent une conservation maximale de la séquence parmi les divers sous-types de HIV-1 du groupe M et les échantillons de HIV-1 groupe O. Afin de prendre en compte l'importante variabilité génétique du virus, deux régions du génome du HIV sont ciblées simultanément pour l'amplification et la détection par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Deux sondes spécifiques aux cibles et une sonde oligonucléotidique doublement marquée spécifique au QS permettent l'identification indépendante de l'amplicon du HIV-1 et de l'amplicon du QS du HIV-1. Ainsi, le choix approprié des amorces et des sondes oligonucléotidiques doublement marquées est essentiel pour que le test puisse amplifier et détecter les sous-types du HIV-1 du groupe M et du HIV-1 du groupe O. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 utilise des amorces de transcription inverse et d'amplification par PCR qui définissent des séquences dans les régions hautement conservées du gène *gag*³³ du HIV-1 et de la région LTR du HIV-1.

Préparation des échantillons

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 recourt à la préparation automatisée des échantillons sur l'appareil COBAS® AmpliPrep à l'aide d'une technique générique de capture basée sur silice. La procédure traite 850 µL de plasma ou d'extrait de SPEX prélevé sur la **PSC**. Les particules du HIV-1 sont lysées par incubation à des températures élevées à l'aide d'une protéase et d'un tampon de liaison/lyse chaotrope qui libère des acides nucléiques et protège l'ARN du HIV-1 libéré des RNases du plasma. La protéase et une quantité connue de molécules d'Armored RNA du QS du HIV-1 sont introduites dans chaque échantillon avec le réactif de lyse et des particules magnétiques en verre. Ensuite, le mélange est incubé et l'ARN du HIV-1 et l'ARN du QS du HIV-1 se lient à la surface des particules magnétiques de verre. Les substances non liées, telles que sels, protéines et autres impuretés cellulaires, sont retirées par lavage des particules magnétiques de verre. Une fois que les particules magnétiques de verre sont séparées et que les étapes de lavage sont terminées, les acides nucléiques adsorbés sont élués à température élevée avec une solution aqueuse. L'échantillon traité, contenant des particules magnétiques en verre ainsi que l'ARN libéré du HIV-1 et l'ARN du QS du HIV-1, est ajouté au mélange d'amplification et transféré sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48. L'ARN cible du HIV-1 et l'ARN du QS du HIV-1 sont ensuite transcrits inversement, amplifiés et simultanément détectés par clivage de deux sondes spécifiques aux cibles et d'une sonde oligonucléotidique doublement marquée spécifique au QS.

Transcription inverse et amplification par PCR

Les réactions de transcription inverse et d'amplification par PCR sont effectuées avec l'ADN polymérase de l'enzyme recombinante thermostable Z05 *Thermus specie* (Z05). En présence de manganèse (Mn^{2+}) et dans des conditions tampon appropriées, le Z05 a à la fois une activité de transcriptase inverse et d'ADN polymérase^{31,32}. Cela permet à la transcription inverse et à l'amplification par PCR de se produire en même temps que la détection en temps réel de l'amplicon.

Les échantillons traités sont ajoutés au mélange dans des tubes d'amplification (tubes K) dans lesquels s'effectuent la transcription inverse et l'amplification par PCR. Le mélange réactionnel est chauffé pour permettre aux amorces antisens de s'hybrider spécifiquement à l'ARN cible du HIV-1 et à l'ARN du QS du HIV-1. En présence de Mn^{2+} et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) comprenant les triphosphates de désoxyadénosine, désoxyguanosine, désoxycytidine, désoxyuridine et désoxythymidine, la polymérase Z05 allonge les amorces hybridées, produisant ainsi des brins d'ADN complémentaires de l'ARN cible.

Amplification de la cible

Les échantillons traités sont ajoutés au mélange d'amplification dans les tubes pour amplification (tubes K) dans lesquels s'effectue l'amplification par PCR. Après la transcription inverse de l'ARN cible du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1, le thermocycleur de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 chauffe le mélange réactionnel afin de dénaturer les hybrides ARN:ADNc et d'exploser les séquences cibles de l'amorce spécifique. Pendant que le mélange refroidit, les amorces s'hybrident à l'ADN cible. En présence de Mn^{2+} et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) comprenant les triphosphates de désoxyadénosine, désoxyguanosine, désoxycytidine, désoxyuridine et désoxythymidine, Z05 allonge les amorces hybridées le long des matrices cibles ce qui génère des molécules d'ADN bicaténares appelés amplicons. L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 répète automatiquement cette opération pendant un nombre de cycles défini, chaque cycle doublant effectivement la quantité d'ADN de l'amplicon. Le nombre de cycles nécessaires est préprogrammé dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48. L'amplification n'a lieu que dans les deux régions du génome du HIV-1 situées entre les amorces. Le génome du HIV-1 n'est pas entièrement amplifié.

Amplification sélective

Dans le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, l'amplification sélective de l'acide nucléique cible de l'échantillon est assurée grâce à l'utilisation de l'enzyme AmpErase (uracile-N-glycosylase) et de désoxyuridine triphosphate (dUTP). L'enzyme AmpErase reconnaît et catalyse la destruction des brins d'ADN contenant de la désoxyuridine³⁴, mais pas celle de l'ADN contenant de la désoxythymidine.

L'ADN naturel ne contient pas de désoxyuridine, mais les amplicons en contiennent toujours du fait de l'utilisation de désoxyuridine triphosphate en tant que l'un des dNTP du mélange réactionnel ; ainsi, seuls les amplicons renferment de la désoxyuridine. La présence de désoxyuridine permet la destruction des amplicons contaminants par l'enzyme AmpErase avant l'amplification de l'ADN cible. De même, tout produit non spécifique formé après l'activation initiale du mélange réactionnel par manganèse est détruit par l'enzyme AmpErase. L'enzyme AmpErase, qui fait partie du mélange réactionnel, catalyse le clivage de tout ADN contenant de la désoxyuridine au niveau d'un résidu de désoxyuridine en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1. Lorsqu'elle est chauffée au cours de la première étape du thermocyclage, la chaîne d'ADN de l'amplicon se casse au niveau de la désoxyuridine, ce qui rend l'ADN non amplifiable. L'enzyme AmpErase reste inactive pendant une période prolongée une fois qu'elle est exposée à des températures supérieures à 55 °C, c'est-à-dire pendant les étapes de thermocyclage, et ne détruit donc pas l'amplicon cible formé pendant l'amplification.

Détection de produits PCR au cours d'un test COBAS® TaqMan®

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 utilise la technologie d'amplification par PCR en temps réel^{35,36}. L'utilisation de sondes fluorescentes doublement marquées permet une détection en temps réel de l'accumulation des produits de la PCR par contrôle de l'intensité d'émission de fluorophores rapporteurs libérés pendant la procédure d'amplification. Les sondes sont des sondes oligonucléotidiques spécifiques au HIV-1 et au QS du HIV-1 avec un fluorophore rapporteur et un fluorophore quencher. Au cours du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, les sondes du HIV-1 et du QS du HIV-1 sont marquées au moyen de différents colorants contrôles fluorescents. Lorsque ces sondes sont intactes, la fluorescence du fluorophore rapporteur est supprimée du fait de la proximité du fluorophore quencher par suite des effets de transfert d'énergie de type Förster. Pendant la PCR, la sonde s'hybride à la séquence cible et est clivée par l'activité nucléase 5' → 3' de l'ADN polymérase thermostable Z05. Quand le fluorophore rapporteur et le fluorophore quencher sont libérés et séparés, la neutralisation s'arrête et l'activité fluorescente du fluorophore rapporteur est augmentée. Les amplifications de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1 sont mesurées indépendamment à des longueurs d'ondes différentes. Ce processus est répété pour un nombre déterminé de cycles, chaque cycle augmentant efficacement l'intensité d'émission des colorants contrôles individuels, permettant une identification indépendante de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1. Là où une courbe de croissance débute une croissance exponentielle, le cycle PCR est lié à la quantité de produit de départ au début de la PCR.

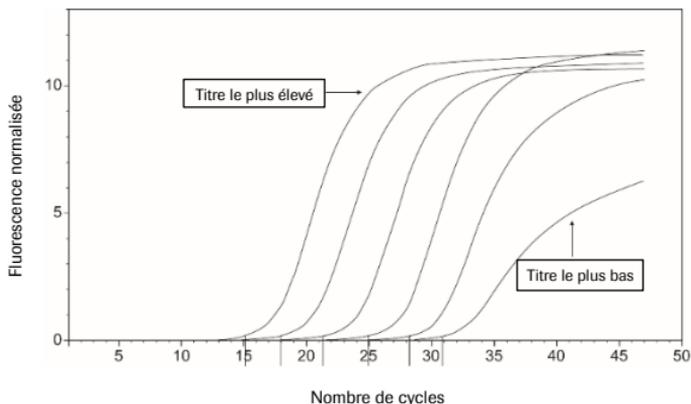
Règles de base de la quantification avec le test COBAS® TaqMan®

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 est essentiellement quantitatif sur un domaine de linéarité très large puisque le contrôle de l'amplicon est effectué pendant la phase exponentielle de l'amplification. Plus le titre du HIV-1 d'un échantillon est élevé, plus la fluorescence du colorant contrôle de la sonde du HIV-1 dépasse vite le niveau de fluorescence de base (voir la figure 1). Puisque la quantité d'ARN du QS du HIV-1 est constante dans tous les échantillons, la fluorescence du colorant contrôle de la sonde du QS du HIV-1 doit apparaître durant le même cycle pour tous les échantillons (voir la figure 2). La concentration est ajustée en conséquence dans les échantillons où la fluorescence du QS est affectée. L'apparition des signaux spécifiques de fluorescence est considérée comme une valeur seuil critique (Ct). La valeur seuil critique ou Ct est définie comme le nombre de cycles fractionnels où la fluorescence du fluorophore rapporteur dépasse un seuil prédéterminé (le niveau de fluorescence théorique) et commence la phase de croissance exponentielle de ce signal (voir la figure 3). Une valeur Ct plus grande indique un titre plus faible du produit cible HIV-1 d'origine. Un titre 2 fois plus grand correspond à une baisse de 1 Ct pour l'ARN du HIV-1 cible, tandis qu'un titre 10 fois plus grand correspond à une baisse de 3,3 Ct.

La figure 1 montre les courbes de croissance cible pour une série de dilutions effectuées sur un domaine de 5log₁₀. Au fur et à mesure que la concentration du virus augmente, les courbes de croissance se déplacent sur des cycles précédents. Par conséquent, la courbe de croissance la plus à gauche correspond au titre viral le plus élevé alors que la courbe de croissance la plus à droite représente le titre viral le plus faible.

Figure 1

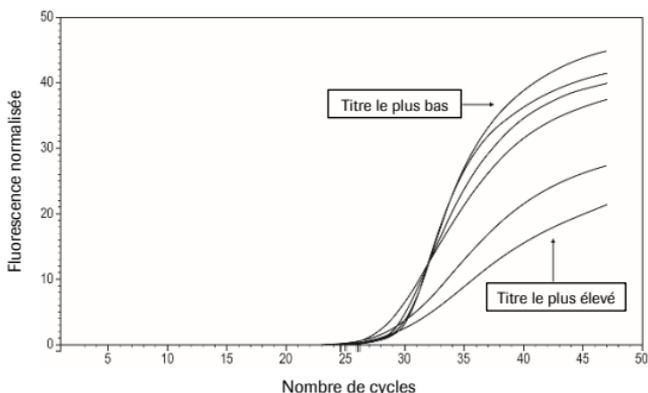
Courbes de croissance cible pour une série de dilutions effectuées sur un domaine de 5-log_{10}



La figure 2 montre les courbes de croissance du Standard de Quantification pour les échantillons d'une série de dilutions virales s'étendant sur un domaine de 5-log_{10} . Le volume de standard de quantification ajouté à chaque échantillon est constant pour chaque réaction. La valeur Ct du Standard de Quantification est la même quelle que soit la concentration virale.

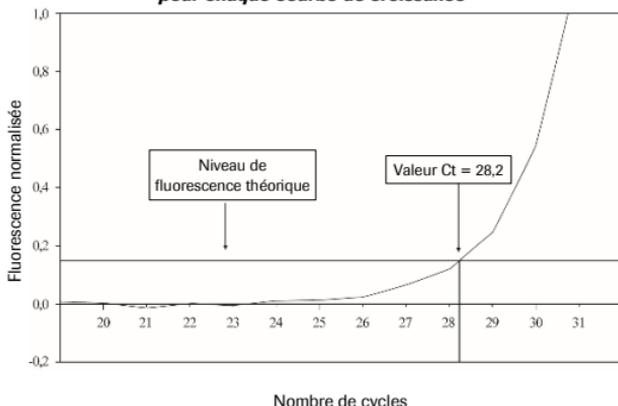
Figure 2

Courbes de croissance du Standard de Quantification pour une série de dilutions de virus effectuées sur un domaine de 5-log_{10}



La figure 3 présente un exemple de normalisation des valeurs de fluorescence à chaque cycle pour chaque courbe de croissance. Le nombre fractionnel de cycles (valeur Ct) est calculé au point de rencontre du signal de fluorescence et du niveau de fluorescence théorique.

Figure 3
Les valeurs de fluorescence de chaque cycle sont normalisées
pour chaque courbe de croissance



Quantification de l'ARN du HIV-1

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 détermine la charge virale de l'ARN du HIV-1 en utilisant une seconde séquence cible (Standard de Quantification du HIV-1), dont une concentration connue est ajoutée à chaque échantillon à analyser. Le QS du HIV-1 est une construction non infectieuse d'Armored RNA contenant des fragments de séquences du HIV-1 qui présentent des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de la séquence cible *gag* du HIV-1. Le QS du HIV-1 contient des sites de liaisons aux amorces du HIV-1 et génère un produit amplifié dont la longueur et la composition sont identiques à celles de l'ARN cible *gag* du HIV-1. La région de liaison de la sonde de détection du QS du HIV-1 a été modifiée pour permettre de distinguer l'amplicon du QS du HIV-1 de l'amplicon cible *gag* du HIV-1.

Pendant la phase d'hybridation de la PCR dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48, les échantillons sont illuminés et excités par une lumière filtrée et les données de fluorescence d'émission filtrée sont recueillies pour chaque échantillon. Les mesures pour chaque échantillon sont alors corrigées pour les fluctuations instrumentales. Ces mesures de fluorescence sont envoyées par l'appareil au logiciel AMPLILINK et stockées dans une base de données. Des vérifications préalables sont effectuées pour déterminer si les données de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1 représentent des ensembles valides et des messages d'alerte sont générés lorsque les données se trouvent hors des limites préétablies. Une fois que les vérifications préalables ont été effectuées avec succès, les mesures de fluorescence sont traitées dans le but de générer des valeurs Ct de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1. Les constantes de calibration spécifiques aux lots fournies avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 servent à calculer la valeur de titre des échantillons et des contrôles en se basant sur les valeurs Ct de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 répond aux normes internationales pour l'ARN du HIV-1 établies par l'OMS. Les résultats de titre sont donnés en copies/mL (cp/mL) ou en Unités Internationales/mL (UI/mL). Le facteur de conversion entre les copies/mL d'ARN du HIV-1 rapporté et les UI/mL du HIV-1 a été déterminé par Roche Molecular Systems, Inc comme étant de 0,6 cp/UI (1,67 UI/cp).

RÉACTIFS

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

(P/N : 05212294 190)

HI2CAP

48 tests

HIV-1 v2.0 CS1

1 x 48 tests

(Cassette de réactifs de particules magnétiques de verre HIV-1)

Particules magnétiques de verre

93 % d'isopropanol

HIV-1 v2.0 CS2

1 x 48 tests

(Cassette de réactif de lyse HIV-1)

Citrate de sodium dihydraté

42,5 % de thiocyanate de guanidine

< 14 % de polidocanol

0,9 % de dithiothréitol

HIV-1 v2.0 CS3

1 x 48 tests

Cassette de multi-réactifs HIV-1 contenant :

Pase

1 x 3,8 mL

(Solution de protéinase)

Tampon Tris

< 0,05 % d'EDTA

Chlorure de calcium

Acétate de calcium

≤ 7,8 % de protéinase

Glycérol

EB

1 x 7,0 mL

(Tampon d'éluion)

Tampon de base Tris

0,2 % de méthylparabène

HIV-1 v2.0 CS4

1 x 48 tests

Cassette de réactifs spécifiques au test HIV-1 contenant :

HIV-1 QS

1 x 3,6 mL

(standard de quantification du HIV-1)

Tampon Tris-HCl

EDTA

< 0,005 % d'ARN Poly rA (de synthèse)

< 0,001 % d'Armored RNA du HIV-1 contenant des

séquences de liaisons aux amorces du HIV-1 et un site

unique de liaison à la sonde (ARN non infectieux dans du

bactériophage MS2)

0,05 % d'azide de sodium

HIV-1 MMX

1 x 2,5 mL

(Mélange réactionnel HIV-1)

Tampon tricine

Acétate de potassium

Hydroxyde de potassium

20 % de diméthylsulfoxyde

Glycérol

- < 0,04 % de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP
- < 0,003 % amorces sens et anti-sens pour la région *gag* et la région LTR du HIV-1
- < 0,003 % d'aptamère d'oligonucléotide
- < 0,003 % de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorophore spécifiques du HIV-1 et du standard de quantification du HIV-1
- < 0,05 % d'ADN polymérase Z05 (microbien)
- < 0,1 % d'enzyme (microbienne) AmpErase (uracile-N-glycosylase)
- 0,09 % d'azide de sodium

CAP/CTM Mn²⁺

(Solution de manganèse CAP/CTM)

- < 0,5 % d'acétate de manganèse
- Acide acétique glacial
- 0,09 % d'azide de sodium

1 x 19,8 mL

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

(contrôle fortement positif HIV-1, v2.0)

- < 0,001 % d'Armored RNA du HIV-1 contenant des séquences du HIV-1 (ARN non infectieux dans du bactériophage MS2)

Plasma humain négatif, non réactif aux tests pour les anticorps HCV, les anticorps HIV-1 et HIV-2, l'antigène p24 du HIV et l'antigène AgHBs ; l'ARN du HIV-1, l'ARN du HCV et l'ADN du HBV ne peuvent pas être détectés par les méthodes PCR

0,1 % de conservateur ProClin[®] 300

4 x 1,0 mL

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

(contrôle faiblement positif HIV-1, v2.0)

- < 0,001 % d'Armored RNA du HIV-1 contenant des séquences du HIV-1 (ARN non infectieux dans du bactériophage MS2)

Plasma humain négatif, non réactif aux tests pour les anticorps HCV, les anticorps HIV-1 et HIV-2, l'antigène p24 du HIV et l'antigène AgHBs ; l'ARN du HIV-1, l'ARN du HCV et l'ADN du HBV ne peuvent pas être détectés par les méthodes PCR

0,1 % de conservateur ProClin[®] 300

4 x 1,0 mL

CTM (-) C

[Contrôle négatif COBAS[®] TaqMan[®] (plasma humain)]

Plasma humain négatif, non réactif aux tests pour les anticorps HCV, les anticorps HIV-1 et HIV-2, l'antigène p24 du HIV et l'antigène AgHBs ; l'ARN du HIV-1, l'ARN du HCV et l'ADN du HBV ne peuvent pas être détectés par les méthodes PCR

0,1 % de conservateur ProClin[®] 300

4 x 1,0 mL

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

(Pince à code-barres du contrôle fortement positif HIV-1, v2.0)

1 x 4 pinces

HIV-1 L(+)⁺C, v2.0 Clip

(Pince à code-barres du contrôle faiblement positif au HIV-1, v2.0)

1 x 4 pinces**HIV-1 (-) C Clip**

(Pince à code-barres du contrôle négatif HIV-1, v2.0)

1 x 4 pinces**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**

(P/N : 03587797 190)

PG WR**1 x 5,1 L****PG WR**

(COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent)
Citrate de sodium dihydraté
< 0,1 % de N-méthylisothiazolone-HCl

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen**Pre-Extraction Reagent**

(P/N : 06989861 190)

SPEX**5 x 78 mL****SPEX**

(cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent)
42,5 % de thiocyanate de guanidine
0,79 % de citrate de sodium
0,01 % d'acide citrique
3,6 % de polidocanol
1,8 % de dithiothréitol

Remarque : ce réactif est proposé en option et ne doit être utilisé qu'en association avec la PSC pour traiter les échantillons de spots de plasma séché. Voir la fiche méthodologique PSC Method Sheet ms_09411763190.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- A. **DESTINÉ AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*.**
- B. Ce test doit servir pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA ou à partir d'un spot de plasma séché sur une **PSC**.
- C. Ne pas pipeter à la bouche.
- D. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail du laboratoire. Porter des gants protecteurs jetables, des blouses de laboratoire et des protections pour les yeux lors de la manipulation des échantillons et des réactifs du kit. Bien se laver les mains après la manipulation des échantillons et des réactifs de test.
- E. **Éviter la contamination des réactifs par des micro-organismes ou par des ribonucléases lors du prélèvement d'aliquots dans les flacons de contrôles.**
- F. **Il est recommandé d'utiliser des pipettes stériles jetables et des embouts sans RNase.**
- G. Ne pas mélanger les contrôles de lots différents ou de flacons différents d'un même lot.
- H. Ne pas utiliser ensemble des cassettes de réactifs ou des contrôles provenant de kits différents.
- I. Ne pas ouvrir les cassettes COBAS® AmpliPrep, ni échanger, mélanger, retirer ou ajouter des flacons.
- J. Jeter les réactifs non utilisés, les déchets et les échantillons conformément à la réglementation locale, régionale, fédérale et nationale.
- K. Ne pas utiliser un kit après sa date de péremption.

- L. Les fiches de sécurité (SDS, Safety Data Sheets) sont disponibles sur demande auprès de votre distributeur Roche local.
- M. Tous les échantillons et les contrôles doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Ils nécessitent les précautions d'usage, telles que celles mentionnées dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ ainsi que dans le document M29-A3³⁹ du CLSI. Nettoyer et désinfecter soigneusement toutes les surfaces de travail avec une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium préparée extemporanément avec de l'eau distillée ou déminéralisée.
- Remarque :** *l'eau de Javel domestique liquide disponible dans le commerce contient généralement de l'hypochlorite de sodium à la concentration de 5,25 %. Une dilution à 1:10 d'eau de Javel domestique permet d'obtenir une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium.*
- Remarque :** *en cas de déversement d'échantillons de spots de plasma séché sur PSC dans le cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPEX)(contenant du thiocyanate de guanidine), éviter de le mettre en contact avec de l'hypochlorite de sodium contenant des désinfectants tels que l'eau de Javel. Le mélange peut produire un gaz extrêmement toxique.*
- N. **ATTENTION :** **CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C** v2.0** contiennent du plasma humain dérivé du sang humain. Le produit d'origine a été soumis à des tests et s'est avéré non réactif à la présence de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs), des anticorps anti-HCV, des anticorps anti-HIV-1 et HIV-2 et de l'antigène p24 du HIV. Les tests PCR sur le plasma humain négatif indiquaient une absence de détection d'ARN du HIV-1, d'ARN du HCV et d'ADN du HBV. Toutefois, aucune méthode de test connue ne peut garantir avec une certitude absolue que des produits dérivés du sang humain sont exempts de tout risque de transmission d'agents infectieux. C'est pourquoi tout produit d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infectieux. **CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C**, v2.0** doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Ils nécessitent les précautions d'usage, telles que celles mentionnées dans *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*³⁸ ainsi que dans le document M29-A3³⁹ du CLSI. Nettoyer et désinfecter soigneusement toutes les surfaces de travail avec une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium préparée extemporanément avec de l'eau distillée ou déminéralisée.
- O. **HIV-1 QS, CAP/CTM Mn²⁺ et HIV-1 MMX** contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec les conduits en plomb ou en cuivre pour former des azides métalliques très explosifs. Lors de l'élimination de solutions contenant de l'azide de sodium dans les éviers de laboratoire, rincer abondamment les évacuations afin d'éviter la formation de ces azides.
- P. Porter des gants de laboratoire, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation de tout réactif. Éviter tout contact de ces produits avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau. Sans traitement, des brûlures peuvent être occasionnées. Si un réactif s'est répandu, le diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
- Q. Ne pas laisser le **HIV-1 v2.0 CS2, SPEX** (utilisé dans la procédure avec spots de plasma séché sur **PSC**) et les déchets liquides provenant de l'appareil COBAS® AmpliPrep, qui contiennent du thiocyanate de guanidine, entrer en contact avec la solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel). Ces mélanges peuvent générer un gaz très toxique.
- R. Le **SPEX** est sensible à la lumière et est livré dans des bouteilles de protection opaques.
- S. Lors de l'élimination des unités de traitement d'échantillons usagées (SPU) COBAS® AmpliPrep contenant du thiocyanate de guanidine, éviter tout contact avec la solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel). Ces mélanges peuvent générer un gaz très toxique.
- T. Se reporter à la fiche méthodologique **PSC** Method Sheet ms_09411763190 pour de plus amples informations quant aux avertissements et aux précautions d'emploi.

CONDITIONS DE MANIPULATION ET DE STOCKAGE

- A. **Ne pas congeler les réactifs et les contrôles.**
- B. Avant utilisation, inspecter visuellement chaque cassette de réactif et chaque flacon de réactif pour détecter tout signe de fuite. En présence de fuite, ne pas utiliser ce matériel pour le test.
- C. Conserver les réactifs **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 et HIV-1 v2.0 CS4** à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ces réactifs restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée tant que leur flacon n'est pas ouvert. Après ouverture du flacon, ces réactifs restent stables pendant 28 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C ou jusqu'à la date de péremption, selon la première date limite atteinte. **HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 et HIV-1 v2.0 CS4** peuvent être utilisés pendant 4 cycles d'appareil maximum et jusqu'à 64 heures cumulées sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. Les réactifs doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C entre les cycles de l'appareil.
- D. Conserver **HIV-1 H(+), v2.0, HIV-1 L(+), v2.0 et CTM (-) C** à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les contrôles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Une fois ouverte, toute portion non utilisée doit être éliminée.
- E. Conserver les pinces à code-barres [**HIV-1 H(+), v2.0 Clip, HIV-1 L(+), v2.0 Clip et HIV-1 (-) C Clip**] entre 2 et 30 °C.
- F. Conserver le **PG WR** entre 2 et 30 °C. Le **PG WR** reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, ce réactif reste stable pendant 28 jours à une température comprise entre 2 et 30 °C ou jusqu'à la date de péremption, selon la première date limite atteinte.
- G. Conserver le **SPEX** (utilisé dans la procédure avec spots de plasma séché sur **PSC**) entre 2 et 8 °C. Le **SPEX** reste stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Après ouverture du flacon, ce réactif reste stable pendant 28 jours à une température comprise entre 2 et 30 °C ou jusqu'à la date de péremption, selon la première date limite atteinte.
- H. Les conditions de manipulation et de stockage des **PSC** sont décrites dans la fiche méthodologique **PSC Method Sheet ms_09411763190**.

MATÉRIEL FOURNI

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

HI2CAP

(P/N : 05212294 190)

HIV-1 v2.0 CS1

(Cassette de réactifs de particules magnétiques de verre HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS2

(Cassette de réactif de lyse HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS3

(Cassette multi-réactifs HIV-1)

HIV-1 v2.0 CS4

(Cassette de réactifs spécifiques au test HIV-1)

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

(Contrôle fortement positif au HIV-1, v2.0)

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

(Contrôle faiblement positif au HIV-1, v2.0)

CTM (-) C

[Contrôle négatif COBAS® TaqMan® (plasma humain)]

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

(Pince à code-barres du contrôle fortement positif au HIV-1, v2.0)

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

(Pince à code-barres du contrôle faiblement positif au HIV-1, v2.0)

HIV-1 (-) C Clip

(Pince à code-barres du contrôle négatif au HIV-1)

B. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent**

PG WR

(P/N : 03587797 190)

C. **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Specimen
Pre-Extraction Reagent**

SPEX

(P/N : 06989861190)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Appareils et logiciel

- Appareil COBAS® AmpliPrep
- Analyseur COBAS® TaqMan® ou analyseur COBAS® TaqMan® 48
- En option : instrument **cobas p 630**
- En option : station d'amarrage
- Logiciel AMPLILINK version 3.3 ou 3.4
- Unité de contrôle du logiciel AMPLILINK, avec imprimante
- Manuels de l'appareil et du logiciel :
 - Manuel de l'appareil COBAS® AmpliPrep à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4
 - Manuel de l'analyseur COBAS® TaqMan® à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4
 - Manuel de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4
 - Manuel d'application du logiciel AMPLILINK version 3.3 à utiliser avec l'appareil COBAS® AmpliPrep, l'analyseur COBAS® TaqMan®, l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, l'analyseur COBAS® AMPLICOR® et l'instrument **cobas p 630**
ou
 - Manuel d'application du logiciel AMPLILINK version 3.4
 - En option : manuel d'utilisation de l'instrument **cobas p 630**, logiciel version 2.2.
- Fichier de définition de test (FDT). Reportez-vous à la carte d'informations sur les produits incluse dans le kit pour obtenir le nom et la version actuelle du FDT.

Articles jetables

- Unités de traitement des échantillons : SPU
- Tubes d'échantillon d'entrée (tubes S) à pinces à code-barres
- Portoirs pour embouts K
- Coffret de 12 x 96 tubes K

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE (POUR L'APPLICATION D'ÉCHANTILLONS DE PLASMA EDTA UNIQUEMENT) MAIS NON FOURNI

- Portoir à échantillons (portoir SK 24)
- Portoir à réactifs
- Portoir pour unités de traitement des échantillons (SPU)
- Capsuleuse de tube K motorisée
- Capsuleuse de tube K
- Porteur K
- Transporteur de porteur K
- Portoir de porteur K
- Pipetteurs (d'une capacité de 1000 µL)* avec embout à filtre (protection contre les aérosols) ou à déplacement positif, exempt de RNase
- Gants jetables, non poudrés
- Mélangeur Vortex

* Les pipetteurs doivent être précis à plus ou moins 3 % par rapport au volume indiqué. Utiliser des embouts à filtre de protection contre les aérosols ou à déplacement positif et exempts de RNase chaque fois que cela est spécifié afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons et les amplicons.

AUTRES MATÉRIELS ET CONSOMMABLES REQUIS (POUR L'APPLICATION D'ÉCHANTILLONS DE SPOTS DE PLASMA SÉCHÉ SUR PSC UNIQUEMENT) MAIS NON FOURNIS

- **cobas**[®] Plasma Separation Card (P/N 07963084190 ou P/N 09411763190)*
- Pincés ou pincettes stériles ou jetables**
- Tube capillaire de 140 µL (tube en plastique Vitrex, par exemple) avec distributeur compatible (support de pipette Vitrex, par exemple)*
- Lancette à usage unique (Greiner Bio-one : MiniCollect[®] Safety Lancet profondeur de pénétration 2,00 mm, par exemple)*
- Sac d'échantillon (en plastique transparent refermable Ziplock) et sachets déshydratants de gel de silice (pour un total de 4 grammes. Pour obtenir de plus amples informations sur le stockage et le transport des **PSC**, voir la fiche méthodologique **PSC** Method Sheet ms_09411763190).
- Sac de transport (Wicoseal 180 x 60 x 240 mm, par exemple)
- Pipette (Multistep[®], par exemple)
- Thermomixer[®] Eppendorf (modèle R 5355 ou C ou équivalent, par exemple) avec Thermoblock pour 24 cryo tubes

* Voir la fiche méthodologique **PSC** Method Sheet ms_09411763190 pour obtenir de plus amples informations sur le prélèvement des échantillons sur **PSC**.

** Pour éviter la contamination croisée, n'utiliser qu'une seule pince par patient. L'utilisation de pincés métalliques stérilisées par autoclave après usage unique est recommandée.

PRÉLÈVEMENT, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS DE PLASMA EDTA

Remarque : manipuler tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

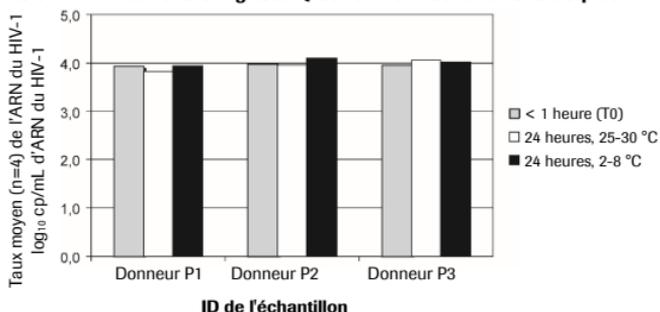
Remarque : ce test a été validé exclusivement pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA ou à partir de spots de plasma séché sur PSC. L'analyse de types d'échantillons différents de ceux du type indiqué peut aboutir à des résultats inexacts.

A. Prélèvement des échantillons

Le test COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1, v2.0 doit être utilisé sur des échantillons de plasma. Le sang doit être prélevé dans des tubes stériles avec EDTA comme anticoagulant et mélangé de façon adéquate, conformément aux instructions du fabricant des tubes.

Conserver le sang total entre 2 et 25 °C pendant un maximum de 24 heures. Afin d'en recueillir le plasma dans les 24 heures, centrifuger le sang total à 800-1 600 x g pendant 20 minutes, à température ambiante. Transférer le plasma dans un tube stérile en polypropylène. La figure 4 montre les données d'étude de stabilité des échantillons. Ces études ont été effectuées à l'aide du test COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 (P/N : 03543005 190).

Figure 4
Stabilité du HIV-1 dans le sang total (recueilli sur échantillons de plasma EDTA)



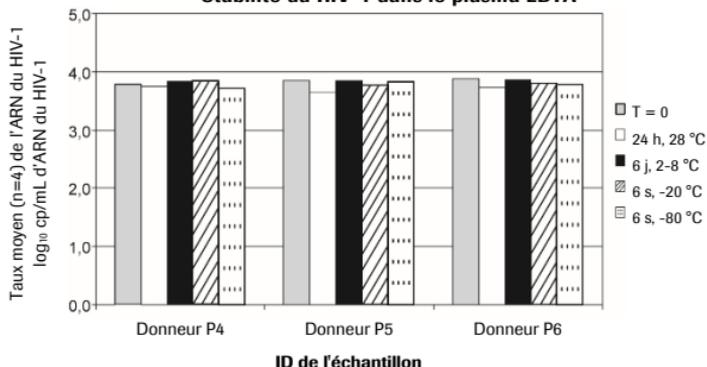
B. Transport des échantillons

Le transport des échantillons de sang total ou de plasma doit s'effectuer conformément aux réglementations en vigueur dans le pays, aux niveaux fédéral, national et local, pour le transport d'agents étiologiques⁴⁰. Le sang total doit être transporté à une température comprise entre 2 et 25 °C et centrifugé dans les 24 heures suivant son prélèvement. Le plasma peut être transporté à 2-8 °C ou congelé entre -20 °C et -80 °C.

C. Conservation des échantillons

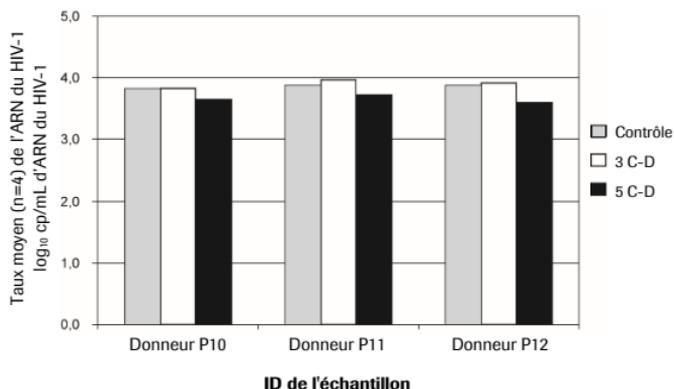
Les échantillons de plasma peuvent être conservés soit à température ambiante (25-30 °C) jusqu'à 1 jour, soit entre 2 et 8 °C jusqu'à 6 jours. Ils restent stables pendant six semaines en étant congelés entre -20 °C et -80 °C. Il est recommandé de conserver les échantillons sous forme d'aliquots de 1 100-1 200 µL dans des tubes en polypropylène stériles et à bouchon fileté de 2,0 mL (tels que les Sarstedt 72.694.006). La figure 5 montre les données d'étude de stabilité des échantillons. Ces études de conservation des échantillons ont été effectuées à l'aide du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N : 03543005 190).

Figure 5
Stabilité du HIV-1 dans le plasma EDTA



Les échantillons de plasma peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 5 fois sans perte significative d'ARN du HIV-1. La figure 6 montre les données d'une étude de congélation/décongélation réalisée à l'aide du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 (P/N : 03543005 190).

Figure 6
Résultats du HIV-1 jusqu'à cinq cycles de congélation/décongélation (plasma EDTA)



PRÉLÈVEMENT, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS DE SPOTS DE PLASMA SÉCHÉ SUR PSC

Remarque : manipuler tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

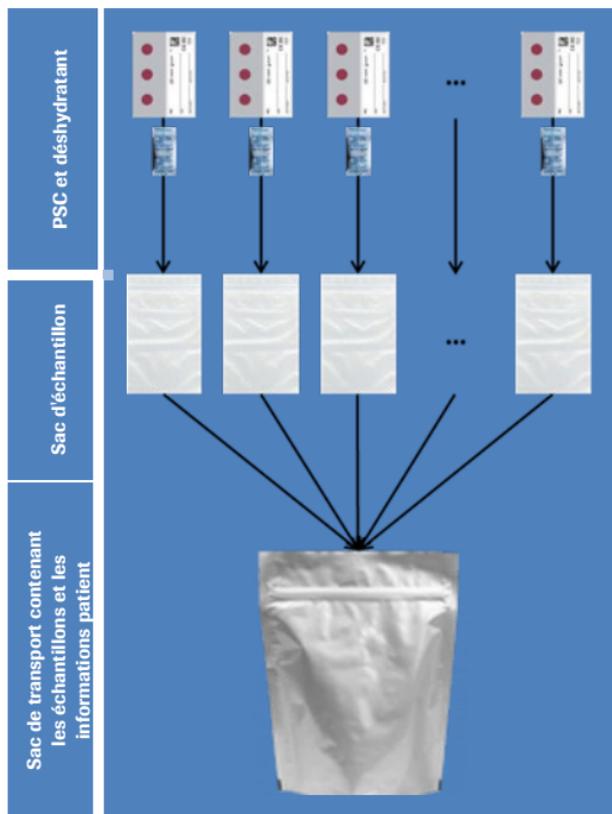
Remarque : ce test a été validé exclusivement pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA ou à partir de spots de plasma séché sur PSC. L'analyse de types d'échantillons différents de ceux du type indiqué peut aboutir à des résultats inexacts.

A. Prélèvement d'échantillons

Les échantillons de spots de sang séché sur **PSC** sont prélevés en utilisant les procédures cliniques appropriées. La date de péremption de la **PSC** doit être vérifiée avant toute utilisation. Poursuivre uniquement si la date de péremption de la **PSC** n'est pas dépassée et si le sac dans lequel la **PSC** est scellée est intact et entièrement fermé. Étiqueter la **PSC** avec le nom du patient, sa date de naissance, la date et l'heure du prélèvement de l'échantillon. Au moyen d'un tube capillaire et d'une poire appropriés, appliquer 140 µL de sang total sur chaque cercle de la membrane de la **PSC** délimité par la face de collecte de la goutte de sang. Il est recommandé de remplir les trois cercles figurant sur la **PSC** afin de permettre des réanalyses. Ne pas appliquer d'échantillons de plusieurs patients sur une même **PSC**. S'assurer que les DEUX faces des spots **PSC** (avant : membrane contenant le sang ; arrière : spot contenant le plasma) sont saturées après 5 minutes. Contrôler la face arrière à travers le verso transparent de la carte. Pendant cette procédure, veiller à éviter tout contact entre les membranes et les gants, des instruments ou toute autre surface potentiellement contaminée.

Laisser sécher la **PSC** à température ambiante pendant au moins 4 heures (ou une nuit au maximum) à l'abri de la lumière directe du soleil. Ne pas retirer la face de collecte de la goutte de sang. Cela s'effectue au laboratoire. Après le séchage, conserver la **PSC** dans un sac d'échantillon individuel avec 4 grammes de déshydratant et fermer le sac hermétiquement (figure 7). Les sacs d'échantillon doivent être placés dans un sac de transport avec les fiches d'information patient correspondantes. Il est recommandé de placer 25 **PSC** au maximum par sac de transport.

Figure 7
Description générale du conditionnement pour transport des PSC



B. Transport des échantillons

Si les échantillons sont expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations nationales et internationales sur le transport d'échantillons et d'agents étiologiques. Les sacs de transport contenant les **PSC** doivent être transportés dans les 28 jours entre 18 et 45 °C à un taux d'humidité maximum de 85 %.

C. Conservation des échantillons

Après le transport, les **PSC** contenues dans des sacs d'échantillons individuels avec 4 grammes de déshydratant peuvent être conservées dans un sac de transport à température ambiante (entre 18 et 30 °C), entre 2 et 8 °C ou à ≤ -10 °C pendant 56 jours au maximum (avec ou sans séparation des couches).

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

Remarque : pour obtenir des instructions d'utilisation détaillées, une description exhaustive des différentes configurations possibles, des instructions sur l'impression des résultats, l'interprétation des messages, commentaires et messages d'erreur, consulter : (1) le manuel de l'appareil COBAS® AmpliPrep à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4 ; (2) le manuel de l'analyseur COBAS® TaqMan® à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4 ; (3) le manuel de l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à utiliser avec le logiciel AMPLILINK versions 3.3 et 3.4 ; (4) le manuel d'application du logiciel AMPLILINK versions 3.3 à utiliser avec l'appareil COBAS® AmpliPrep, l'analyseur COBAS® TaqMan®, l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, l'analyseur COBAS® AMPLICOR® et l'instrument cobas p 630 ou le manuel d'application du logiciel AMPLILINK version 3.4 ; (5) en option : le manuel d'utilisation de l'instrument cobas p 630 version 2.2.

Les informations contenues dans les parties A-C et F-J sont des informations d'ordre général relatives aux deux types d'échantillon (échantillons de plasma EDTA et de spots de plasma séché sur PSC). La partie D contient des informations relatives à la programmation et au chargement des échantillons pour les échantillons de plasma EDTA uniquement. La partie E contient des informations relatives à la programmation et au chargement des échantillons pour les échantillons de spots de plasma séché sur PSC uniquement.

Taille du lot

Chaque kit contient des réactifs en quantité suffisante pour 48 tests, qui peuvent être effectués en lots de 12 à 24 tests. Au moins un contrôle de chaque [CTM (-) C, HIV-1 L(+), v2.0 et HIV-1 H(+), C, v2.0] doit être inclus dans chaque lot (voir la section « Contrôle qualité »).

Procédure de travail

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 doit effectuer l'analyse dans les 120 minutes qui suivent la préparation des échantillons et contrôles.

Remarque : ne pas congeler ou conserver les échantillons et les contrôles traités à 2-8 °C.

Préparation des échantillons et des contrôles

Remarque : si des échantillons congelés sont utilisés, les mettre à température ambiante jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés, puis les agiter au vortex pendant 3 à 5 secondes avant de les utiliser. Les contrôles doivent être retirés du stockage à 2-8 °C et portés à température ambiante avant utilisation.

Préparation de l'appareil COBAS® AmpliPrep

Partie A. Maintenance et préparation

- A1. L'appareil COBAS® AmpliPrep est prêt à fonctionner en mode veille.
- A2. Mettre l'unité de contrôle du logiciel AMPLILINK sous tension (**ON**). Préparer l'unité de contrôle de la façon suivante :
 1. Ouvrir une session sur le système d'exploitation Microsoft Windows.
 2. Double-cliquer sur l'icône du logiciel AMPLILINK.
 3. Ouvrir une session sur le logiciel AMPLILINK en entrant l'ID Utilisateur et le mot de passe attribués.
- A3. Vérifier la quantité de réactif de lavage (**PG WR**) dans l'écran **Status** et le remplacer si nécessaire.

- A4. Effectuer tout l'entretien décrit dans l'onglet Due. L'appareil COBAS® AmpliPrep amorce automatiquement le système.

Partie B. Chargement des cassettes de réactifs

Remarque : *toutes les cassettes de réactifs doivent être sorties de leur lieu de conservation à 2-8 °C, chargées immédiatement sur l'appareil COBAS® AmpliPrep et portées à température ambiante sur l'appareil au moins 30 minutes avant le traitement du premier échantillon. Ne pas laisser les cassettes de réactifs hors de l'appareil pendant leur accoutumance à la température ambiante car de la condensation peut se former sur les étiquettes à code-barres. Ne pas nettoyer la condensation si elle apparaît sur les étiquettes à code-barres.*

- B1. Placer le **HIV-1 v2.0 CS1** sur un portoir à réactifs. Placer les réactifs **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** et **HIV-1 v2.0 CS4** sur un portoir à réactifs séparé.
- B2. Charger le portoir à réactifs contenant le **HIV-1 v2.0 CS1** dans la position de portoir **A** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.
- B3. Charger le portoir à réactifs contenant les réactifs **HIV-1 v2.0 CS2**, **HIV-1 v2.0 CS3** et **HIV-1 v2.0 CS4** dans les positions de portoir **B**, **C**, **D** ou **E** de l'appareil COBAS® AmpliPrep. (voir le tableau 1 pour des informations supplémentaires).

Partie C. Chargement des articles jetables

Remarque : *déterminer le nombre nécessaire de cassettes de réactifs COBAS® AmpliPrep, d'unités de traitement d'échantillon (SPU), de tubes d'échantillon d'entrée (tubes S) et d'embouts K et de tubes K. Une SPU, un tube S d'entrée, un embout K et un tube K sont nécessaires pour chaque échantillon ou chaque contrôle.*

Il est possible d'utiliser des procédures de travail multiples de l'appareil COBAS® AmpliPrep avec l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48. Pour référence, voir le tableau 1 ci-dessous. En fonction de la procédure de travail utilisée, charger le nombre approprié de portoirs à cassettes de réactifs, de portoirs à échantillons avec des tubes S d'entrées, de portoirs SPU, de portoirs d'embouts K, de portoirs de tubes K et de porteurs K sur des portoirs de porteurs K aux positions respectives de portoir de l'appareil COBAS® AmpliPrep (voir Tableau 1 pour des informations supplémentaires).

- C1. Placer les SPU sur le ou les portoirs SPU et charger ceux-ci aux positions de portoir **J**, **K** ou **L** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.
- C2. En fonction de la procédure de travail utilisée, charger le nombre approprié de portoir(s) de tubes K complets aux positions de portoir **M**, **N**, **O** ou **P** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.
- C3. Charger le nombre approprié de portoir(s) d'embouts K complets aux positions de portoirs **M**, **N**, **O** ou **P** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.
- C4. Pour la procédure de travail 3 avec l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, charger les porteurs K sur des portoirs de porteurs K aux positions de portoir **M** et **N**, ou **O** et **P** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Tableau 1
Procédures de travail possibles pour l'utilisation de l'appareil COBAS® AmpliPrep avec
l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48

| Procédure de travail | | Mode de transfert dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 | Portoirs, porteurs et articles jetables | Position sur l'appareil COBAS® AmpliPrep |
|----------------------|---|--|--|--|
| 1 | Appareil COBAS® AmpliPrep plus station d'amarrage plus analyseur COBAS® TaqMan® | Transfert automatique de porteur K | Tubes K dans portoirs de tubes K pleins | M - P |
| | | | Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins | M - P |
| | | | Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des contrôles sur portoirs d'échantillons | F - H |
| | | | SPU dans portoirs SPU | J - L |
| | | | CS1 sur portoir à cassettes | A |
| | | | CS2, CS3, CS4 sur portoir à cassettes | B - E |
| 2 | Appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan® | Transfert manuel des tubes K via le(s) portoir(s) d'échantillons dans l'analyseur COBAS® TaqMan® | Tubes K dans portoirs de tubes K pleins | M - P |
| | | | Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins | M - P |
| | | | Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des contrôles sur portoirs d'échantillons | F - H |
| | | | SPU dans portoirs SPU | J - L |
| | | | CS1 sur portoir à cassettes | A |
| | | | CS2, CS3, CS4 sur portoir à cassettes | B - E |
| | | | <u>Une fois le traitement des échantillons terminé :</u> Tubes K sur portoirs d'échantillons (prêts pour le transfert manuel) | Comme ci-dessus (F - H) |
| 3 | Appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur(s) COBAS® TaqMan® 48 | Transfert manuel des porteurs K via le(s) portoir(s) de porteur K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 | Tubes K dans portoirs d'échantillons | F - H |
| | | | Embouts K dans portoirs d'embouts K pleins | M - P |
| | | | Tubes S d'entrée contenant des échantillons et des contrôles sur portoirs d'échantillons | F - H |
| | | | SPU dans portoirs SPU | J - L |
| | | | CS1 sur portoir à cassettes | A |
| | | | CS2, CS3, CS4 sur portoir à cassettes | B - E |
| | | | Porteur K à code-barres vide sur portoir de porteur K | M - P |
| | | | <u>Une fois le traitement des échantillons terminé :</u> Tubes K dans porteur K sur portoir de porteur K | Comme ci-dessus (M - P) |

Partie D. Programmation et chargement des échantillons : échantillons de plasma EDTA

- D1. Préparer les portoirs d'échantillons de la façon suivante : fixer une pince à étiquette à code-barres sur chaque position de portoir d'échantillons où un échantillon (tube S) doit être placé. Fixer une des pinces à étiquette à code-barres spécifiques pour les contrôles **[CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C**, v2.0]** sur chaque position de portoir d'échantillons où les contrôles (tube S) doivent être placés. Le numéro de lot de contrôle des pinces à étiquette à code-barres pour contrôles doit être le même que celui figurant sur les flacons de contrôles du kit. Veiller à assigner le contrôle correct à la position ayant la pince à code-barres de contrôle correspondante. Installer un tube S d'entrée dans chaque position contenant une pince à étiquette à code-barres.
- D2. À l'aide du logiciel AMPLILINK, sélectionner le fichier de définition de test (HI2CAP96 pour l'appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan®, HI2CAP48 pour l'appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan® 48), créer des ordres d'échantillon pour chaque échantillon et contrôle de l'onglet **Sample** de la fenêtre **Orders** et terminer en sauvegardant.
- D3. Attribuer l'ordre des échantillons et des contrôles à des positions de portoir d'échantillons dans l'onglet **Sample Rack** de la fenêtre **Orders**. Le numéro du portoir d'échantillons doit être celui du portoir préparé à l'étape D1.
- D4. Imprimer le compte-rendu de **Sample Rack Order** à utiliser comme feuille de travail.
- D5. Préparer les portoirs à échantillons et à contrôles dans la zone désignée pour l'ajout d'échantillons et de contrôles comme suit : passer tous les échantillons et les contrôles au vortex **[CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C**, v2.0]** pendant 3 à 5 secondes. Éviter la contamination des gants lors de la manipulation des échantillons et des contrôles.
- D6. Au moyen d'une micropipette avec embout à filtre (protection contre les aérosols) ou à déplacement positif sans RNase, ajouter de 1 000 µL à 1 050 µL de chaque échantillon et de chaque contrôle **[CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C**, v2.0]** dans le tube S d'entrée portant l'étiquette à code-barres appropriée. **Éviter de transférer des particules et/ou des caillots fibrineux de l'échantillon d'origine vers le tube S d'entrée.** Il convient de transférer les échantillons et les contrôles aux positions déterminées pour les tubes et enregistrées sur la feuille de travail à l'étape D4. Le numéro de lot de contrôle des pinces à étiquette à code-barres pour contrôles doit être le même que celui figurant sur les flacons de contrôles du kit. Assigner le contrôle correct à la position ayant la pince à code-barres de contrôle appropriée. **Éviter de contaminer la partie supérieure des tubes S avec des échantillons ou des contrôles.** En cas d'utilisation de l'instrument **cobas p 630** pour la préparation d'échantillons, se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **cobas p 630**.
- D7. Pour les procédures de travail 1 et 2, charger le(s) portoir(s) d'échantillons contenant les tubes S d'entrée dans les positions de portoirs **F, G** ou **H** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.
- D8. Pour la procédure de travail 3 utilisant l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, charger le(s) portoir(s) d'échantillons contenant les tubes S d'entrée et les tubes K (un par tube S d'entrée, chargé immédiatement à droite de celui-ci) aux positions de portoir **F, G** ou **H** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

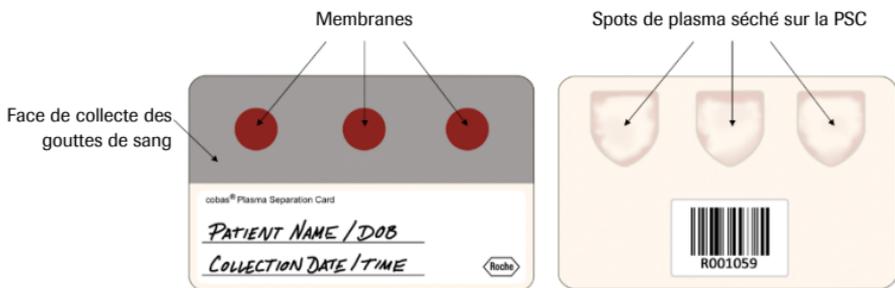
Partie E. Programmation et chargement des échantillons : échantillons de spots de plasma séché sur PSC

E1. Vérifier l'intégrité du sac de transport avant ouverture. Ne continuer que si le sac de transport est intact et entièrement fermé

Ouvrir le sac de transport et, pour chaque sac d'échantillon, ne poursuivre que si les critères suivants sont réunis :

- Le formulaire de demande d'analyse de laboratoire est dûment rempli.
- Les codes-barres du formulaire de demande d'analyse de laboratoire et de la **PSC** correspondent.
- Le sac d'échantillon est entièrement fermé et contient une **PSC** ainsi que 4 grammes de déshydratant.
- La date du prélèvement de l'échantillon est indiquée ; le prélèvement a été effectué il y a 28 jours au maximum et a eu lieu avant la date de péremption de la **PSC**.
- La date de péremption de la **PSC** n'est pas dépassée.
- Le spot de plasma séché sur la **PSC** semble homogène sur la face avant et entièrement recouvert de plasma vue de la face arrière de la carte (voir la Figure 8).

Figure 8
Spots de plasma séché sur une PSC à traiter
(à gauche : face avant. À droite : face arrière)



E2. Les spots de plasma séché sur la **PSC** devraient être identifiés et rejetés si :

- des éclaboussures de sang sont visibles (Figure 9b) et/ou la membrane n'est pas complètement couverte de sang (Figure 9c) et, par conséquent, le spot sur la **PSC** contient une zone avant non homogène et/ou une face arrière n'est pas entièrement recouvert de plasma (visible à travers le support) ;
- la membrane est endommagée (Figure 9a) et, par conséquent, le spot sur la **PSC** n'est pas homogène sur la zone avant et est rouge foncé-brun sur la face arrière (visible à travers le support).

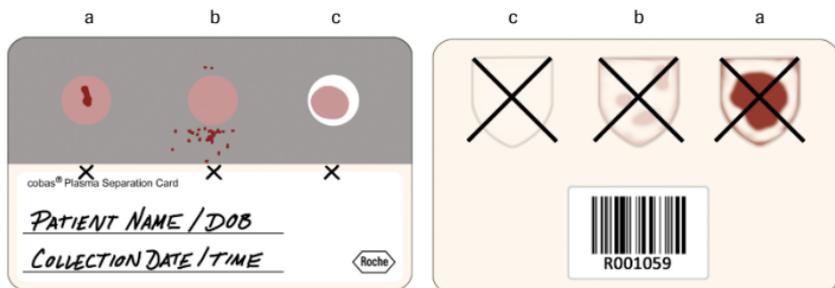
Remarque : les trois spots ont pour objet de permettre des réanalyses. Une PSC peut contenir un spot de mauvaise qualité, mais néanmoins inclure un échantillon approprié pour le test. Marquer correctement les spots ne remplissant pas les critères pour les reconnaître ultérieurement. Éviter de les identifier sur la face de collecte de la goutte de sang. Comparer toujours les trois spots les uns aux autres afin d'en évaluer la qualité.

Figure 9

Critères de rejet des PSC (à gauche : face avant ; à droite : face arrière).

Les spots présentant des éclaboussures de sang (b), dont la membrane n'est pas recouverte (c) ou dont les membranes sont visiblement endommagées (a) ne doivent pas être traités.

Si des spots sont rejetés, ils doivent être clairement identifiés



- E3. Préparer les portoirs d'échantillons de la façon suivante : fixer une pince à étiquette à code-barres sur chaque position de portoir d'échantillons où un échantillon (tube S) doit être placé. Fixer une des pinces à étiquette à code-barres spécifiques pour les contrôles [**CTM (-) C, HIV-1 L(+)**C**, v2.0 et HIV-1 H(+)**C**, v2.0**] sur chaque position de portoir d'échantillons où les contrôles (tube S) doivent être placés. Le numéro de lot de contrôle des pinces à étiquette à code-barres pour contrôles doit être le même que celui figurant sur les flacons de contrôles du kit. Veiller à assigner le contrôle correct à la position ayant la pince à code-barres de contrôle correspondante. Installer un tube S d'entrée dans chaque position contenant une pince à étiquette à code-barres.
- E4. À l'aide du logiciel AMPLILINK, sélectionner le fichier de définition de test approprié (HI2PSC96 pour l'analyseur COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan®, HI2PSC48 pour l'appareil COBAS® AmpliPrep plus analyseur COBAS® TaqMan® 48), et créer des ordres d'échantillon pour chaque échantillon et contrôle de l'onglet **Sample** de la fenêtre **Orders**, puis terminer en sauvegardant.
- E5. Attribuer l'ordre des échantillons et des contrôles à des positions de portoir d'échantillons dans l'onglet **Sample Rack** de la fenêtre **Orders**. Le numéro du portoir d'échantillons doit être celui du portoir préparé à l'étape E1. Le code-barres du patient sur la face arrière de la **PSC** peut être scanné à travers le sac d'échantillon (Figure 10). Ne pas ouvrir le sac d'échantillon à ce stade et terminer en sauvegardant.

Figure 10
Lecture du code-barres de l'échantillon pour commander
des échantillons de spots de plasma séché sur PSC



- E6. Imprimer le compte-rendu de **Sample Rack Order** à utiliser comme feuille de travail, et vérifier à nouveau que le fichier de test approprié est utilisé.
- E7. Effectuer les étapes E7 à E11 sous une hotte de sécurité. Ouvrir le sac d'échantillon contenant la **PSC** à analyser et retirer la face de collecte de la goutte de sang (figure 11). Incurver légèrement la **PSC** et retirer un spot de plasma séché en la soulevant à l'aide d'une pince ou pincette stérile. Incurver le spot de plasma séché retiré de la **PSC** pour en faciliter l'insertion dans le tube (figure 12).

Figure 11
Retrait de la face de collecte de la goutte de sang



Figure 12
Retrait et incurvation du spot de plasma séché sur la PSC



Remarque : Utiliser une pince ou pincette par patient.

- E8. Transférer un spot de plasma séché sur la **PSC** préalablement incurvé dans le tube S d'entrée correspondant de sorte que la pointe inférieure du spot de plasma séché sur la **PSC** atteigne le fond du tube et soit collé contre la paroi du tube afin d'éviter toute erreur de pipetage (figure 13 et figure 14).

Remarque : les spots de sang séché peuvent devenir friables pendant la conservation. Voir les conditions de conservation de la PSC. Il convient de procéder avec précaution lors de l'insertion dans le tube.

Figure 13
Transfert du spot de plasma séché sur la PSC dans le tube

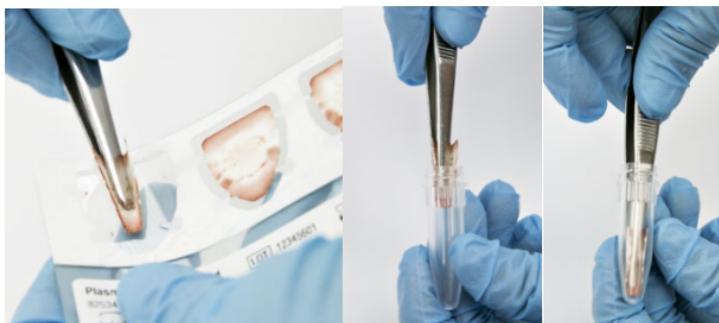
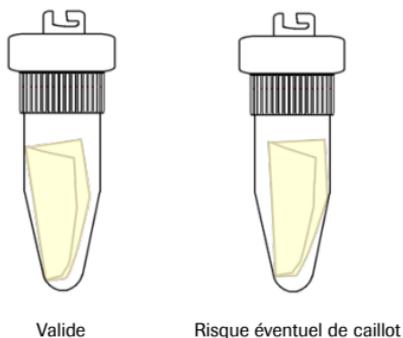


Figure 14
Positionnement optimal du spot de plasma séché sur PSC dans le tube S



Remarque : s'assurer que le numéro de position du tube S d'entrée sur le compte-rendu de Sample Rack Order correspond à la position de portoir SK24.

- E9. Replacer la **PSC** contenant les spots de plasma séché restants dans son sac d'échantillon initial contenant 4 grammes de déshydratant frais en vue d'une éventuelle réanalyse (Figure 15). Les **PSC** peuvent être conservées pendant 56 jours au maximum après le transport séparées ou non de la face de collecte de la goutte de sang (entre 18 et 30 °C, ou entre 2 et 8 °C ou à ≤ -10 °C).

Figure 15
PSC dans le sac d'échantillon en vue d'une réanalyse potentielle



- E10. Reboucher le tube S d'entrée et transférer le tube contenant le spot de plasma séché sur **PSC** en position 4-24 du portoir SK24 (voir le tableau 2 pour plus de détails). Répéter l'opération jusqu'à ce que tous les échantillons soient traités.

Remarque : porter le SPEX à température ambiante avant utilisation.

- E11. Ouvrir chacun des tubes S d'entrée, conserver le bouchon dans un environnement propre et ajouter 1 100 μ L de **SPEX** à chaque tube S d'entrée (Figure 16). Replacer le bouchon sur le tube S d'entrée. Répéter l'opération jusqu'à ce que tous les échantillons soient traités.

Figure 16
Ajout de 1 100 μ L de SPEX à chaque échantillon de spots de plasma séché sur PSC



Remarque : éviter de contaminer la partie supérieure des tubes S d'entrée avec les échantillons, et s'assurer que les tubes sont correctement rebouchés pour éviter toute évaporation.

- E12. Transférer les tubes S d'entrée dans le Thermomixer Eppendorf et incuber les tubes S d'entrée préparés à 56 °C et sous agitation continue à 1 000 tr/m pendant 10 minutes pour extraire le virus du plasma séché (Figure 17).

Figure 17
L'incubation est effectuée pendant 10 minutes.



Remarque : Commencer l'incubation immédiatement après l'ajout du SPEX.

E13. Pendant la période d'incubation, préparer les contrôles comme suit.

Remarque : ne pas incuber les contrôles.

Placer un tube S d'entrée dans chaque position (1 à 3) du portoir SK24 préparé contenant une pince à étiquette à code-barres pour contrôle.

Mélanger soigneusement 1 flacon de **CTM (-) C** pendant 20 secondes au vortex. Transférer 1 000 µL de **CTM (-) C** dans le tube S d'entrée 1 du portoir SK24. Replacer immédiatement ce bouchon sur le tube S d'entrée.

Mélanger soigneusement 1 flacon de **HIV-1 L(+)C, v2.0** pendant 20 secondes au vortex. Transférer 1 000 µL de **HIV-1 L(+)C, v2.0** dans le tube S d'entrée 2 du portoir SK24. Replacer immédiatement ce bouchon sur le tube S d'entrée.

Mélanger soigneusement 1 flacon de **HIV-1 H(+)C, v2.0** pendant 20 secondes au vortex. Transférer 1 000 µL de **HIV-1 H(+)C, v2.0** dans le tube S d'entrée 3 du portoir SK24. Replacer immédiatement ce bouchon sur le tube S d'entrée.

Tableau 2
Programmation et chargement d'échantillons de spots de plasma séché sur PSC

| Échantillon | Position de commande AMPLILINK | Position Eppendorf IsoRack | Position de portoir SK24 |
|--|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Échantillon | Tube S d'entrée | Tube S d'entrée | Tube S d'entrée |
| CTM(-)C | 1 | Vide | 1 |
| HIV-1 L(+)C, v2.0 | 2 | Vide | 2 |
| HIV-1 H(+)C, v2.0 | 3 | Vide | 3 |
| Spot de plasma séché sur PSC + 1 100 µL de SPEX | 4-24 | 4-24 | 4-24 |

E14. Après l'incubation, transférer les échantillons dans le bon ordre vers le portoir SK24 contenant les contrôles (étape E13) (voir le tableau 2 pour plus de détails).

Remarque : vérifier que la position du spot de plasma séché sur PSC est toujours correcte dans le tube (figure 14) et l'ajuster avec l'embout d'une pipette stérile si nécessaire. Si des bulles sont présentes, les enlever avec un embout de pipette stérile.

E15. Charger le(s) portoir(s) d'échantillons contenant les tubes S d'entrée dans les positions de portoirs **F, G** ou **H** de l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Partie F. Démarrage d'une analyse sur l'appareil COBAS® AmpliPrep

F1. Démarrer l'appareil COBAS® AmpliPrep à l'aide du logiciel AMPLILINK.

Partie F. Fin d'une analyse sur l'appareil COBAS® AmpliPrep et transfert sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 (pour les procédures de travail 2 et 3 uniquement dans le Tableau 1)

G1. Vérifier la présence d'alertes ou de messages d'erreur.

G2. Retirer les échantillons et contrôles traités de l'instrument COBAS® AmpliPrep soit sur des portoirs d'échantillons (pour l'analyseur COBAS® TaqMan® sans station d'amarrage), soit sur des portoirs de porteur K (pour l'analyseur COBAS® TaqMan® 48) selon la procédure de travail (pour plus de détails, voir Partie G).

G3. Retirer les déchets de l'instrument COBAS® AmpliPrep.

Remarque : les échantillons et contrôles traités ne doivent pas être exposés à la lumière après leur préparation.

Amplification et détection

Configuration de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 doit effectuer l'analyse dans les 120 minutes qui suivent la préparation des échantillons et contrôles.

Remarque : ne pas congeler ou conserver les échantillons et les contrôles traités à 2-8 °C.

Partie H. Chargement des échantillons traités

H1. Effectuer les étapes appropriées à la procédure de travail pour transférer les tubes K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 :

Procédure de travail 1 : Transfert automatique du portoir K via la station d'amarrage dans l'analyseur COBAS® TaqMan®. Une intervention manuelle n'est pas nécessaire.

Procédure de travail 2 : Transfert manuel des tubes K dans le(s) portoir(s) d'échantillons vers l'analyseur COBAS® TaqMan®

Procédure de travail 3 : Transfert manuel du porteur K sur le(s) portoir(s) de porteur K vers l'analyseur COBAS® TaqMan® 48. Transfert manuel de porteurs K dans l'analyseur COBAS® TaqMan® 48 à l'aide du transporteur de porteur K.

Partie I. Démarrage d'une analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48

- I1. Démarrer l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 par une des options présentées ci-dessous en fonction de la procédure de travail utilisée :

Procédure de travail 1 : Aucune intervention n'est nécessaire.

Procédure de travail 2 : Démarrage automatique de l'analyseur COBAS® TaqMan® après insertion des portoirs d'échantillons.

Procédure de travail 3 : Remplir le porteur K de tubes K vides s'il y a moins de 6 tubes K sur le porteur. Le remplissage est guidé par le logiciel AMPLILINK. Ouvrir le couvercle du thermocycleur, charger le porteur K dans le thermocycleur et fermer le couvercle. Démarrer l'analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48.

Partie J. Fin d'une analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48

- J1. À la fin de l'analyse sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou sur l'analyseur COBAS® TaqMan® 48, imprimer le compte-rendu des résultats obtenus. Vérifier pour s'assurer que le fichier de définition de test approprié a été utilisé et rechercher les messages d'alerte ou messages d'erreur dans le compte-rendu des résultats obtenus. Les échantillons accompagnés d'alertes et de commentaires doivent être interprétés comme décrit dans la section « Résultats ». Une fois qu'elles sont acceptées, archiver les données.
- J2. Retirer les tubes K usagés de l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48.

RESULTATS

L'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48 détermine automatiquement la concentration en ARN du HIV-1 dans les échantillons et les contrôles. **La concentration d'ARN du HIV-1 est exprimée en copies/mL ou en UI/mL, selon le FDT utilisé. Le facteur de conversion entre les copies/mL d'ARN du HIV-1 et les UI/mL du HIV-1 est de 0,6 cp/UI, en utilisant la première norme internationale de l'ARN du HIV-1 établie par l'OMS pour les techniques basées sur l'acide nucléique (NAT) (Code NIBSC 97/656)³⁷. Ce facteur de conversion a été déterminé à l'aide du test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 et du test COBAS® TaqMan® HIV-1 à utiliser avec le système High Pure.**

Le logiciel AMPLILINK :

- Détermine la valeur seuil du cycle (Ct) de l'ARN du HIV-1 et de l'ARN du QS du HIV-1.
- Détermine la concentration de l'ARN du HIV-1 en fonction des valeurs Ct pour l'ARN du HIV-1 et l'ARN du QS du HIV-1 et les coefficients d'étalonnage spécifiques des lots figurant sur les codes-barres des cassettes.
- Vérifie que les titres en cp/mL calculés pour **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** et **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** se situent dans les plages assignées.

Validation de lot – AMPLILINK versions 3.3 et 3.4

Consulter la fenêtre des résultats du logiciel AMPLILINK ou l'impression pour vérifier la présence de messages et de commentaires afin de s'assurer de la validité de la série. Pour les ordres de contrôles, examiner si la valeur en cp/mL ou UI/mL du contrôle se situe dans son domaine théorique. Si la valeur en cp/mL ou UI/mL du contrôle se situe hors de son domaine, un message d'alerte (FLAG) est généré indiquant que le contrôle a échoué.

Le lot est valide si aucune alerte n'apparaît pour les contrôles **[HIV-1 L(+)**C**, v2.0; HIV-1 H(+)**C**, v2.0 et CTM (-) C]**.

Le lot n'est pas valide si un des messages suivants apparaît pour les Contrôles HIV-1 :

Contrôle négatif

| Alerte | Résultat | Interprétation |
|------------|----------|---|
| NC_INVALID | Invalid | Résultat invalide ou résultat « valide » qui n'était pas négatif pour la cible du HIV-1 |

Contrôle faiblement positif HIV-1, v2.0

| Alerte | Résultat | Interprétation |
|------------|----------|--|
| LPCINVALID | Invalid | Résultat invalide ou contrôle hors limites |

Contrôle fortement positif HIV-1, v2.0

| Alerte | Résultat | Interprétation |
|------------|----------|--|
| HPCINVALID | Invalid | Résultat invalide ou contrôle hors limites |

Si la série est non valide, l'analyse doit être entièrement recommencée (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection).

Interprétation des résultats

Si la série est valide, vérifier la présence de messages ou de commentaires pour chaque échantillon sur les résultats imprimés. Interpréter les résultats comme suit :

- Un lot valide peut comprendre des résultats d'échantillons valides et non valides en fonction de la présence de messages et/ou commentaires accompagnant les échantillons individuels.

Les résultats des échantillons s'interprètent comme suit :

| | Résultats de titre | Interprétation |
|---------------------------|--|--|
| | Target Not Detected | La valeur Ct du HIV-1 dépasse la limite de détection du test ou aucune valeur Ct pour HIV-1 n'a été obtenue. Enregistrer les résultats comme suit : « ARN du HIV-1 non détecté ». |
| Copies/mL | < 2,00E+01 cp/mL (plasma) < 738 cp/mL (PSC) | Les cp/mL calculées se situent sous la limite de détection du test. Enregistrer les résultats comme suit : « ARN du HIV-1 détecté, moins de 20 cp/mL d'ARN du HIV-1 » pour le plasma et « ARN du HIV-1 détecté, moins de 738 cp/mL d'ARN du HIV-1 » pour la PSC. |
| | ≥ 2,00E+01 cp/mL et ≤ 1,00E+07 cp/mL (plasma) ≥ 738 cp/mL et ≤ 1,00E+07 cp/mL (PSC) | Les résultats calculés supérieurs ou égaux à 20 cp/mL et inférieurs ou égaux à 1,00E+07 cp/mL sont dans le domaine de linéarité du test utilisé avec le plasma. Les résultats calculés supérieurs ou égaux à 738 cp/mL et inférieurs ou égaux à 1,00E+07 cp/mL sont dans le domaine de linéarité du test utilisé avec la PSC. |
| | > 1,00E+07 cp/mL (plasma et PSC) | Les cp/mL calculées dépassent le domaine du test. Enregistrer les résultats comme suit : « supérieur à 1,00E+07 cp/mL d'ARN du HIV-1 ». Pour obtenir des résultats quantitatifs, l'échantillon d'origine doit être dilué (1:100) dans du plasma humain prélevé sur EDTA HIV-1 négatif et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution. |
| Unités Internationales/mL | < 3,34E+01 UI/mL (plasma) | Les UI/mL calculées se situent sous la limite de détection du test. Enregistrer les résultats comme suit : « ARN du HIV-1 détecté, moins de 33,4 UI/mL d'ARN du HIV-1 » pour le plasma. |
| | ≥ 3,34E+01 UI/mL et ≤ 1,67E+07 UI/mL (plasma) | Les résultats calculés supérieurs ou égaux à 33,4 UI/mL et inférieurs ou égaux à 1,67E+07 UI/mL sont dans le domaine de linéarité du test. |
| | > 1,67E+07 UI/mL (plasma) | Les UI/mL calculées sont au-dessus du domaine du test. Enregistrer les résultats comme suit : « supérieur à 1,67E+07 UI/mL d'ARN du HIV-1 ». Pour obtenir des résultats quantitatifs, l'échantillon d'origine doit être dilué (1:100) dans du plasma humain prélevé sur EDTA HIV-1 négatif et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution. |

Remarque : les échantillons qui se trouvent au-dessus du domaine du test et qui produisent un résultat non valide accompagné d'un message « QS_INVALID » ne doivent pas être enregistrés comme > 1,00E+07 cp/mL ou 1,67E+07 UI/mL. L'échantillon d'origine doit être dilué à 1:100 dans du plasma EDTA humain HIV-1 négatif et l'analyse doit être refaite. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.

Remarque : résultat de titre « Failed ». Interprétation : l'échantillon n'est pas traité correctement lors de la préparation des échantillons sur l'appareil COBAS® AmpliPrep.

Remarque : résultat de titre « Invalid ». Interprétation : résultat non valide

CONTROLE QUALITE

Un de chaque contrôle **CTM (-) C**, **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** et **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** doit être inclus dans chaque lot d'analyse. Le lot est valide si aucune alerte n'apparaît pour les contrôles [**HIV-1 L(+)**C**, v2.0**, **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** et **CTM (-) C**].

Vérifier que les résultats imprimés ne contiennent ni message ni commentaire afin de s'assurer de la validité de la série.

Contrôle négatif

Le **CTM (-) C** doit produire un résultat « Target Not Detected ». Si le **CTM (-) C** reçoit un message d'alerte d'invalidité, alors tout le lot est invalide. Répéter tout le processus (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection). Si les valeurs **CTM (-) C** sont toujours non valides, contacter le bureau local de Roche pour obtenir une assistance technique.

Contrôles positifs

Le domaine théorique des réactifs **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** et **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** est spécifique pour chaque lot de réactifs et figure sur les codes-barres des cassettes de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Les nombres de cp/mL d'ARN du HIV-1 pour **HIV-1 L(+)**C**, v2.0** et **HIV-1 H(+)**C**, v2.0** doivent se situer dans leur domaine théorique. Si l'un et/ou l'autre des deux contrôles positifs ne satisfait pas à ces critères, la série entière est alors non valide. Répéter tout le processus (préparation des échantillons et des contrôles, amplification et détection). Si le titre d'ARN du HIV-1 de l'un et/ou l'autre des deux contrôles positifs se situe nettement hors du domaine théorique, contacter le bureau local de Roche pour obtenir une assistance technique.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

Comme pour le déroulement de tout test, de bonnes pratiques de laboratoire sont indispensables pour assurer la performance de ce test.

LIMITES DU TEST

1. Ce test a été validé exclusivement pour l'analyse de plasma humain prélevé sur l'anticoagulant EDTA. L'analyse de types d'échantillons différents de ceux du type indiqué peut aboutir à des résultats inexacts.
2. La performance du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 n'a été évaluée ni avec des échantillons contenant le HIV-1 du groupe N, ni avec des échantillons contenant le HIV-2.
3. Pour que les résultats obtenus soient fiables, les échantillons doivent avoir été prélevés, transportés, conservés et traités de façon appropriée.
4. La présence de l'enzyme AmpErase dans le Mélange réactionnel du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 réduit le risque de contamination par les amplicons. Cependant, une contamination par des contrôles ou par des échantillons cliniques HIV-1 positifs ne peut être évitée que par de bonnes pratiques de laboratoire et un respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice.
5. Seules les personnes formées aux techniques de PCR doivent utiliser ce produit.
6. Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'appareil COBAS® AmpliPrep et l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48.
7. Bien qu'il s'agisse d'un cas rare, des mutations au niveau des zones hautement conservées du génome viral couvertes par les amorces et/ou les sondes du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 risquent d'entraîner une sous-estimation de la quantification du virus ou l'échec de la détection du virus.
8. La détection de l'ARN du HIV-1 dépend du nombre de particules virales présentes dans l'échantillon et peut être affectée par les méthodes de collecte d'échantillons et les facteurs relatifs aux patients (par exemple, l'âge, la présence de symptômes et/ou le stade de l'infection). Si la spécificité clinique de ce test s'élève à 99,3 % (IC 95 % = 98,2 à 99,8 %), certains résultats faux positifs de faible concentration ont été notés chez les individus négatifs au HIV.
9. En raison des différences inhérentes à chaque technologie, il est recommandé aux utilisateurs, avant de passer d'une technologie à l'autre, de mener des études de corrélation de méthodes au sein de leur laboratoire afin de quantifier les différences entre les diverses technologies.

INTERFERENCES

Des taux élevés de triglycérides (jusqu'à 3 500 mg/dL), de bilirubine (jusqu'à 28 mg/dL), d'albumine (jusqu'à 8 900 mg/dL), d'hémoglobine (jusqu'à 900 mg/dL) et d'ADN humain (jusqu'à 0,4 mg/dL) dans les échantillons, de même que les maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (LES), l'arthrite rhumatoïde (AR) et les anticorps antinucléaires (ANA) n'ont pas présenté d'interférences avec la quantification de l'ARN du HIV-1 et n'ont pas affecté la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. L'évaluation a été effectuée conformément à la directive CLSI EP7-A2 en utilisant un lot de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Les composés médicamenteux suivants, testés à 3 fois le taux de plasma maximum (Cmax) n'ont pas perturbé la quantification de l'ARN du HIV-1 ou affecté la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 :

| Médicaments HIV : | |
|---|--|
| Inhibiteurs de la protéase Atazanavir Darunavir Fosamprenavir Lopinavir/Ritonavir Mézylate de nelfinavir Ritonavir Saquinavir Tipranavir | Inhibiteurs nucléosidiques analogues de la transcriptase inverse Sulfate d'abacavir Didanosine, ddl Emtricitabine Lamivudine, 3TC Stavudine, 4dT Tenofovir DF Zidovudine |
| Inhibiteur de l'intégrase Raltegravir | Inhibiteurs non nucléosidiques de transcriptase inverse Éfavirenz Névirapine |
| Inhibiteur d'entrée Maraviroc | Inhibiteurs de fusion Enfuvirtide |
| Médicaments HBV et/ou HCV : | |
| Équivalent nucléotidique Adefovir dipivoxil | Équivalent nucléosidique Entecavir Telbivudine |
| Modulateurs de l'immunité Peginterféron α -2a Peginterféron α -2b Ribavirine | |
| Composés pour le traitement du virus de l'herpès : | |
| Équivalent nucléotidique Aciclovir | Dérivé nucléotidique Ganciclovir Valganciclovir HCl |

ÉVALUATION DES PERFORMANCES NON CLINIQUES

Principales caractéristiques de performance pour les échantillons de plasma EDTA

A. Limite de détection

La limite de détection du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été déterminée par l'analyse du 2^e standard international de l'OMS pour l'ARN du HIV-1 (code NIBSC 97/650)⁴², HIV-1 sous-type B, dilué dans du plasma humain EDTA négatif au HIV-1. La limite de détection a été déterminée pour trois lots de réactifs. Trois séries de dilution ont été analysées pour chaque lot de réactif. Au total, près de 126 réplicats par niveau de concentration ont été testés. L'évaluation a été effectuée conformément à la directive EP17-A du CLSI.

La concentration en ARN du HIV-1 pouvant être détectée avec un taux de positivité supérieur à 95 %, comme déterminé par l'analyse PROBIT, est de 20 cp/mL ou 33 UI/mL. Les résultats pour les lots individuels étaient de 17,7 cp/mL (intervalle de confiance à 95 % : 13,7 – 26,9 cp/mL) pour le lot 1 ; 17,0 cp/mL (95 % d'intervalle de confiance : 14,0 – 22,6 cp/mL) pour le lot 2 et 14,2 cp/mL (95 % d'intervalle de confiance : 11,2 à 22,1 cp/mL) pour le lot 3. Les résultats combinés pour les trois lots de réactifs sont présentés dans le Tableau 3. **Le facteur de conversion entre UI/mL et cp/mL a été déterminé à l'aide du test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 et du test COBAS® TaqMan® HIV-1 à utiliser avec le système High Pure.**

Tableau 3
Limite de détection du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Entrée nominale (ARN du HIV-1 en UI/mL) | Entrée nominale (ARN du HIV-1 en cp/mL) | Nombre de réplicats | Nombre de positifs | Taux de positivité |
|---|---|--|--------------------|--------------------|
| 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 % |
| Taux de succès de 95 % pour PROBIT | | 27,5 UI/mL (intervalle de confiance à 95 % : 23,8 à 33,0 UI/mL) 16,5 cp/mL (intervalle de confiance à 95 % : 14,3 à 19,8 cp/mL) | | |

En outre, les dilutions de surnageants de culture de cellule représentant le HIV-1 du groupe M, sous-types A-H, dans le plasma humain EDTA HIV-1 négatif ont été analysées avec deux lots de réactifs. Pour chaque sous-type de HIV-1, plusieurs niveaux de concentration isolés (titres nominaux compris entre 10 et 75 cp/mL) ont été testés dans 24 réplicats par lot de réactifs. L'affectation de concentrations nominales aux matériaux de culture de cellules a été effectuée en calculant la moyenne des titres du test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, de l'analyse VERSANT® HIV-1 ARN 3.0 (bDNA) et de l'analyse Abbott RealTime HIV-1. L'analyse du taux de succès montre un taux de positivité supérieur à 95 % pour tous les sous-types à 20 cp/mL ou moins. Les résultats combinés pour les deux lots de réactifs sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4
Vérification de la limite de détection
pour le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Sous-type | Désignation de l'isolat | Niveau de concentration le plus faible Taux de succès ≥ 95 % (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. Précision

La précision du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été déterminée par l'analyse de dilutions en séries d'un échantillon de surnageants de culture de cellules du HIV-1 (HIV-1 sous-type B) dans du plasma humain EDTA négatif au HIV-1. L'affectation du titre des surnageants de culture de cellules (concentration de stock) a été réalisée par une méthode qui garantit la traçabilité avec la 1^{ère} norme internationale d'ARN du HIV-1 établie par l'OMS (Code NIBSC 97/656³⁶). Trois lots de réactifs ont été analysés et 15 analyses par lot de réactifs ont été effectuées, chacune consistant en 6 niveaux de dilution et 3 réplicats à chaque niveau. Chaque échantillon a été soumis à toutes les étapes du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (préparation de l'échantillon, amplification et détection). La précision indiquée plus bas prend donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats pour chaque lot de réactifs et pour les trois lots combinés de réactifs sont présentés dans le Tableau 5.

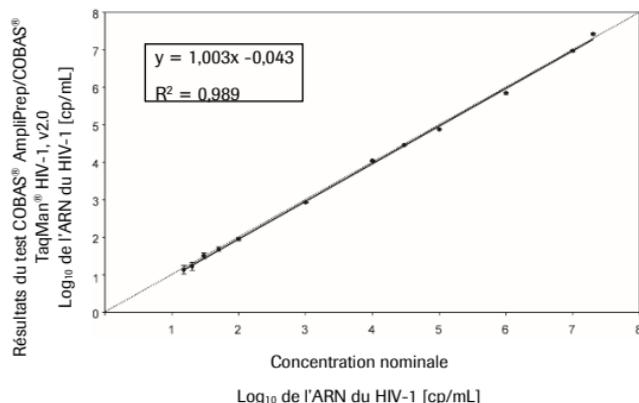
Tableau 5
Précision du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Titer (cp/mL) | Lot n° 1 | Lot n° 2 | Lot n° 3 | Trois lots combinés | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Écart-type total en log | Écart-type total en log | Écart-type total en log | Écart-type total en log | Total CV lognormal (%) |
| 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. Domaine de linéarité

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a présenté une réponse linéaire de 20 ($\log_{10} = 1,30$) cp/mL d'ARN du HIV-1 à $1,0E+07$ ($\log_{10} = 7,00$) cp/mL d'ARN du HIV-1. L'évaluation a été effectuée conformément à la directive CLSI EP6-A en utilisant deux lots de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et des dilutions en série d'un échantillon de surnageant de culture de cellules d'ARN du HIV-1 (+) de titre élevé. Deux lots de réactifs ont été analysés et 15 analyses par lot de réactifs ont été effectuées, chacune consistant en 12 niveaux de dilution et 3 réplicats à chaque niveau. Les résultats d'un lot de réactifs sont présentés dans la figure 18.

Figure 18
Linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



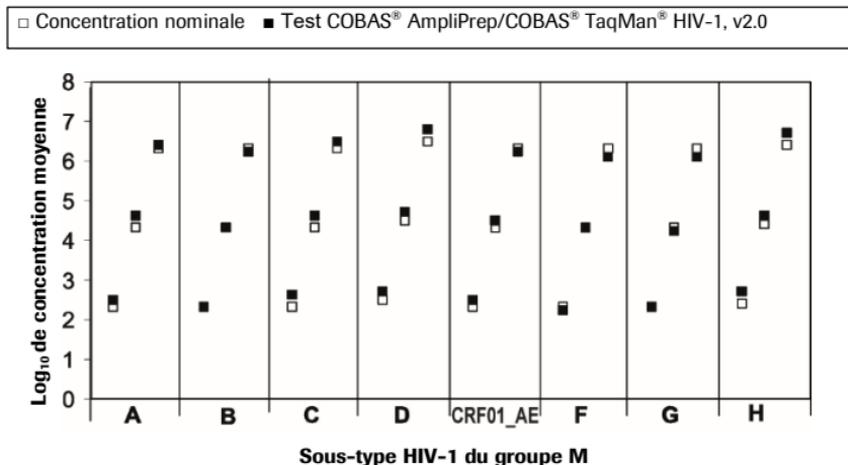
D. Inclusivité du HIV-1 de groupe M

Huit catégories de sous-types ont été proposées pour le groupe M du HIV-1 en fonction de la divergence des nucléotides. Ces sous-types sont désignés par des lettres majuscules de A à H⁴¹.

La performance du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 pour les sous-types du HIV-1 a été évaluée par analyse de matériel de stock de culture cellulaire de représentants de chaque sous-type A à H du groupe M du HIV-1. L'affectation de concentrations nominales aux matériaux de culture de cellules a été effectuée en calculant la moyenne des titres du test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, de l'analyse VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bdDNA) et de l'analyse Abbott RealTime HIV-1. Chaque matériel de stock culture cellulaire a été dilué à des concentrations nominales d'environ $2,00E+02$, $2,00E+04$ et $2,00E+06$ cp/mL dans le plasma EDTA. Les concentrations ont ensuite été analysées dans 10 réplicats par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 à l'aide d'un lot de réactifs. Les titres moyens \log_{10} de toutes les concentrations et de tous les sous-types ont été comparés à leurs titres nominaux \log_{10} respectifs.

L'évaluation des 8 sous-types isolés du HIV-1 par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a donné des résultats équivalents pour tous les représentants testés des sous-types du HIV-1 de groupe M (voir la figure 19). Les résultats moyens de concentration en \log_{10} observés pour tous les sous-types étaient égaux, à $\pm 0,3 \log_{10}$, à la concentration d'entrée assignée.

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

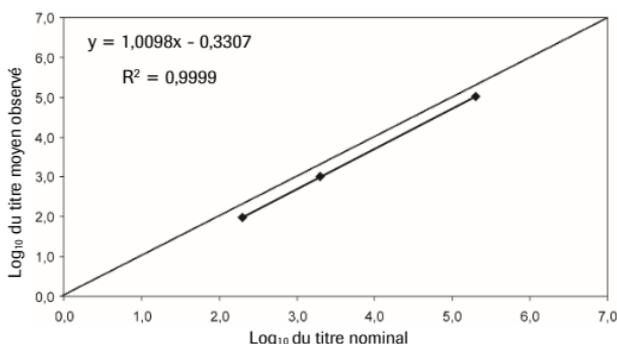


E. Détection du HIV-1 de groupe O

Les dilutions des surnageants de culture cellulaire de HIV-1 de groupe O (isolat MVP5180) dans le plasma humain EDTA ont été analysées avec deux lots de réactifs. Plusieurs niveaux de concentration (titres nominaux compris entre 10 et 75 cp/mL) ont été testés dans 24 répliquats par lot de réactifs. L'affectation de concentration nominale aux matériaux de culture de cellules a été réalisée par l'analyse Abbott RealTime HIV-1. L'analyse du taux de succès montre un taux de positivité supérieur à 95 % à 20 cp/mL.

Le matériel de stock de culture cellulaire du HIV-1 de groupe O a été dilué à des concentrations nominales d'environ 2,00E+02, 2,00E+03 et 2,00E+05 cp/mL dans le plasma EDTA. Les concentrations ont ensuite été analysées dans 10 répliquats par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 à l'aide d'un lot de réactifs. Les titres moyens log₁₀ de toutes les concentrations étaient linéaires et compris à ± 0,3 log₁₀ de leurs titres nominaux log₁₀ respectifs (voir la Figure 20).

Figure 20
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
Linéarité du sous-type O (MVP5180)



En outre, 10 matériaux de culture cellulaire et un échantillon patient dilué (11613) représentant le HIV-1 de groupe O ont été testés en parallèle grâce au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et à l'analyse Abbott RealTime HIV-1. Les 11 échantillons se sont révélés positifs dans le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (voir le Tableau 6). Les deux tests ont révélé un titre moyen \log_{10} à $\pm 0,1 \log_{10}$ pour les 11 échantillons.

Tableau 6
Reconnaissance des isolats du groupe O du HIV-1
par le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Désignation de l'isolat | Titre \log_{10} Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 | Titre \log_{10} Analyse Abbott RealTime HIV-1 |
|---|---|---|
| BBI PRD 301, BV-5050 | 3,09 | 2,42 |
| BBI PRD 301, BV-5051 | 2,86 | 3,35 |
| BBI PRD 301, BV-5003 | 3,00 | 2,71 |
| BBI PRD 301, BV-5024 | 2,87 | 2,69 |
| MVP5180 | 2,78 | 3,25 |
| HIV-1 CA-9 | 3,31 | 3,08 |
| BCF01 | 5,71 | 5,61 |
| BCF02 | 5,16 | 5,39 |
| BCF07 | 4,27 | 4,81 |
| BCF011 | 5,57 | 5,26 |
| 11613 | 2,97 | 2,05 |
| Titre moyen \log_{10} | 3,78 | 3,69 |

F. Spécificité

La spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été déterminée à l'aide de deux lots de réactifs par l'analyse d'échantillons de plasma EDTA HIV-1 négatif provenant de donneurs de sang. Au total, 660 échantillons individuels de plasma EDTA ont été testés. Tous les échantillons étaient négatifs pour l'ARN du HIV-1 du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Sur la base de ces résultats, la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 est de 100 % (avec une limite de confiance inférieure unilatérale à 95 % : $\geq 99,6$ %).

G. Spécificité analytique

La spécificité analytique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été évaluée en ajoutant des organismes de culture (virus, bactéries, levure) ou de l'ADN (HTLV-2) à une concentration d'entrée de $5E+04$ particules/mL à du plasma humain EDTA HIV-1 négatif et à du plasma humain EDTA HIV-1 positif à $1,5E+02$ cp/mL de HIV-1 (voir le Tableau 7).

Aucun des organismes testés n'a présenté d'interférences avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Les échantillons HIV-1 positifs ont présenté des résultats de titres à $\pm 0,5 \log_{10}$ d'un contrôle HIV-1 positif.

Tableau 7
Échantillons de spécificité analytique

| Virus | Bactéries |
|---|--------------------------------|
| <i>Adénovirus de type 5</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Cytomégalo virus</i> | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| <i>Virus d'Epstein-Barr</i> | |
| <i>Virus de l'herpès humain de type 6</i> | |
| <i>Virus de l'herpès simplex de type 1</i> | |
| <i>Virus de l'herpès simplex de type 2</i> | |
| <i>Virus lymphotropique à cellules T humain de type 1</i> | |
| <i>Virus lymphotropique à cellules T humain de type 2</i> | |
| <i>Influenza A</i> | |
| <i>Virus de l'hépatite A</i> | |
| <i>Virus de l'hépatite B</i> | |
| <i>Virus de l'hépatite C</i> | |

H. Corrélation de la méthode

Les performances du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ont été comparées au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 et à l'analyse Abbott RealTime HIV-1 en analysant 92 échantillons cliniques HIV-1 positifs recueillis de façon prospective et non dilués ainsi que 34 surnageants de culture de cellules dilués. Les échantillons comprenaient le HIV-1 du groupe M, sous-types A à H ainsi que les formes recombinantes circulantes du virus. Ils ont été analysés sur deux sites externes. Un total de 126 échantillons étendus dans le domaine de linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ont été testés au cours des quatre tests. Seules les paires de titres valides comprises dans les domaines de linéarité des deux analyses comparées ont été prises en compte pour l'analyse de régression linéaire (voir la figure 21 à la figure 23).

Figure 21

Corrélation du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

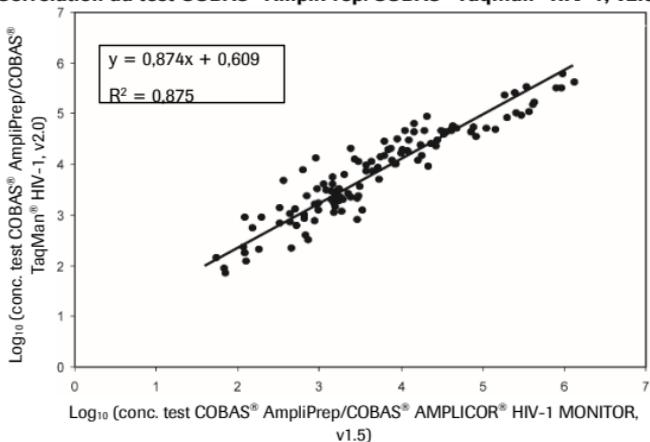


Figure 22

Corrélation du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

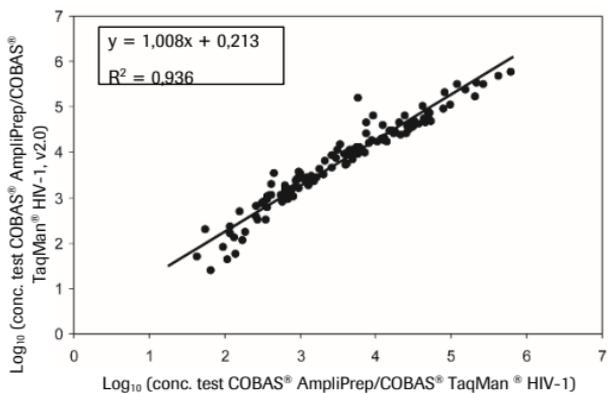
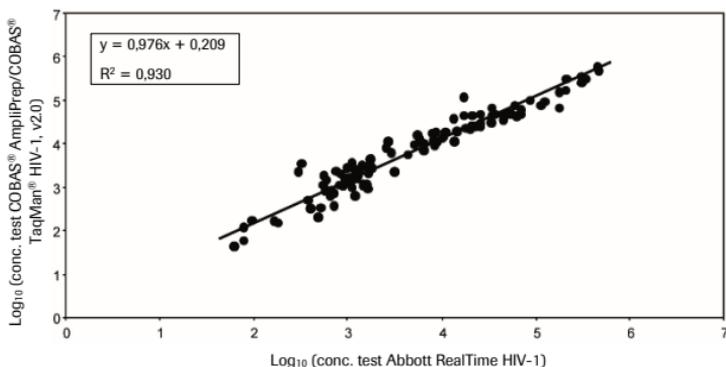


Figure 23
Corrélation du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0



I. Échec complet du système

Le taux d'échec complet du système pour deux lots de kit du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2 a été déterminé en testant 113 réplicats pour le lot 1 et 114 réplicats pour le lot 2 de plasma EDTA dopés avec le HIV-1, groupe M, sous-type B. Ces échantillons ont été testés à une concentration cible d'environ 3x la limite de détection (LoD). D'après les résultats combinés (lots 1 et 2) de cette étude, un réplicat a présenté un résultat négatif pour la cible HIV-1. Le taux d'échec complet du système est donc de 0,4 %.

Principales caractéristiques de performance pour les échantillons de spots de plasma séché sur PSC

A. Limite de détection dans le plasma à l'aide de la Plasma Separation Card

La limite de détection dans le plasma du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a été déterminée en analysant des titres plasmatiques attribués à des dilutions en série de surnageant de culture de cellules de HIV-1 du groupe M dans du sang total humain négatif au HIV. Des panels de cinq niveaux de concentration plus un niveau de concentration négatif ont été testés sur trois lots de **PSC** et trois lots de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments. Une partie du membre du panel le plus élevé a été centrifugée et un titre a été attribué au plasma par la méthode d'encadrement de calibrateurs (calibrator bracketing method, CBM) en utilisant le test **cobas**® HIV-1 (sur les **cobas**® 6800/8800 Systems) avec le 3^e standard international de l'OMS pour le HIV-1, HIV-1 groupe M, sous-type B, pour la préparation des calibrateurs supérieur et inférieur.

Les résultats obtenus pour la **PSC** sont indiqués au Tableau 8. L'étude démontre que le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, en association avec la **PSC** a détecté l'ARN du HIV-1 à une concentration de 737,9 cp/mL avec un taux de succès de 95 % tel que déterminé par l'analyse Probit.

Tableau 8
Limite de détection du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Concentration de titre plasmatique attribué du HIV-1 groupe M (cp/mL) | Nombre de réactifs | Nb de répliquats valides | % réactifs |
|---|---|--------------------------|------------|
| 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 % |
| Taux de succès de 95 % pour PROBIT | 737,9 cp/mL (intervalle de confiance à 95 % : 614,3 – 938,5 cp/mL) 1 230 UI/mL (1 023,8 – 1 564,2 UI/mL) | | |

Estimation de la LoD dans le sang total :

Les titres correspondants dans le sang total du même échantillon ne peuvent pas être déterminés avec exactitude dans la mesure où le sang total n'est pas un type d'échantillon utilisé pour la mesure de la charge virale. Les titres de sang total basés sur la quantité d'ARN du HIV-1 ajoutée dans des échantillons de sang total n'ont pas été utilisés pour estimer la LoD car la quantité d'ARN ajoutée ne correspond pas nécessairement à la quantité d'ARN dans le plasma. Même après centrifugation, l'ARN peut rester dans la couche leuco-plaquettaire ou associée à la fraction cellulaire du sang total. Néanmoins, comme les titres dans le sang total dopé ont été utilisés pour estimer la limite de détection dans le sang total d'autres technologies telles que les spots de sang séché, une estimation de la LoD dans le sang total **PSC** peut être obtenue en se fondant sur un facteur empirique que l'on suppose lié à la teneur moyenne en hématoците (45 %) des échantillons (Tableau 9).

Les valeurs de la LoD dans le sang total correspondent à des estimations basées sur la relation suivante :

estimation de la LoD dans le sang total = LoD dans le plasma **PSC** / 1,8

Tableau 9
Estimation de la LoD dans le sang total

| | |
|---|---------------------|
| Limite de détection par analyse PROBIT (taux de succès de 95 %) | 439,0 cp/mL |
| Intervalle de confiance à 95 % | 366,1 – 557,6 cp/mL |

B. Précision à l'aide de la Plasma Separation Card

La précision du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a été déterminée en analysant des dilutions en série d'un échantillon fortement positif au HIV-1 (échantillon de surnageants de culture de cellules positives pour l'ARN du HIV-1 de titre élevé) dans du sang total EDTA négatif au HIV. Cinq niveaux de dilution ont été testés en 48 réplicats pour chaque niveau et volume de traitement sur deux lots de **PSC** et deux lots de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 par deux opérateurs, sur deux systèmes CAP/CTM, pendant 12 jours. Chaque échantillon a été soumis à toutes les étapes de la procédure de travail **PSC** et du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Les résultats de précision indiqués plus bas prennent donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a obtenu une précision élevée pour les deux lots de **PSC** et de réactifs testés sur une plage de concentration de 7,38E+02 cp/mL à 1,00E+07 cp/mL.

Tableau 10
Précision en laboratoire du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
en association avec la PSC

| Concentration mesurée (cp/mL) | Matériel source | DS globale |
|-------------------------------|---------------------|------------|
| 6,31E+06 | Culture de cellules | 0,08 |
| 1,05E+06 | Culture de cellules | 0,09 |
| 1,02E+05 | Culture de cellules | 0,12 |
| 1,05E+04 | Culture de cellules | 0,19 |
| 2,29E+03 | Culture de cellules | 0,25 |

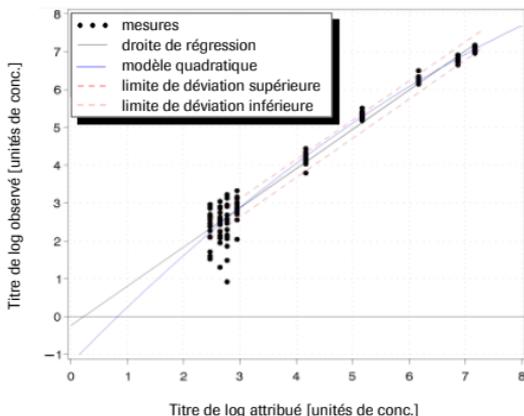
C. Domaine de linéarité à l'aide de la Plasma Separation Card

L'étude de linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a été effectuée avec une série de dilutions constituée de 9 membres de panel couvrant le domaine de linéarité pour le HIV-1, groupe M, sous-type B, prédominant. Les membres de panel ont été préparés à partir d'un échantillon de surnageants de culture de cellules positives pour l'ARN du HIV-1 de titre élevé. L'évaluation a été effectuée conformément à la directive EP06-A du CLSI²⁰. Deux lots de **PSC** et deux lots de réactifs ont été analysés sur deux systèmes CAP/CTM, par trois opérateurs, et sur un total de 20 réplicats par niveau de concentration.

Une partie d'un membre du panel a été centrifugée et un titre a été attribué au plasma par la méthode d'encadrement de calibrateurs (calibrator bracketing method, CBM) en utilisant le test **cobas**® HIV-1 (sur les **cobas**® 6800/8800 Systems) avec le 3e standard international de l'OMS pour le HIV-1, HIV-1 groupe M, sous-type B, pour la préparation des calibrateurs supérieur et inférieur.

En association avec la **PSC**, le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 est linéaire de 7,38E+02 cp/mL à 1,00E+07 cp/mL et présente une déviation absolue par rapport à la régression non linéaire de meilleur ajustement de moins de $\pm 0,16 \log_{10}$ avec la **PSC** (voir la Figure 24). Dans le domaine de linéarité, l'exactitude du test se situait à $\pm 0,3 \log_{10}$.

Figure 24
Linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
en association avec la PSC



D. Vérification des sous-types à l'aide de la Plasma Separation Card

Bien que le sous-type de HIV ne soit pas supposé altérer la performance de la **PSC**, des échantillons de HIV-1 mis en culture pour les sous-types communs HIV-1M (A, C et D) ont été dilués à un niveau de concentration dans du sang total. L'exactitude et la précision ont été déterminées en utilisant 12 réplicats par échantillon. Les tests ont été effectués avec 1 lot de **PSC** et 1 lot de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Chaque échantillon de sang total a été centrifugé et un titre a été attribué au plasma par la méthode d'encadrement de calibrateurs (calibrator bracketing method, CBM) en utilisant le test **cobas®** HIV-1 (sur les **cobas®** 6800/8800 Systems) avec le 3e standard international de l'OMS pour le HIV-1, HIV-1 groupe M, sous-type B, pour la préparation des calibrateurs supérieur et inférieur.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 11. Ces résultats confirment que le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a détecté le HIV pour HIV-1M (A, C et D) en association avec la **PSC**.

Tableau 11
Vérification des sous-types A, C et D du HIV-1 groupe M

| Sous-type du groupe M du HIV-1 | Nb de réplicats valides | Exactitude | Précision | Équivalence plasma et plasma séché sur PSC |
|--------------------------------|-------------------------|------------|-----------|--|
| Sous-type A | 12 | -0,02 | 0,09 | 0,17 |
| Sous-type C | 12 | 0,13 | 0,16 | 0,06 |
| Sous-type D | 12 | 0,07 | 0,15 | 0,05 |

E. Spécificité à l'aide de la Plasma Separation Card

La spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a été déterminée en analysant des échantillons de sang total EDTA négatifs au HIV issus de donateurs individuels. 160 échantillons de sang total EDTA individuels ont été testés avec deux lots de **PSC** et deux lots de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Un échantillon s'est avéré positif et 159 étaient négatifs pour l'ARN du HIV-1. Dans le panel de test, la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** était de 99,4 % (limite de confiance de 95 % : $\geq 97,07$ %).

F. Échec complet du système en utilisant la Plasma Separation Card

Le taux d'échec complet du système pour le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en association avec la **PSC** a été déterminé en testant 100 réplicats de sang total EDTA dopés avec le HIV-1, groupe M, sous-type B. Ces échantillons ont été testés à une concentration cible d'environ 3x la limite de détection (LoD). D'après les résultats de cette étude, aucun réplikat n'a présenté un résultat négatif pour la cible HIV-1. Le taux d'échec complet du système est donc de 0 %.

ÉVALUATION DES PERFORMANCES CLINIQUES

Principales caractéristiques de performance pour les échantillons de plasma EDTA

Reproductibilité

La reproductibilité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été évaluée dans du plasma EDTA à l'aide de 2 procédures de travail différentes (systèmes d'analyseur COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48). L'étude a été menée sur des panels constitués d'un stock viral en culture bien caractérisé HIV-1 groupe M, sous-type B et de plasma EDTA négatif à l'ARN du HIV-1 et aux anticorps HIV-1/2. Le panel couvrait le domaine de linéarité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ainsi que les principaux points de décision médicale pour l'usage prévu, décrits par les Directives de 2008 du ministère américain de la santé et des services aux personnes (Department of Health and Human Services) pour l'utilisation d'agents antirétroviraux chez les adultes et adolescents infectés par le HIV-1¹³. L'étude a été conçue pour évaluer les principales variables qui contribuent à la variation de la précision totale, notamment : lot, site/instrument, opérateur, jour/run et intra-run. Des analyses supplémentaires ont été menées pour comparer les caractéristiques de performance et la variabilité de la précision entre les deux procédures de travail. Sur chacun des 3 sites, deux opérateurs ont effectué 5 jours de tests avec chacun des 3 lots de kit de réactifs et chaque procédure de travail. Chaque run consistait en un ensemble de contrôles (1 fortement positif, 1 faiblement positif et 1 négatif) et un panel de 7 membres testé en triple (21 échantillons) sur l'appareil COBAS® AmpliPrep. Les échantillons et contrôles préparés ont été amplifiés et détectés sur l'analyseur COBAS® TaqMan® ou COBAS® TaqMan® 48.

La reproductibilité a été évaluée à l'aide d'un modèle à effets aléatoires avec des termes pour (a) lot, (b) site/instrument, (c) opérateur au sein du site/de l'instrument, (d) jour/run lié au lot, au site/instrument et à l'opérateur, et (e) composants intra-run aliquots, à l'aide de résultats PROC MIXED et transformés par \log_{10} . Le pourcentage de variabilité dû à chacun des composants et le coefficient de variation de la concentration d'ARN du HIV-1 transformé par \log_{10} ont été calculés. Seules les données comprises dans le domaine du dosage ($2,00E+01$ à $1,00E+07$ cp/mL) ont été étudiées.

Le Tableau 12 indique la variance de la précision totale et la déviation standard de la précision totale obtenues par le système d'analyseur COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® comme déterminé par l'analyse de la variance. D'une manière générale, les composants intra-run ont davantage contribué à la variabilité que les autres composants.

Tableau 12

Pourcentages attribuables de la variance totale, déviation standard de la précision totale, et CV log-normal de la concentration d'ARN du HIV-1 (\log_{10} cp/mL) des tests se trouvant dans la plage de dosage

| Concentration d'ARN du HIV-1 (\log_{10} cp/mL) | | | Contribution à la variance totale (%) | | | | | Précision totale |
|---|--------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------|----------|-----------|---|
| Attendue | Observée (moyenne) | Nb de tests valides ¹ | Lot | Site/Instrument | Opérateur | Jour/run | Intra-run | Déviation standard (CV log-normal en %) |
| 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 %) |

Remarque : les résultats situés dans la plage de dosage s'élevaient de 20 cp/mL à 1,00E+07 cp/mL (1,30 \log_{10} cp/mL à 7,00 \log_{10} cp/mL) inclus.

¹ Nombre de tests dans la plage de dosage.

Les résultats obtenus avec la procédure de travail du système COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 sont résumés dans le Tableau 13. D'une manière générale, le composant intra-run a davantage contribué à la variabilité que les autres composants, à l'exception du membre du panel au titre le plus élevé.

Tableau 13

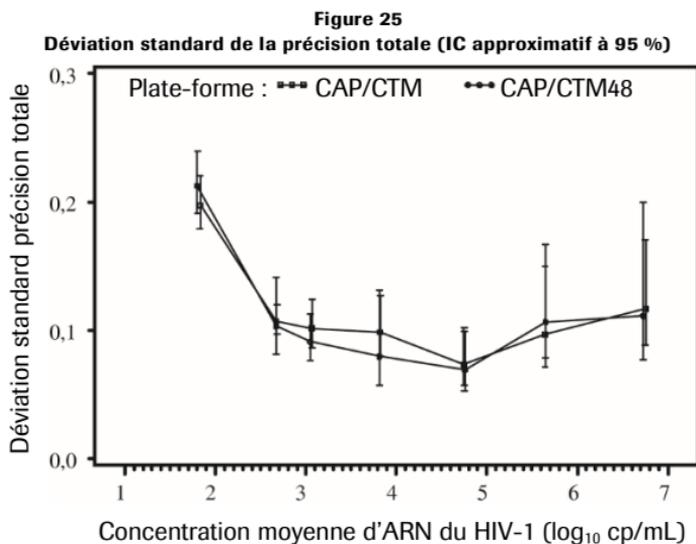
Pourcentages attribuables de la variance totale, déviation standard de la précision totale, et CV log-normal de la concentration d'ARN du HIV-1 (\log_{10} cp/mL) des tests se trouvant dans la plage de dosage

| Concentration d'ARN du HIV-1 (\log_{10} cp/mL) | | | Contribution à la variance totale (%) | | | | | Précision totale |
|---|--------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------|----------|-----------|---|
| Attendue | Observée (moyenne) | Nb de tests valides ¹ | Lot | Site/Instrument | Opérateur | Jour/run | Intra-run | Déviation standard (CV log-normal en %) |
| 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 %) |

Remarque : les résultats situés dans la plage de dosage s'élevaient de 20 cp/mL à 1,00E+07 cp/mL (1,30 \log_{10} cp/mL à 7,00 \log_{10} cp/mL) inclus.

¹ Nombre de tests dans la plage de dosage.

Les résultats affichés à la figure 25 indiquent le tracé de la déviation standard de la précision totale avec les intervalles de confiance approximatifs à 95 % correspondants en fonction des concentrations de l'ARN du HIV-1 \log_{10} moyennes. Ces résultats indiquent des performances de précision comparable entre les configurations des systèmes COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 (CAP/CTM48).



Remarque : l'IC approximatif à 95 % pour la déviation standard de la précision totale a été calculé à partir de la racine carrée des limites de l'IC à 95 % de la variance de la précision totale.

Sensibilité et spécificité cliniques et comparaison des méthodes

Méthodologie

L'objectif primaire de cette étude était d'évaluer la spécificité et la sensibilité cliniques du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 sur des échantillons de sujets négatifs au HIV et positifs au HIV-1. Les échantillons de plasma EDTA frais (jamais congelés) et les échantillons congelés ont été testés à chaque évaluation. Les objectifs secondaires étaient de comparer les résultats et d'évaluer les pourcentages de corrélation positive et les pourcentages de corrélation négative des résultats du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 à ceux obtenus avec les tests approuvés par la FDA, le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 et le test COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5.

La spécificité clinique a été évaluée avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en testant 148 échantillons frais (n'ayant jamais été congelés) et 418 échantillons congelés, recueillis sur des donneurs de sang négatifs aux anticorps HIV-1/2. La sensibilité clinique du test a été évaluée avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 en testant 117 échantillons frais et 301 échantillons congelés de plasma EDTA recueillis sur des sujets infectés au HIV-1 (les échantillons congelés avaient été répartis au hasard sur des sites de tests par catégorie de numération cellulaire CD4). Les résultats du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ont été comparés à ceux des tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 et COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5. Les tests ont été effectués sur 3 sites, avec 1 système COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® par site. Trois lots de réactifs du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 ont été utilisés.

Méthodes statistiques

Les échantillons frais et congelés des sujets négatifs au HIV et positifs au HIV-1 ont été testés avec les tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 et COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5. Les sujets négatifs au HIV étaient évaluable lors d'analyses statistiques de la spécificité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 s'ils généraient des résultats valides avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Les sujets positifs au HIV-1 étaient évaluable lors d'analyses statistiques de la sensibilité du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 s'ils généraient des résultats valides avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et que leurs résultats avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 étaient valides et dans le domaine de linéarité du test.

La spécificité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été calculée comme le pourcentage de sujets négatifs au HIV évaluable ayant obtenu des résultats « Target Not Detected » avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. L'intervalle de confiance (IC) exact à 95 % associé était également indiqué. La sensibilité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été calculée comme le pourcentage de sujets positifs au HIV-1 évaluable dont la charge virale du HIV-1 était détectable avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. L'intervalle de confiance (IC) exact à 95 % associé était également indiqué. La comparaison des méthodes a évalué les résultats du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 séparément avec deux plates-formes comparatives (tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 et COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5). Les pourcentages de corrélations positive et négative ont été calculés entre le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et chaque plate-forme comparative. Les résultats des échantillons appariés des sujets positifs au HIV-1 se trouvant dans le domaine de linéarité pour les tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 ont été comparés à l'aide d'un nuage de points et analysés avec la régression de Deming.

Résultats

Un total de 566 échantillons de patients négatifs au HIV et de 418 échantillons de patients positifs au HIV-1 évaluable ont été inclus dans les analyses de spécificité et de sensibilité cliniques. Environ 75 % des échantillons de patients avaient été congelés et 25 % étaient frais. La distribution spécifique de chaque plate-forme est résumée dans le Tableau 14.

Tableau 14
Sujets négatifs et positifs au HIV-1 évaluable par type d'échantillon

| Type d'échantillon | Échantillons négatifs au HIV | Échantillons positifs au HIV-1 |
|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Frais | 148 (26,1 %) | 117 (28,0 %) |
| Congelés | 418 (73,9 %) | 301 (72,0 %) |
| Total | 566 | 418 |

Les caractéristiques démographiques des 418 échantillons positifs au HIV-1 évaluable sont résumées au Tableau 15. Les numérations cellulaires CD4 des sujets étaient réparties presque uniformément dans les catégories de numération cellulaire CD4 (< 200, 200 à 500, > 500 cellules/ μ L). La plupart des sujets étaient des hommes (74,2 %) et étaient âgés de 30 à 49 ans (72,5 %). La distribution ethnique est comparable à celle observée chez la population atteinte de HIV-1 aux États-Unis³².

Tableau 15
Caractéristiques démographiques des sujets positifs au HIV-1 évaluable

| Caractéristique démographique | Catégorie | Sujets positifs au HIV-1 |
|---|-----------------------------|--------------------------|
| Général | Total | 418 |
| Numération cellulaire CD4 (cellules/μL) | < 200 | 130 (31,1 %) |
| | 200 - 500 | 152 (36,4 %) |
| | > 500 | 136 (32,5 %) |
| Type d'échantillon | Frais | 117 (28,0 %) |
| | Congelés | 301 (72,0 %) |
| Sexe | Homme | 310 (74,2 %) |
| | Femme | 108 (25,8 %) |
| Âge (ans) | 18 à 29 | 23 (5,5 %) |
| | 30 à 39 | 100 (23,9 %) |
| | 40 à 49 | 203 (48,6 %) |
| | 50 à 59 | 74 (17,7 %) |
| | \geq 60 | 18 (4,3 %) |
| Ethnie | Caucasiens | 129 (30,9 %) |
| | Hispaniques | 46 (11,0 %) |
| | Noirs | 223 (53,3 %) |
| | Insulaires d'Asie/Pacifique | 3 (0,7 %) |
| | Autres | 17 (4,1 %) |
| Sous traitement antirétroviral | Oui | 240 (57,4 %) |
| | Non | 178 (42,6 %) |

La spécificité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 (Tableau 16) était de 99,3 % (562/566 ; IC à 95 % = 98,2 % à 99,8 %), avec 4 échantillons classés comme faux positifs. Trois de ces échantillons étaient à < 20 cp/mL, au-dessous de la limite de quantification du dosage. Le dernier des 566 échantillons testés était dans le domaine de linéarité, mais avec un titre très faible (28,8 cp/mL). La spécificité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 était similaire pour les échantillons frais (99,3 % [147/148 ; IC à 95 % = 96,3 % à 100 %]) et congelés (99,3 % [415/418 ; IC à 95 % = 97,9 % à 99,9 %]).

Tableau 16
Spécificité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Groupe sujet | Test CAP/CTM HIV-1, v2.0 | | Total N | Spécificité clinique (IC exact à 95 %) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|---------|--|
| | Positifs | Négatifs | | |
| Négatif au HIV | 4 (0,7 %) | 562 (99,3 %) | 566 | 99,3 % (98,2 %, 99,8 %) |

La sensibilité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 a été définie comme le pourcentage de sujets positifs au HIV-1 évaluable dont le résultat au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 était positif. Elle est indiquée au Tableau 17. La sensibilité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 était de 100 % (418/418 ; IC à 95 % = 99,1 % à 100 %). Aucun sujet n'a présenté de résultats faux négatifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. La sensibilité clinique a été testée sur une population de patients atteints du HIV, représentative de la population des États-Unis en termes de sexe, d'âge, d'ethnie et d'exposition au traitement antirétroviral⁹⁹. Le test a démontré 100 % de sensibilité clinique indépendante des éléments démographiques listés ci-dessus, de la numération cellulaire CD4 ou du type d'échantillon (frais ou congelés).

Tableau 17
Sensibilité clinique du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

| Groupe sujet | Test CAP/CTM HIV-1, v2.0 | | Total N | Sensibilité clinique (IC exact à 95 %) |
|-------------------------|--------------------------|-----------|---------|--|
| | Positifs | Négatifs | | |
| Positif au HIV-1 | 418 (100,0 %) | 0 (0,0 %) | 418 | 100,0 % (99,1 %, 100,0 %) |

Comparaison des méthodes cliniques

Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 par rapport au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

La comparaison des résultats des tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 pour les 950 sujets admissibles à l'analyse est résumée au Tableau 18. Le pourcentage de corrélation positive du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 était de 99,5 % (427/429 ; IC à 95 % = 98,3 % à 99,9 %). Le pourcentage de corrélation négative du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 était de 98,1 % (511/521 ; IC à 95 % = 96,5 % à 99,1 %). 10 échantillons ont présenté des résultats positifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et négatifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Trois échantillons avaient un titre inférieur à la limite de quantification du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, ce qui reflète probablement l'augmentation de la sensibilité au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0. Trois échantillons ont présenté des résultats faux positifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 de sujets négatifs au HIV identifiés dans l'analyse de la spécificité clinique, à nouveau au-dessous de la limite de quantification. Quatre échantillons avaient des titres allant de 24,9 cp/mL à 158 cp/mL et reflètent probablement la variabilité connue associée à la quantification de titre faible.

Tableau 18
Comparaison entre les tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

| Test CAP/CTM HIV-1, v2.0 | Test CAP/CTM HIV-1 | | Total |
|--|----------------------------|----------------------------|-------|
| | Positifs | Négatifs | |
| Positifs | 427 | 10 | 437 |
| Négatifs | 2 | 511 | 513 |
| Total | 429 | 521 | 950 |
| Pourcentage de corrélation positive (IC exact 95 %) | 99,5 % (98,3 %, 99,9 %) | | |
| Pourcentage de corrélation négative (IC exact 95 %) | | 98,1 % (96,5 %, 99,1 %) | |

IC = intervalle de confiance ; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 ; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Remarque : les sujets négatifs au HIV et positifs au HIV-1 présentant des résultats valides pour les tests CAP/CTM HIV-1, v2.0 et CAP/CTM HIV-1 sont inclus dans ce tableau résumé.

Au total, 417 échantillons appariés positifs au HIV-1 ont présenté des résultats dans le domaine de linéarité des deux tests et étaient évaluable pour l'analyse de comparaison des méthodes. Le Tableau 19 indique la différence moyenne appariée et l'IC à 95 % pour le biais entre les tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1. Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 génère des titres plus élevés que le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, excepté aux limites supérieure ($> 5 \log_{10}$ cp/mL) et inférieure ($< 2 \log_{10}$ cp/mL) où les titres sont plus faibles (voir le tableau 19). Le biais systématique global est estimé à $0,2591 \log_{10}$ cp/mL.

Tableau 19
Différence moyenne appariée et l'IC à 95 % pour le biais entre les tests
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

| Nombre d'échantillons appariés positifs au HIV-1 dans le domaine de linéarité des deux tests = 417 | | |
|--|-----------------|-----------------|
| Différence moyenne (\log_{10} cp/mL) | Erreur standard | IC 95 % |
| 0,2591 | 0,0122 | (0,235 ; 0,283) |

IC = intervalle de confiance ; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 ; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Remarque : les sujets positifs au HIV-1 présentant des résultats valides pour les tests CAP/CTM HIV-1 et CAP/CTM HIV-1, v2.0 et situés dans l'intervalle de linéarité de chaque dosage sont inclus dans ce tableau résumé.

Les résultats de l'analyse de la régression de Deming entre les résultats des tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 pour les échantillons appariés positifs au HIV-1 dans le domaine de linéarité des deux dosages sont indiqués au Tableau 20 et représentés sous forme de graphique à la figure 26 (où la ligne en pointillé indique une corrélation parfaite entre les deux méthodes de tests, c.-à-d. $y = x$).

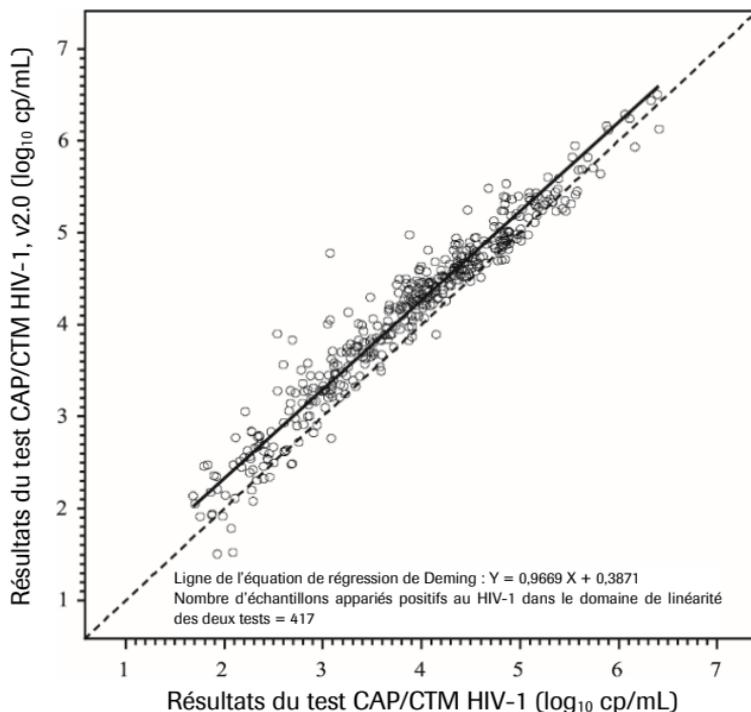
Tableau 20
Estimations de paramètres de l'analyse de la régression de Deming entre les tests
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0
et COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1

| Nombre d'échantillons appariés positifs au HIV-1 dans le domaine de linéarité des deux tests = 417 | | | | |
|---|--|------------------------|-----------------|----------------------|
| Paramètre | Estimation de paramètres log₁₀ cp/mL | Erreur standard | IC 95 % | r² |
| Ordonnée à l'origine | 0,3871 | 0,0488 | (0,291 ; 0,483) | 0,9375 |
| Pente | 0,9669 | 0,0122 | (0,943 ; 0,991) | |

IC = intervalle de confiance ; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 ; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Remarque : les sujets positifs au HIV-1 présentant des résultats valides pour les tests CAP/CTM HIV-1 et CAP/CTM HIV-1, v2.0 et situés dans l'intervalle de linéarité de chaque dosage sont inclus dans ce tableau résumé.

Figure 26
Analyse de la régression de Deming entre les tests
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1



Comparaison des tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

Le Tableau 21 indique la comparaison des résultats des tests COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et CA HIV-1 MONITOR, v1.5 pour 991 sujets admissibles à l'analyse. Le pourcentage de corrélation positive du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 concernant le test COBAS® AMPLICOR® (CA) HIV-1 MONITOR, v1.5 était de 100 % (419/419 ; IC à 95 % = 99,1 % à 100 %). Le pourcentage de corrélation négative du test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 concernant le test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 était de 97,4 % (557/572 ; IC à 95 % = 95,7 % à 98,5 %). Sur les 15 sujets ayant des résultats positifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 et des résultats négatifs au test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5, 4 ont présenté des résultats faux positifs au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 pour des sujets négatifs au HIV identifiés dans l'analyse de la spécificité clinique, encore une fois au-dessous de la limite de quantification. Onze étaient des sujets positifs au HIV-1 dont les résultats les plus bas au test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 étaient inférieurs à la limite de quantification et les plus élevés étaient de 223 cp/mL, et dont les résultats au test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 étaient négatifs.

Tableau 21
Comparaison des tests CAP/CTM HIV-1, v2.0 et
COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5

| Test CAP/CTM HIV-1, v2.0 | Test CA HIV-1 MONITOR, v1.5 | | Total |
|--|------------------------------|----------------------------|-------|
| | Positifs | Négatifs | |
| Positifs | 419 | 15 | 434 |
| Négatifs | 0 | 557 | 557 |
| Total | 419 | 572 | 991 |
| Pourcentage de corrélation positive (IC exact 95 %) | 100,0 % (99,1 %, 100,0 %) | | |
| Pourcentage de corrélation négative (IC exact 95 %) | | 97,4 % (95,7 %, 98,5 %) | |

IC = intervalle de confiance ; test CAP/CTM HIV-1 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 ; test CAP/CTM HIV-1, v2.0 = test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.

Remarque : les sujets négatifs au HIV et positifs au HIV-1 présentant des résultats valides pour les tests CAP/CTM HIV-1, v2.0 et CA HIV-1 MONITOR, v1.5 sont inclus dans ce tableau résumé.

Conclusion

Plasma EDTA

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 présente de forts coefficients de corrélation avec le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 en analyses quantitatives ($r^2 = 0.9375$) et en analyses de concordance (pourcentage de corrélation positive = 99,5 %, pourcentage de corrélation négative = 98,1 %). Il quantifie les échantillons cliniques à 0,2591 log₁₀ cp/mL de plus que le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, avec une quantification plus faible à la limite supérieure (> 5 log₁₀ cp/mL) et à la limite inférieure (< 2 log₁₀ cp/mL).

Le test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 présente également de forts coefficients de corrélation avec le test COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR, v1.5 en analyses de concordance (pourcentage de corrélation positive = 100,0 %, pourcentage de corrélation négative = 97,4 %).

Ces résultats de tests montrent l'utilité du test pour l'usage prévu, à savoir l'évaluation de la progression de la maladie et le suivi du traitement antirétroviral chez les patients infectés par le HIV-1.

Principales caractéristiques de performance pour les échantillons de spots de plasma séché sur PSC

Performance des échantillons de spots de plasma séché sur PSC comparée à celle des échantillons de plasma EDTA

La performance des échantillons de spots de plasma séché sur **PSC** a été comparée à celle d'échantillons de plasma EDTA centrifugés en analysant 325 échantillons issus de patients infectés par le HIV-1 et 2 échantillons de sang total négatifs au HIV dopés avec des surnageants de culture de cellules. L'analyse a porté sur 85 échantillons dont le titre pouvait être mesuré sur le plasma et sur **PSC**. Les échantillons comprenaient notamment des échantillons de HIV-1 M (PP = prélèvement prospectif par ponction veineuse et à partir de sang capillaire, CV = test de charge virale de routine, CD = échantillons restants de comptes de CD4+, ED = échantillons dopés) et un réplicat de chaque échantillon (**PSC** et plasma) ont été testés sur un site externe. Les titres inférieurs au domaine de quantification ont été exclus de l'analyse. La régression de Deming a été effectuée en tenant compte des titres après transformation de log.

Les résultats de la régression de Deming sont indiqués dans la Figure 27. Les symboles * et ● dans Figure 27 indiquent des déterminations uniques.

Figure 27
Régression de Deming

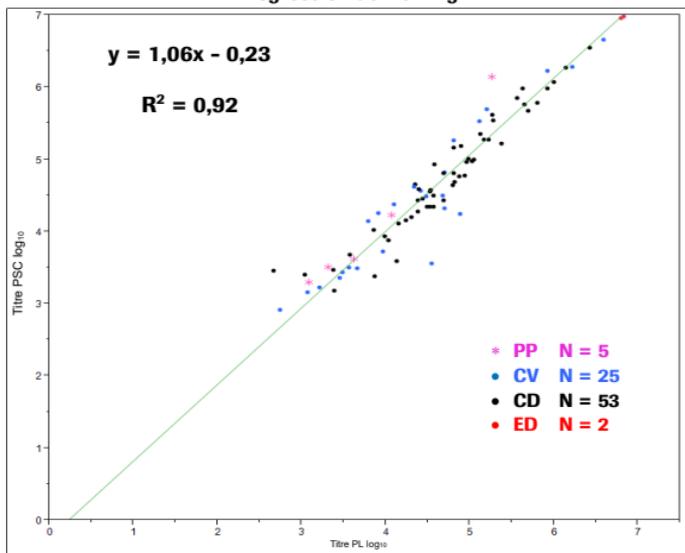


Tableau 22
Résumé des résultats pour l'équivalence des matrices

| Équivalence de la matrice (type de plasma) | Nombre d'échantillons avec un titre valide | Analyse de Bland-Altman | | Analyse de régression de Deming | | |
|--|--|---|-----------------------|---------------------------------|----------------------|---------|
| | | Log ₁₀ de différence moyenne | IC à 95 % [inf./sup.] | Pente | Ordonnée à l'origine | R-carré |
| PSC contre plasma liquide | 85 | 0,05 | [-0,01 ; 0,11] | 1,06 | -0,23 | 0,92 |

RÉFÉRENCES

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., Esinhardt, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* **334**:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* **174**:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* **174**:704-712.
22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* **170**:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknanan, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* **43**:177-187.
27. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection – Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. 2016.
28. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354.

29. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
30. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
31. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. 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. In: *Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*. eds. Persing, D.H., Smith, T.F., Smith, F.C., et al. ASM, Washington, D.C.
34. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
35. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. **10**:413-417.
36. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
37. Holmes, H., Davis, C., Heath, A., Hewlett, I. and Lelie, N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *Journal of Virological Methods* **92**:141-150.
38. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
40. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
41. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, and Korber B: HIV-1 Nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. In: *Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Kuiken C, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1999, pp. 492-505.
42. Davis, C., Berry, N., Heath, A. and Holmes, H. 2008. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sanguinis* **95**: 218-225.

Informations sur la révision du document

Doc Rev. 19.0
01/2022

Mise à jour de la référence à la fiche méthodologique **PSC** Method Sheet ms_09411763190 pour refléter le nouveau M/N de la Card **PSC**.

Mise à jour de la Figure 8 et de la Figure 9 dans un souci de conformité au document **PSC** ms_09411763190.

Insertion du symbole « Rx Only » sur la première page.

Ajout de la section **Assistance technique**.

Ajout d'une déclaration de lieu de fabrication.

Suppression de l'adresse des distributeurs.

Ajout de l'adresse de l'importateur.

Mise à jour de la section **Marques commerciales et brevets**.

Mise à jour de la page des symboles harmonisés.

Veillez contacter votre représentant local Roche si vous avez des questions.

Assistance technique

Pour bénéficier d'une assistance technique, merci de vous adresser à votre filiale locale :
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm



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

Fabriqué aux États-Unis



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marques commerciales et brevets

Ce produit est couvert par un ou plusieurs des brevets américains n° 8097717, 8192958 et 6727067, ainsi que par les brevets étrangers équivalents respectifs.

COBAS, COBAS P, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLIPREP, AMPLILINK et TAQMAN sont des marques commerciales de Roche.

La marque commerciale « Armored RNA® » est détenue par Asuragen, Inc. et Genetron Diagnostics, Ltd.

ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

THERMOMIXER® est une marque déposée d'Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne.

Tous les autres noms de produit et marques commerciales sont la propriété de leurs titulaires respectifs.

La technologie de prévention de contamination croisée de l'enzyme AmpErase® est couverte par le brevet américain n° 7,687,247 détenu par Life Technologies ; son exploitation sous licence a été cédée à Roche Molecular Systems, Inc.

Certains composants de ce produit sont protégés par un ou plusieurs brevets américains et leurs équivalents étrangers délivrés à Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. et concédés sous licence à Roche Molecular Systems, Inc. et F. Hoffman-La Roche Ltd.

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

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

01/2022

05328268001-19

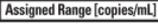
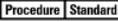
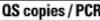
Doc Rev. 19.0



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Les symboles suivants sont utilisés dans toute la documentation accompagnant les produits de diagnostic par PCR de Roche.

| | | |
|---|--|---|
|  Age/DOB Âge ou date de naissance |  Dispositif non adapté aux tests à proximité du patient |  QS IU/PCR UI QS par réaction de PCR, utiliser les unités internationales (UI) QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats. |
|  SW Logiciel auxiliaire |  Dispositif non adapté à l'auto-test |  SN Numéro de série |
|  Assigned Range (copies/mL) Plage assignée (copies/mL) |  Distributeur <small>(Remarque : le pays/la région applicable peut être indiqué(e) sous le symbole.)</small> |  Site Site |
|  Assigned Range (IU/mL) Plage assignée (IU/mL) |  Ne pas réutiliser |  Procedure Standard Procédure standard |
|  EC REP Mandataire dans la Communauté européenne |  Femme |  STERILE EO Stérilisé à l'aide d'oxyde d'éthylène |
|  BARCODE Fiche technique à code-barres |  Pour évaluation des performances DIV uniquement |  Conserver dans un endroit sombre |
|  LOT Code du lot |  GTIN Code article international |  Limites de température |
|  Risques biologiques |  Importateur |  TDI Fichier de définition de tests |
|  REF Référence du catalogue |  IVD Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> |  Orienté vers le haut |
|  CE Marquage CE de conformité ; ce dispositif est conforme aux exigences en vigueur concernant le marquage CE d'un dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> |  LLR Limite inférieure de la plage assignée |  Procedure UltraSensitive Procédure ultrasensible |
|  Collect Date Date de collecte |  Fabricant |  UDI Identification de dispositif unique |
|  Consulter les instructions d'utilisation |  CONTROL - Contrôle négatif |  ULR Limite supérieure de la plage assignée |
|  Suffisant pour <n> tests |  Non stérile |  Urine Fill Line Ligne de remplissage d'urine |
|  CONTENT Contenu du kit |  ? Nom du patient |  Rx Only États-Unis uniquement : la législation fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux professionnels de santé autorisés à exercer. |
|  CONTROL Contrôle |  # Numéro patient | |
|  Date de fabrication |  Retirer ici | |
|  Dispositif pour tests à proximité du patient |  CONTROL + Contrôle positif |  Date limite d'utilisation |
|  Dispositif pour auto-test |  QS copies / PCR Copies QS par réaction de PCR, utiliser les copies QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats. | |