

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative

**Teste de ácidos nucleicos
para utilização com os cobas[®] 6800/8800 Systems**

Para diagnóstico in vitro

cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative	P/N: 07862113190
cobas[®] HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	P/N: 07862091190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190
cobas[®] Specimen Pre-Extraction Reagent	P/N: 08064695190

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Reagentes e materiais	7
Reagentes e controlos do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative.....	7
Reagentes cobas omni para preparação da amostra.....	10
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent.....	11
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes	12
Materiais adicionais necessários.....	13
Equipamentos e software necessários.....	14
Precauções e requisitos de manuseamento.....	14
Advertências e precauções	14
Manuseamento dos reagentes.....	15
Boas práticas de laboratório.....	16
Colheita, transporte e armazenamento de amostras.....	16
Amostras.....	16
Amostras de plasma EDTA e de soro	16
Gotas de sangue secas (DBS).....	17
Instruções de utilização	18
Notas de procedimento	18
Preparação de uma amostra de gota de sangue seca.....	18
Execução do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative.....	19
Resultados	20
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	20
Interpretação dos resultados.....	20
Limitações do procedimento	22

Avaliação não clínica do desempenho 23

Características principais de desempenho	23
Limite de detecção (LoD)	23
Reprodutibilidade	27
Verificação e inclusividade do grupo/subtipo	29
Especificidade	33
Painéis de seroconversão	33
Especificidade analítica	35
Especificidade analítica – substâncias interferentes.....	36
Correlação.....	37
Falha global do sistema	38
Contaminação cruzada	38

Informações adicionais 39

Características principais do teste.....	39
Símbolos	40
Fabricante e distribuidores.....	41
Marcas comerciais e patentes	41
Copyright.....	41
Bibliografia	42
Revisão do documento	43

Utilização prevista

O teste qualitativo de ácidos nucleicos **cobas**® HIV-1/HIV-2 para utilização com os **cobas**® 6800/8800 Systems é um teste *in vitro* de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção qualitativa e diferenciação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) do tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) em soro, plasma e gotas de sangue secas (DBS) de seres humanos.

O teste destina-se a ser utilizado como ajuda no diagnóstico do HIV-1/HIV-2. A detecção de ácidos nucleicos de HIV-1 ou de HIV-2 é indicativa de infecção pelo HIV-1 ou HIV-2, respetivamente. A presença de ácidos nucleicos de HIV-1 ou de HIV-2 no plasma ou soro de indivíduos sem anticorpos do HIV-1 ou do HIV-2 é indicativa de infecção aguda ou primária. Em crianças nascidas de mães infetadas com o HIV e que tenham anticorpos maternos do HIV-1 ou do HIV-2, a presença de ácidos nucleicos do HIV é indicativa da presença de uma infecção ativa. O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative também pode ser utilizado para confirmar infecção pelo HIV-1 ou HIV-2 num indivíduo com amostras reativas para antígenos ou anticorpos do HIV-1 ou do HIV-2.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).¹ O HIV-1 é a causa predominante da SIDA no mundo inteiro, com mais de 35 milhões de pessoas infetadas.² Após a infecção, os indivíduos infetados geralmente entram numa fase clinicamente estável e relativamente assintomática, que pode durar vários anos. Sem tratamento antirretroviral, os indivíduos geralmente evoluem para a SIDA, que se caracteriza pela diminuição de células CD4+ no sistema imunológico, pela suscetibilidade a infeções oportunistas e a eventual morte.³ O HIV-2, presente sobretudo na África Ocidental, também pode causar a SIDA. Presume-se que entre 1 e 2 milhões de pessoas estejam infetadas com o HIV-2 no mundo inteiro.

A distinção entre o HIV-1 e o HIV-2 é importante por várias razões: (1) O HIV-2 parece ser menos virulento que o HIV-1, com cargas virais mais baixas, uma taxa mais lenta de perda de células CD4+ e uma evolução mais lenta das infeções oportunistas; (2) as cargas virais do HIV-2 poderão ser incorretamente quantificadas por testes de carga viral do HIV-1; e (3) alguns medicamentos do HIV-1, principalmente os inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeos, não são eficientes contra o HIV-2.⁴ Também é possível a co-infecção com ambos os vírus HIV-1 e HIV-2. A co-infecção não tem efeitos óbvios na taxa de indivíduos que evoluem para a SIDA, mas complica a monitorização da carga viral e da terapia antirretroviral.⁴ Devido à importância em distinguir entre a infecção por HIV-1 e por HIV-2, as diretrizes nacionais e internacionais incluíram o diagnóstico e a diferenciação do HIV-1 e do HIV-2 como requisito para o diagnóstico adequado da infecção pelo HIV.^{5,6}

Fundamentos dos testes de PCR

Historicamente, os testes de HIV têm-se baseado na resposta de anticorpos que os pacientes produzem contra o vírus. Embora estes anticorpos sejam geralmente ineficazes no combate ao vírus, encontram-se na maioria dos pacientes infetados cronicamente. A principal limitação dos testes de anticorpos é o “período de janela” de várias semanas durante a infecção aguda, antes do começo de uma resposta de anticorpos detetável. Este “período de janela” foi diminuído com a “quarta geração” de testes de imuno-ensaios do HIV, que detetam o antígeno p24 do HIV assim como os anticorpos.⁷ No entanto, os testes de amplificação de ácidos nucleicos têm o potencial de reduzir ainda mais o “período de janela” dos testes de imuno-ensaios de quarta geração, devido à sensibilidade superior dos métodos de PCR relativamente a métodos de proteínas.⁷

Dependendo do risco de infecção por HIV na população a testar, a redução no “período de janela” dos testes de ácidos nucleicos pode ser importante tanto para o indivíduo como para a comunidade.⁸ Para um indivíduo, o diagnóstico do HIV durante a infecção aguda oferece a oportunidade de tratamento imediato, o que poderá potencialmente atrasar a evolução da doença, evitando danos do sistema imunitário e preservando respostas imunológicas celulares anti-HIV. O tratamento precoce também pode limitar o tamanho e a diversidade genética do reservatório viral que é estabelecido, tornando mais fácil a obtenção de uma cura funcional em pacientes tratados durante a infecção aguda. Para a comunidade, os pacientes com infecção aguda têm um papel muito importante na transmissão do HIV, porque estes pacientes geralmente têm cargas virais muito altas e desconhecem o seu estado de infecção. Identificar e tratar estes pacientes poderá ter um papel crítico no impedimento da propagação de uma epidemia de HIV.^{9,10} A PCR é já o padrão de cuidados para o diagnóstico do HIV em bebés, e a alta sensibilidade e especificidade da PCR permitem não só a deteção da infecção aguda em indivíduos de qualquer idade, como também a confirmação do diagnóstico de HIV em indivíduos seropositivos ou de serologia indeterminada.^{11,12}

Explicação do teste

O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative é um teste qualitativo que é executado no **cobas**® 6800 System e no **cobas**® 8800 System. O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative permite a deteção e discriminação simultâneas de ácidos nucleicos de HIV-1 e de HIV-2 em plasma EDTA, soro e DBS de doentes infetados. São utilizadas duas sondas para detetar o HIV-1, mas não para discriminar os subtipos do grupo M do HIV-1 e os grupos O e N do HIV-1. É utilizada uma terceira sonda para detetar o HIV-2, mas não para discriminar os grupos A e B do HIV-2.

Princípios do procedimento

O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative baseia-se na preparação totalmente automática de amostras (extração e purificação dos ácidos nucleicos) seguida de amplificação por PCR e deteção. Os **cobas**® 6800/8800 Systems são constituídos pelo módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. A gestão automática de dados é executada pelo software **cobas**® 6800/8800, que atribui resultados de teste a todos os testes, na forma de não reativos, reativos ou inválidos. Os resultados podem ser examinados diretamente no ecrã do sistema ou impressos como um relatório.

Os ácidos nucleicos de amostras de pacientes e as moléculas adicionadas de ARN protegido de controlo interno (CI), que servem como controlo do processo de preparação da amostra e de amplificação/deteção, são extraídos simultaneamente. Adicionalmente, o teste utiliza três controlos externos: dois controlos positivos e um controlo negativo. Em resumo, os ácidos nucleicos virais são libertados ao adicionar proteinase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos libertados ligam-se à superfície de sílica das partículas de vidro magnéticas adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR, são removidas com os posteriores passos com reagente de lavagem, e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas com tampão de eluição a alta temperatura.

A amplificação seletiva dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos do vírus-alvo que são selecionados de regiões altamente conservadas de genomas do HIV-1 e HIV-2. O gene gag do HIV-1, a região LTR do HIV-1 (alvo duplo do HIV-1) e a região LTR do HIV-2 são amplificados pelo **cobas**® HIV-1/HIV-2. A amplificação seletiva do CI é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos da sequência que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com os genomas do HIV-1 e do HIV-2. É utilizada uma enzima de polimerase do ADN termoestável para a transcrição reversa e para a amplificação por PCR. As sequências do alvo e do CI são amplificadas simultaneamente utilizando um perfil universal de amplificação por PCR com número de ciclos e passos de temperatura predefinidos. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no ADN acabado de sintetizar (amplicon).¹³⁻¹⁵ Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados durante o primeiro passo do ciclo térmico, pela enzima AmpErase, que é incluída na mistura principal da PCR. No entanto, os amplicons acabados de formar não são eliminados, uma vez que a enzima AmpErase fica inativa quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative contém duas sondas de deteção específicas para as sequências alvo do HIV-1, uma para sequências alvo do HIV-2 e uma para o CI. As sondas estão marcadas com corantes sinalizadores fluorescentes específicos do alvo, que permitem a deteção simultânea do alvo do HIV-1, alvo do HIV-2 e do CI em três canais alvo diferentes.^{16,17} Quando não ligado à sequência do alvo, o sinal fluorescente das sondas intactas é suprimido por um corante de supressão. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o ADN alvo específico, em cadeia simples resulta na sua clivagem pela atividade exonuclease 5' a 3' da polimerase do ADN, originando a separação dos corantes de sinalização e de supressão e a geração de um sinal fluorescente. Com cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas e o sinal cumulativo do corante reporter aumenta concomitantemente. A deteção e discriminação em tempo real dos produtos da PCR é conseguida medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores libertados dos alvos virais e do CI, respetivamente.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Todos os reagentes e controlos não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na Tabela 1 até à Tabela 5.

Tabela 1 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative		
Conservar entre 2 e 8 °C		
Cassete de 96 testes (P/N 07862113190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit 96 testes
Solução de proteinase (PASE)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém Subtilisina. Pode desencadear uma reação alérgica.	13 ml
Controlo interno (IC)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de estrutura de armored RNA de Controlo Interno (ARN não infeccioso encapsulado em bacteriófagos MS2), < 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida sódica	13 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	13 ml
Reagente 1 da Mistura Principal (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	5,5 ml
Reagente 2 da Mistura Principal HIV-1/HIV-2 (HIV-1/HIV-2 MMX-R2)	Tampão de tricina, acetato de potássio, 18% de sulfóxido de dimetilo, glicerol, Tween 20, EDTA, < 0,06% de dATP, dCTP, dGTP, < 0,14% de dUTP, < 0,01% de primers a jusante e a montante do HIV-1, do HIV-2 e do Controlo Interno, < 0,01% de sondas com marcação fluorescente para HIV-1 e HIV-2, < 0,01% de sonda com marcação fluorescente para o Controlo Interno, < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico, < 0,01% de polimerase do ADN Z05D, < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida sódica	6 ml

Tabela 2 cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit**cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit**

Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N 07862091190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo positivo do HIV-1 M/HIV-2 (HIV-1M/HIV-2 (+)C)	< 0,001% de ARN sintético (protegido) do HIV-1 grupo M, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, < 0,001% de ARN sintético (protegido) do HIV-2, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2; ARN do HIV-1 e ARN do HIV-2 não detetáveis por métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  ADVERTÊNCIA H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.
Controlo Positivo do HIV-1 O (HIV-1O (+)C)	< 0,001% de ARN sintético (protegido) do HIV-1 grupo O, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2; ARN do HIV-1 e ARN do HIV-2 não detetáveis por métodos de PCR. 0,1% de conservante ProClin® 300	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  ADVERTÊNCIA H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit**cobas® NHP Negative Control Kit**

Conservar entre 2 e 8 °C

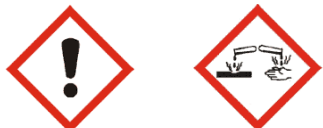
(P/N 07002220190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo negativo de plasma humano normal (NHP-NC)	Plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2; ARN do HIV-1 e ARN do HIV-2 não detetável por métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300	16 ml (16 x 1 ml)	  ADVERTÊNCIA H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280: Usar luvas de proteção. P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico. P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

Reagentes cobas omni para preparação da amostra

Tabela 4 Reagentes **cobas omni** para preparação da amostra*

Reagentes	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997546190)	Partículas de vidro magnéticas, Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	480 testes	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997511190)	Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	4 x 875 ml	Não aplicável
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997538190)	43% (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5% (p/v) de polidocanol***, 2% (p/v) de ditiotretol, citrato de sódio dihidratado	4 x 875 ml	 PERIGO H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H318: Provoca lesões oculares graves. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar proteção ocular/proteção facial. P304 + P340 + P312: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada. 593-84-0 tiocianato de guanidina 9002-92-0 polidocanol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservar entre 15 e 30 °C (P/N 06997503190)	Citrato de sódio dihidratado, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo	4,2 l	Não aplicável

* Estes reagentes não estão incluídos no kit do **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 10 e Tabela 11).

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

*** Substância perigosa

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Tabela 5 cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent*

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N 08064695190)

Reagente	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)	28% (p/p) de tiocianato de guanidina, 6% (p/v) de polidocanol, 1% (p/v) de ditioneitol, citrate de sodium dihydrate	600 ml (15 × 40 ml)	  PERIGO H302: Nocivo por ingestão. H318: Provoca lesões oculares graves. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P264: Lavar a pele cuidadosamente após o manuseamento. P270: Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar proteção ocular/proteção facial. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/ médico. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.

* Este reagente não está incluído no kit do **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative kit. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 10 e Tabela 11).

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 6 e Tabela 7. O **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER), utilizado no fluxo de trabalho DBS, deve ser armazenado e manuseado conforme especificado na Tabela 8 e Tabela 9.

Quando os reagentes não estiverem carregados nos **cobas**® 6800/8800 Systems, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 6.

Tabela 6 Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative	2 a 8 °C
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	2 a 8 °C
cobas ® NHP Negative Control Kit	2 a 8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2 a 8 °C
cobas omni MGP Reagent	2 a 8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2 a 8 °C
cobas omni Wash Reagent	15 a 30 °C

Os reagentes carregados nos **cobas**® 6800/8800 Systems são armazenados a temperaturas apropriadas e as datas de validade são controladas pelo sistema. Os **cobas**® 6800/8800 Systems apenas permitem que os reagentes sejam usados se as condições indicadas na Tabela 7 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 7 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos **cobas**® 6800/8800 Systems.

Tabela 7 Condições de manuseamento de reagentes impostas pelos **cobas**® 6800/8800 Systems

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento (tempo acumulado a bordo do equipamento fora do frigorífico)
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Data não ultrapassada	30 dias desde a primeira utilização	Máx. 10 corridas	Máx. 8 horas
cobas ® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 8 horas
cobas ® NHP Negative Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado nos **cobas**® 6800/8800 Systems.

Armazene o **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizado no fluxo de trabalho DBS) à temperatura correspondente especificada na Tabela 8.

Tabela 8 Armazenamento do **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	2 a 8 °C

O **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent mantém-se estável até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez aberto, este reagente mantém-se estável durante 30 dias quando armazenado entre 2 e 8 °C, incluindo 13 horas acumuladas a 30 °C ou até ao fim do prazo de validade, o que ocorrer primeiro, conforme especificado na Tabela 9.

Tabela 9 Condições de manuseamento do **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a 30 °C fora do frigorífico (tempo acumulado)
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde a primeira utilização	Não aplicável	Máx. 13 horas

Materiais adicionais necessários

Tabela 10 Materiais e consumíveis para utilizar nos **cobas®** 6800/8800 Systems

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Saco de resíduos sólidos	07435967001
Reservatório de resíduos sólidos	07094361001

Tabela 11 Outros materiais e consumíveis necessários apenas para a aplicação DBS

Materiais
Papel de filtro Whatman 903®, cartão de colheita de amostra Munktel TFN ou equivalente (diâmetro da gota 12 a 13 mm)
Tubos, 5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno (tubos Cryo.s™) com tampas
Eppendorf Thermomixer (por exemplo, modelo R 5355 ou equivalente) com Thermoblock para 24 tubos cryo
Pinça ou tenaz esterilizada descartável
Sacos reseláveis e saquetas dessecantes (para o armazenamento de DBS)

Equipamentos e software necessários

O software **cobas**® 6800/8800 software e o(s) pacote(s) de análise **cobas**® HIV-1/HIV-2 (o pacote de análise **cobas**® HIV-1/2 Qual-Serum/Plasma e/ou o pacote de análise **cobas**® HIV-1/2 Qual-DBS), serão instalados no(s) equipamento(s). O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema.

Tabela 12 Equipamentos

Equipamento	P/N
cobas ® 6800 System (Opção Móvel)	05524245001 e 06379672001
cobas ® 6800 System (Fixo)	05524245001 e 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001

Para mais informações sobre os tubos primários e secundários aceitos nos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas**® 6800/8800 Systems.

Nota: contate o representante local da Roche para uma lista de pedidos detalhada de racks de amostras, racks de pontas obstruídas e suportes de racks aceitos nos equipamentos.

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste teste. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative não foi avaliado para utilização como teste de rastreio para a presença de HIV-1/HIV-2 em sangue ou em produtos sanguíneos.
- Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando boas práticas de laboratório, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no Documento M29-A4 do CLSI.^{18,19} Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de material com risco biológico e na utilização do **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative e dos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com as precauções universais. Se ocorrer derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados.
 - Se ocorrer derrame de amostra DBS no **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (que contém tiocianato de guanidina), não deixe que entre em contacto com desinfetantes que contém hipoclorito de sódio, como a lixívia. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit e o **cobas**® NHP Negative Control Kit contém plasma derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes aprovados de anticorpos e considerado como não-reativo para a presença de anticorpos dos HIV-1/2. Os testes de plasma humano normal por métodos de PCR não apresentaram quaisquer ARN do HIV-1 (grupos M e O) e ARN do HIV-2 detetáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.

- Não congele sangue total ou quaisquer amostras armazenadas em tubos primários.
- O cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent é sensível à luz e é fornecido em frascos com proteção contra a luz.
- Para garantir o desempenho ideal do teste, utilize apenas os materiais consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos. Qualquer desvio dos procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se durante a manipulação e processamento das amostras, o carryover das amostras não for controlado adequadamente.

Manuseamento dos reagentes

- Para evitar carryover de amostras ou controles, manipule todos os reagentes, controles e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeção visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise, reagente de lavagem e o cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (necessário apenas para a aplicação DBS), antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de fuga, não utilize esse material para testes.
- O reagente de lise **cobas omni** e o cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent contém tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras.
- Os kits **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative**, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contém azida sódica como conservante. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Não permita que o reagente de lise **cobas omni** e o cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent, que contém tiocianato de guanidina, entrem em contacto com solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com amostras e reagentes, de acordo com regulamentações nacionais, estaduais e locais.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular quando manusear amostras e reagentes. Para evitar contaminação, as luvas devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento de kits **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e reagentes **cobas omni**. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controles.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit, e depois de retirar as luvas.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução recém-preparada de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). A seguir, limpe a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrer um derrame nos **cobas® 6800/8800 Systems**, siga as instruções do Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800 Systems**, para limpar e descontaminar adequadamente as superfícies do(s) equipamento(s).

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Nota: Manuseie todas as amostras e controles tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

Armazene todas as amostras às temperaturas especificadas.

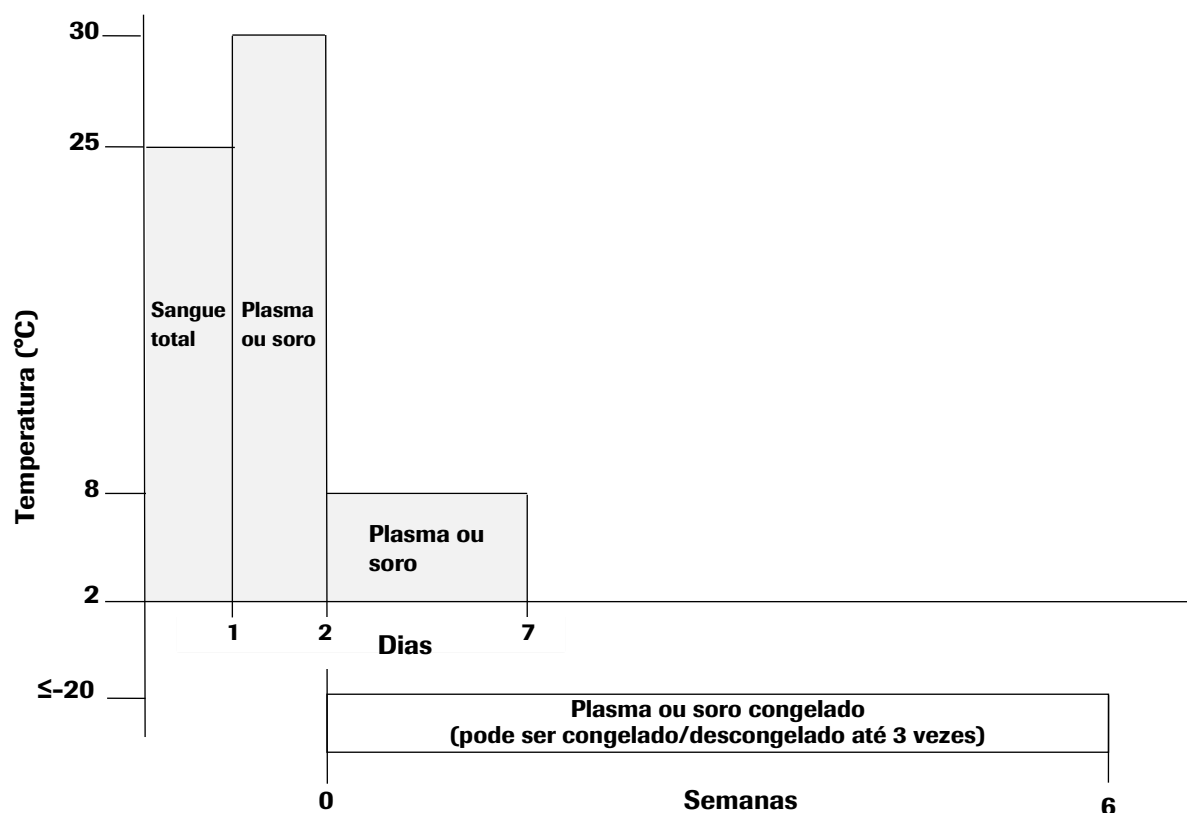
A estabilidade das amostras é afetada por altas temperaturas.

Se utilizar amostras congeladas em tubos secundários, coloque as amostras à temperatura ambiente (entre 15 e 30 °C) até ficarem completamente descongeladas e, em seguida, misture rapidamente (por ex., com agitação forte durante 3 a 5 segundos) e centrifugue para colher todo o volume de amostra no fundo do tubo.

Amostras

Amostras de plasma EDTA e de soro

- O sangue deve ser colhido em tubos de separação de soro SST™, em tubos de preparação de plasma para métodos de teste de diagnóstico molecular BD Vacutainer® PPT™ ou em tubos esterilizados que utilizem EDTA como anticoagulante. Siga as instruções do fabricante dos tubos de amostra.
- O sangue total colhido em tubos de separação de soro SST™, em tubos de preparação de plasma para métodos de teste de diagnóstico molecular BD Vacutainer® PPT™ ou em tubos esterilizados que utilizem EDTA como anticoagulante, pode ser armazenado e/ou transportado durante até 24 horas a entre 2 °C e 25 °C antes da preparação do plasma ou soro. A centrifugação deve ser desempenhada de acordo com as instruções do fabricante.
- Após a separação, as amostras de plasma EDTA ou de soro podem ser armazenadas em tubos secundários durante até 24 horas a 30 °C seguido de até 5 dias entre 2 °C e 8 °C ou até 6 semanas a uma temperatura ≤ -20 °C. Para armazenamento a longo prazo, recomendam-se temperaturas ≤ -60 °C.
- As amostras de plasma mantêm-se estáveis até 3 ciclos de congelamento/descongelamento a uma temperatura ≤ -20 °C.
- Consulte a Figura 1 para as condições de armazenamento de amostras.

Figura 1 Condições de armazenamento de amostras de sangue total, plasma e soro

- Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

Gotas de sangue secas (DBS)

- Colha amostras de DBS utilizando procedimentos clínicos apropriados.
- Recomenda-se que aplique um mínimo de 70 µl de sangue capilar dentro do círculo delineado no papel de filtro de DBS.
- Certifique-se de que AMBOS os lados do papel estão saturados e o círculo delineado completamente cheio.
- Permita que a DBS seque à temperatura ambiente (18 a 25 °C) durante pelo menos 3 horas, protegendo o papel de filtro de DBS da luz direta do sol.
- Para mais detalhes, consulte o folheto informativo dos papéis de filtro utilizados.
- Recomenda-se que prepare pelo menos 3 discos de papel por amostra de paciente.
- Guarde as DBS em sacos resseláveis individuais com uma saqueta dessecante em cada saco.
- A DBS pode ser transportada ou armazenada entre 15 e 30 °C durante até 3 meses.
- Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

Instruções de utilização

Notas de procedimento

- Não utilize reagentes **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative, **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit, **cobas®** NHP Negative Control Kit, reagentes **cobas omni** ou **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent depois de expirados os respectivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas®** 6800/8800 Systems.

Preparação de uma amostra de gota de sangue seca

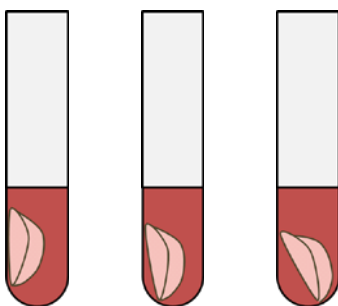
- Deixe o **cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER) equilibrar à temperatura ambiente antes de utilizar.
- Remova uma DBS de um papel de filtro de DBS.
- Transfira a DBS para um tubo (5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno [tubo Cryo.s™]) utilizando uma pinça ou tenaz esterilizada descartável.
- Certifique-se de que a DBS fica localizada no fundo do tubo, conforme indicado na Figura 2.
- Pipete 1150 µl de SPER para o tubo que contém a DBS e coloque uma tampa no tubo.
- Certifique-se de que a DBS está completamente coberta de SPER.
- Coloque os tubos nas posições 1 a 24 num Eppendorf Thermomixer pré-aquecido (por exemplo, modelo R 5355 ou equivalente) com Thermoblock para 24 tubos cryo e incube durante 10 minutos a 56 °C e 1000 rpm para extrair o vírus do sangue total seco.
- Retire a tampa aos tubos e certifique-se de que a DBS está fixa à parede do tubo (Figura 3) para evitar coágulos de amostra.
- Elimine qualquer possível película líquida localizada acima do nível do líquido (Figura 4) utilizando uma ponta de pipeta esterilizada (para evitar detecção de nível prematura).
- Transfira os tubos para os **cobas®** 6800/8800 Systems.

Figura 2 DBS no tubo



Válido

Figura 3 Localização da DBS

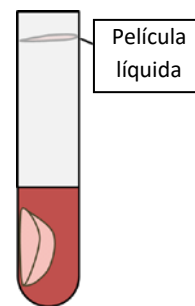


Válido

Válido

Risco
potencial de
coágulo

Figura 4 Película líquida

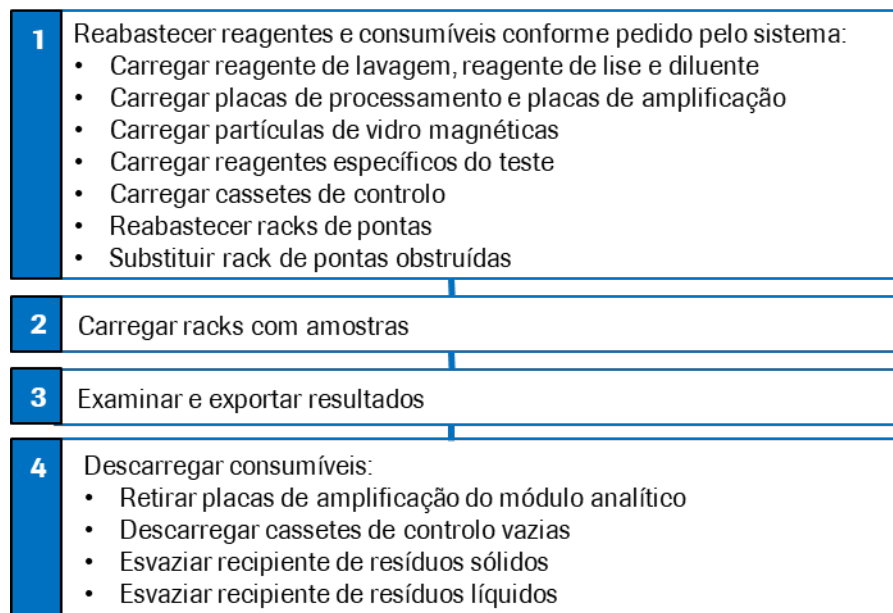


Risco potencial de detecção
de nível prematura

Execução do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

O cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative pode ser executado com um volume mínimo obrigatório de amostra de 650 µl (para o fluxo de trabalho de 500 µl de amostra de soro ou plasma) ou 1150 µl de cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (para o fluxo de trabalho de 850 µl de amostra de DBS). Tenha em atenção que as amostras de DBS não podem ser executadas em modo de batch misto com amostras de plasma ou soro. O procedimento de teste é descrito detalhadamente no Manual do Operador dos cobas® 6800/8800 Systems. A Figura 5 a seguir resume o procedimento.

Figura 5 Procedimento de teste do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative



Resultados

Os cobas® 6800/8800 Systems detetam e discriminam automaticamente o HIV-1 e o HIV-2 de amostras e de controlos simultaneamente, indicando a validade do teste, os resultados globais, assim como os resultados individuais dos alvos.

Controlo de qualidade e validade dos resultados

- Com cada batch, são processados um controlo negativo de plasma humano normal [(-) C] e dois controlos positivos [HIV-1M/HIV-2 (+)C e HIV-1O (+)C].
- No software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios, verifique os alarmes e os resultados associados, para se certificar da validade do batch.
- O batch é válido se não aparecer nenhum alarme para os três controlos.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software cobas® 6800/8800, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

Alarmes de controlos

Tabela 13 Alarmes de controlos negativos e positivos

Controlo negativo	Alarme	Resultado	Interpretação
(-) C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Se o resultado do (-) C for inválido, todo o batch é considerado inválido.
Controlo positivo	Alarme	Resultado	Interpretação
HIV-1M/HIV-2 (+)C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Se o resultado do HIV-1M/HIV-2 (+)C for inválido, todo o batch é considerado inválido.
HIV-1O (+)C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Se o resultado do HIV-1O (+)C for inválido, todo o batch é considerado inválido.

Se o batch for inválido, repita os testes de todo o batch, incluindo todas as amostras e controlos.

HIV-1M/HIV-2 (+) C significa controlo positivo cobas® HIV-1M/HIV-2 e HIV-1O (+) C significa controlo positivo cobas® HIV-1O no software cobas® 6800/8800.

Interpretação dos resultados

Para um batch válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido pode incluir resultados válidos e inválidos.
- As amostras estão assinaladas com “Yes” na coluna “Válido” se todos os resultados dos alvos pedidos indicaram resultados válidos. As amostras assinaladas com “No” na coluna “Válido” podem necessitar de interpretação e ação adicionais.

- Os valores na coluna “Resultado geral” para amostras individuais podem ser interpretados como se segue:
 - Reactive – Todos os resultados pedidos são reativos ou um dos resultados pedidos é reativo e os outros são não reativos
 - Non-Reactive – Todos os resultados pedidos são não reativos
 - Invalid – Pelo menos um resultado pedido é inválido
- Os resultados alvo indicados de amostras individuais são válidos, salvo indicação em contrário.

A Tabela 14 apresenta os resultados da detecção do HIV-1 e do HIV-2 e a respetiva interpretação.

Tabela 14 Interpretação de resultados individuais, para os resultados alvo

Válido	Resultado geral	Alvo 1	Alvo 2	Interpretação
Sim	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Reactive	Todos os resultados pedidos são válidos. Sinal alvo detetado relativamente a HIV-1 e HIV-2.
Sim	Reactive	HIV-1 Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Todos os resultados pedidos são válidos. Sinal alvo detetado relativamente a HIV-1. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a HIV-2.
Sim	Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Reactive	Todos os resultados pedidos são válidos. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a HIV-1. Sinal alvo detetado relativamente a HIV-2.
Sim	Non-Reactive	HIV-1 Non-Reactive	HIV-2 Non-Reactive	Todos os resultados pedidos são válidos. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a HIV-1 ou HIV-2.
Não	Invalid	HIV-1 Reactive	Invalid	Nem todos os resultados pedidos são válidos. Sinal alvo detetado relativamente a HIV-1. O resultado de HIV-2 é inválido. A amostra original deverá ser testada novamente para se obter resultados válidos relativamente a HIV-2. Se o resultado ainda for inválido, deverá ser obtida uma nova amostra.
Não	Invalid	Invalid	HIV-2 Reactive	Nem todos os resultados pedidos são válidos. Sinal alvo detetado relativamente a HIV-2. O resultado de HIV-1 é inválido. A amostra original deverá ser testada novamente para se obter resultados válidos relativamente a HIV-1. Se o resultado ainda for inválido, deverá ser obtida uma nova amostra.
Não	Invalid	HIV-1 Non-Reactive	Invalid	Nem todos os resultados pedidos são válidos. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a HIV-1. O resultado de HIV-2 é inválido. A amostra original deverá ser testada novamente para se obter resultados válidos relativamente a HIV-2. Se o resultado ainda for inválido, deverá ser obtida uma nova amostra.
Não	Invalid	Invalid	HIV-2 Non-Reactive	Nem todos os resultados pedidos são válidos. Nenhum sinal alvo detetado relativamente a HIV-2. O resultado de HIV-1 é inválido. A amostra original deverá ser testada novamente para se obter resultados válidos relativamente a HIV-1. Se o resultado ainda for inválido, deverá ser obtida uma nova amostra.
Não	Invalid	Invalid	Invalid	Os resultados de HIV-1 e HIV-2 são ambos inválidos. A amostra original deverá ser novamente testada para se obterem resultados válidos relativamente a HIV-1 e HIV-2. Se os resultados ainda forem inválidos, deverá ser obtida uma nova amostra.

Limitações do procedimento

- O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative Control Kit, o **cobas**® NHP Negative Control Kit, o **cobas omni** MGP Reagent, o **cobas omni** Lysis Reagent, o **cobas omni** Specimen Diluent, o **cobas omni** Wash Reagent e o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (utilizado no fluxo de trabalho de gotas de sangue secas) para utilização nos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- A detecção de ácidos nucleicos de HIV-1 e HIV-2 depende do número de partículas virais presentes na amostra e pode ser afetada pelos métodos de colheita de amostra, armazenamento e manuseamento, por fatores inerentes ao próprio doente (por ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou o estadio da infeção.
- Embora raras, as mutações dentro das regiões altamente conservadas de um genoma viral abrangidas pelo **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative podem afetar a ligação de primers e/ou sonda, resultando na não detecção da presença do vírus.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas. Os utilizadores deverão seguir os seus próprios procedimentos específicos e políticas específicas.
- O **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative não se destina a ser utilizado como teste de rastreio para a presença de HIV-1/HIV-2 em sangue ou em produtos sanguíneos.

Avaliação não clínica do desempenho

Características principais de desempenho

Limite de detecção (LoD)

Padrões internacionais da OMS/Padrões primários da Roche

O limite de detecção do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi determinado utilizando os seguintes padrões:

- 3º Padrão Internacional da OMS para o ARN do HIV-1 grupo M (código NIBSC 10/152) para amostras de plasma EDTA, soro e de DBS
- Padrão Internacional da OMS para o ARN do HIV-2 (código NIBSC 08/150) para amostras de plasma e soro
- Padrões Primários da Roche para o ARN do HIV-2 para amostras de DBS
- Padrões Primários da Roche para o ARN do HIV-1 grupo O para amostras de plasma EDTA e soro

Nenhum padrão internacional está atualmente disponível para o ARN do HIV-1 grupo O. O padrão da Roche para o ARN do HIV-1 grupo O é comparável com o CBER HIV-1 Subtype RNA Reference Panel #1 Lote 01. Os Padrões Primários da Roche para o ARN do HIV-1 grupo O são derivados de stocks de vírus em cultura, disponíveis no mercado, P/N 2420 (Nº. Ref. 500493, SeraCare Life Sciences). O padrão da Roche para o ARN do HIV-2 é comparável com o Padrão Internacional da OMS para o ARN do HIV-2 (código NIBSC 08/150). Os Padrões Primários da Roche para o ARN do HIV-2 são derivados de stocks de vírus em cultura, disponíveis no mercado, P/N HIV-2 NIH-Z (Nº. Ref. 10-27-000, Applied Biotechnologies, Inc.). Uma cópia do ARN do HIV-1 é equivalente a 1,7 unidades internacionais (UI) e uma cópia do ARN do HIV-2 é equivalente a 0,2 UI.

Foram preparadas diluições em série dos padrões em sangue total para DBS, soro e plasma EDTA humano, negativos para o HIV. Foram testados painéis de cinco ou seis níveis de concentração e ainda uma amostra negativa com três lotes de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative em múltiplas corridas, dias, operadores e equipamentos.

Para cada vírus, foi utilizada a análise PROBIT 95% nos dados combinados das diferentes séries de diluições e dos lotes de reagente para calcular o LoD, juntamente com os limites inferior e superior do intervalo de confiança (IC) de 95% (Tabela 15). As taxas de reatividade observadas nos estudos do LoD para cada vírus estão resumidas na Tabela 16 até à Tabela 18.

Tabela 15 Resultados da análise PROBIT 95% sobre dados de LoD recolhidos com padrões virais em plasma EDTA, soro e DBS

Matrizes	Analito	Unidade de medida	LoD	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%	Limite superior do intervalo de confiança de 95%
Plasma EDTA	HIV-1 grupo M	cópias/ml	12,6	10,9	15,2
	HIV-1 grupo O	cópias/ml	14,8	12,8	17,7
	HIV-2	cópias/ml	27,9	22,9	36,6
Soro	HIV-1 grupo M	cópias/ml	12,1	10,5	14,5
	HIV-1 grupo O	cópias/ml	12,6	10,9	15,2
	HIV-2	cópias/ml	23,4	19,6	29,7
DBS	HIV-1 grupo M	cópias/ml	255	224	299
	HIV-2	cópias/ml	984	856	1169

Tabela 16 Resumo das taxas de reatividade para o HIV-1 grupo M em plasma EDTA, soro e DBS

Matrizes	Concentração de ARN do HIV-1 grupo M (cp/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos
Plasma EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	174	189	92%
	5	124	189	66%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%
Soro	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	187	189	99%
	10	176	189	93%
	5	126	189	67%
	2,5	86	189	46%
	0	0	189	0%
DBS	750	252	252	100%
	600	252	252	100%
	360	246	250	98%
	180	220	249	88%
	90	163	252	65%
	45	109	250	44%
	0	0	107	0%

Tabela 17 Resumo das taxas de reatividade para o HIV-1 grupo O em plasma EDTA e soro

Matrizes	Concentração de ARN do HIV-1 grupo O (cp/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos
Plasma EDTA	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	185	188	98%
	10	163	189	86%
	5	117	189	62%
	2,5	78	189	41%
	0	0	189	0%
Soro	40	189	189	100%
	30	189	189	100%
	20	186	189	98%
	10	173	189	92%
	5	132	189	70%
	2,5	91	189	48%
	0	0	189	0%

Tabela 18 Resumo das taxas de reatividade para o HIV-2 em plasma EDTA, soro e DBS

Matrizes	Concentração de ARN do HIV-2 (cp/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos
Plasma EDTA	80	126	126	100%
	40	124	126	98%
	20	115	126	91%
	10	81	126	64%
	5	61	126	48%
	0	0	189	0%
Soro	80	126	126	100%
	40	125	126	99%
	20	114	126	90%
	10	96	126	76%
	5	49	126	39%
	0	0	189	0%
DBS	3000	252	252	100%
	1450	241	247	98%
	725	226	246	92%
	362	167	248	67%
	181	103	250	41%
	0	0	108	0%

Reprodutibilidade

O limite de reprodutibilidade do **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi determinado utilizando os seguintes padrões:

- Padrão Secundário da Roche para o HIV-1 grupo M
- Padrão Secundário da Roche para o HIV-2

Foram testados neste estudo 2 painéis de alvos HIV-1 grupo M e HIV-2 formulados individualmente, cada um composto por 3 membros a concentrações de aproximadamente 0,6 x, 1 x e 3 x o LoD do **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Os testes foram efetuados para os seguintes componentes de variabilidade:

- variabilidade dia-a-dia durante 4 dias
- variabilidade lote-a-lote utilizando 3 lotes diferentes de reagente do **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative
- variabilidade equipamento-a-equipamento utilizando 3 **cobas**® 6800/8800 Systems diferentes

Foram testadas aproximadamente 84 réplicas com cada um dos 3 membros do painel para cada lote de reagente, num total de 252 réplicas para cada membro do painel. Os resultados de reprodutibilidade foram avaliados calculando a percentagem de resultados de teste reativos a cada nível de concentração para cada um dos componentes de variabilidade analisados.

Foram calculados os limites dos intervalos de confiança bilaterais de 95% de cada taxa de reativos para cada um dos 3 níveis de HIV-1 grupo M e HIV-2, testados em 4 dias diferentes, utilizando 3 lotes de reagente e 3 **cobas**® 6800/8800 Systems. O teste **cobas**® HIV-1/HIV-2 Qualitative é reprodutível em vários dias diferentes, utilizando vários lotes de reagente e vários equipamentos. Os resultados da variabilidade lote-a-lote de reagente estão resumidos na Tabela 19 e Tabela 20.

Tabela 19 Resumo da reprodutibilidade lote-a-lote de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative (plasma EDTA)

Analito	Concentração	Lote de reagente	% de reativos (reativos/réplicas válidas)	Limite inferior do intervalo de confiança (IC) de 95%	Limite superior do intervalo de confiança (IC) de 95%
HIV-1 grupo M	~3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~0,6 x LoD	1	77,4% (65/84)	67,0%	85,8%
		2	76,2% (64/84)	65,7%	84,8%
		3	82,1% (69/84)	72,3%	89,6%
HIV-2	~3 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	100% (84/84)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		2	98,8% (83/84)	93,5%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~0,6 x LoD	1	66,7% (56/84)	55,5%	76,6%
		2	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%
		3	69,0% (58/84)	58,0%	78,7%

Tabela 20 Resumo da reprodutibilidade lote-a-lote de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative (DBS)

Analito	Concentração	Lote de reagente	% de reativos (reativos/réplicas válidas)	Limite inferior do intervalo de confiança (IC) de 95%	Limite superior do intervalo de confiança (IC) de 95%
HIV-1 grupo M	~3 x LoD	1	100% (84/84)	95,7%	100%
		2	100% (83/83)	95,7%	100%
		3	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
	~1 x LoD	1	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		2	96,4% (81/84)	89,9%	99,3%
		3	95,2% (80/84)	88,3%	98,7%
	~0,6 x LoD	1	88,0% (73/83)	79,0%	94,1%
		2	83,3% (70/84)	73,6%	90,6%
		3	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
HIV-2	~3 x LoD	1	100% (83/83)	95,7%	100%
		2	100% (84/84)	95,7%	100%
		3	100% (83/83)	95,7%	100%
	~1 x LoD	1	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		2	97,6% (82/84)	91,7%	99,7%
		3	98,8% (83/84)	93,5%	100%
	~0,6 x LoD	1	88,1% (74/84)	79,2%	94,1%
		2	91,7% (77/84)	83,6%	96,6%
		3	85,7% (72/84)	76,4%	92,4%

Verificação e inclusividade do grupo/subtipo

O desempenho do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative nos subtipos do grupo M do HIV-1, no HIV-1 grupo O, no HIV-1 grupo N e no HIV-2 grupo B foi avaliado por:

- Verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M do HIV-1, do HIV-1 grupo O (verificado por diluição em sangue total para DBS), do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupo B
- Verificação da inclusividade dos subtipos do grupo M do HIV-1, do HIV-1 grupo O, do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupos A e B

Verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M do HIV-1, do HIV-1 grupo O, do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupo B

Foram diluídas amostras clínicas e de cultura de HIV-1 do HIV-1 grupo M (A, C, D, F, G, H) e formas recombinantes circulantes (CRF01_AE, CRF02_AG), do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupo B em plasma EDTA, soro e sangue total para DBS, e adicionalmente do HIV-1 grupo O em sangue total para DBS, a concentrações de LoD do grupo/subtipo predominante (subtipo B do grupo M do HIV-1 ou grupo A do HIV-2) com base no LoD determinado com análise PROBIT 95% por entre todos os lotes combinados. A determinação da taxa de reativos foi efetuada com 42 réplicas. Os testes foram efetuados com 1 lote de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Os resultados do HIV-1 estão indicados na Tabela 21 e os resultados do HIV-2 na Tabela 22. Estes resultados demonstram que o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative detetou HIV do HIV-1 grupo M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), do HIV-1 grupo O, do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupo B à concentração invocada para cada matriz ou inferior, com um intervalo de confiança superior a 95%, sendo igual ou superior à taxa de reatividade esperada de 95%.

Tabela 21 Verificação do limite de detecção (LoD) dos subtipos do grupo M do HIV-1, do HIV-1 grupo O e do HIV-1 grupo N em plasma EDTA, soro ou sangue total para DBS

Grupo	Subtipo	Plasma: 12,6 cp/ml			Soro: 12,1 cp/ml			DBS: 255 cp/ml		
		N.º de réplicas válidas	Número de reativos	% de reativos (IC* de 95%)	N.º de réplicas válidas	Número de reativos	% de reativos (IC* de 95%)	N.º de réplicas válidas	Número de reativos	% de reativos (IC* de 95%)
M	A	42	40	95% (99%)	42	40	95% (99%)	41	37	90% (97%)
	C	42	41	98% (100%)	42	42	100% (99,4%)	42	42	100% (100%)
	D	42	37	88% (96%)	42	37	88% (96%)	42	39	93% (99%)
	F	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	40	95% (99%)
	G	42	40	95% (99%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
	H	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)	42	41	98% (100%)
	CRF01_AE	42	38	90% (97%)	42	38	90% (97%)	42	41	98% (100%)
	CRF02_AG	42	36	86% (95%)	42	39	93% (99%)	42	42	100% (100%)
O		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	41	39	95% (99%)
N		42	39	93% (99%)	42	37	88% (96%)	41	40	98% (100%)

* Limite superior do intervalo de confiança de 95%

Tabela 22 Verificação do limite de detecção (LoD) do HIV-2 grupo B em plasma EDTA, soro ou sangue total para DBS

Grupo	Plasma: 27,9 cp/ml			Soro: 23,4 cp/ml			DBS: 984 cp/ml		
	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	% de reativos (IC* de 95%)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	% de reativos (IC* de 95%)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	% de reativos (IC* de 95%)
B	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)	42	42	100% (100%)

* Limite superior do intervalo de confiança de 95%

Verificação da inclusividade dos subtipos do grupo M do HIV-1, do HIV-1 grupo O, do HIV-1 grupo N e do HIV-2 grupo B

Foi determinado o desempenho do **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative para detetar os subtipos do grupo M do HIV-1 (A, C, D, F, G, H, J, K) e formas recombinantes circulantes (CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), o HIV-1 grupo O, o HIV-1 grupo N, o HIV-2 grupo A e o HIV-2 grupo B, através de testes a amostras clínicas únicas e/ou isolados de cultura de cada um dos grupos ou subtipos em plasma EDTA ou soro.

HIV-1 grupo M

Um total de 105 amostras clínicas únicas do HIV-1 grupo M com subtipo de HIV-1 conhecido foram testadas puras (não diluídas) e depois de diluição a $\sim 5 \times$ o LoD do **cobas®** HIV-1/HIV-2 Qualitative. Todas as 105 amostras clínicas com subtipos conhecidos foram detetadas puras e a $\sim 5 \times$ o LoD (Tabela 23).

Além disso, foram testadas quatro amostras clínicas do subtipo CRF12_BF do grupo M do HIV-1 e uma amostra do subtipo CRF14_BG do grupo M do HIV-1 depois de serem preparadas séries de diluições. Foram testadas uma réplica da cada uma das amostras puras e uma de cada diluição de 1:1,0E+01 a 1:5,0E+02 (2 a 4 diluições por amostra) para o subtipo CRF12_BF do grupo M do HIV-1 e de 1:2,0E+01 a 1:1,2E+02 (4 diluições) para o subtipo CRF14_BG do grupo M do HIV-1, produzindo todas resultados reativos. Todas as amostras clínicas testadas foram detetadas a $\leq 5 \times$ o LoD.

Tabela 23 Amostras clínicas do HIV-1 grupo M

Subtipo / formas recombinantes circulantes	% de reativas (reativas/amostras testadas) puras	% de reativas (reativas/amostras testadas) diluídas a ~5 x o LoD
A	100% (10/10)	100% (10/10)
C	100% (10/10)	100% (10/10)
D	100% (10/10)	100% (10/10)
F	100% (10/10)	100% (10/10)
G	100% (10/10)	100% (10/10)
H	100% (10/10)	100% (10/10)
J	100% (5/5)	100% (5/5)
K	100% (9/9)	100% (9/9)
CRF01_AE	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF02_AG	100% (10/10)	100% (10/10)
CRF12_BF	100% (2/2)	100% (2/2)
CRF14_BG	100% (9/9)	100% (9/9)

HIV-1 grupo O e HIV-1 grupo N

Um total de 10 amostras clínicas ou de cultura do HIV-1 grupo O e 1 do HIV-1 grupo N foram testadas depois de serem preparadas séries de diluições. Foram testadas duas réplicas da cada uma das amostras puras e quatro de cada diluição de 1:1,0E+01 a 1:4,8E+05 (3 a 5 diluições por amostra) relativamente ao HIV-1 grupo O, produzindo todas resultados reativos. Foram testadas duas réplicas da amostra pura e quatro de cada diluição de 1:1,0E+04 a 1:1,4E+05 (5 diluições) relativamente ao HIV-1 grupo N. A amostra pura e as diluições de 1:1,0E+04 a 1:4,5E+04 produziram 100% de resultados reativos, enquanto que a diluição 1:1,4E+05 produziu um resultado reativo de 50%. Todas as amostras testadas foram detetadas a ≤ 3 x o LoD.

HIV-2

Um total de 16 amostras únicas clínicas ou de cultura do HIV-2 grupos A e B foram testadas puras (não diluídas) e depois de diluição a $\sim 5 \times$ o LoD do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Todas as 16 amostras de HIV-2 foram detetadas puras e a $\sim 5 \times$ o LoD (Tabela 24).

Além disso, foram testadas 6 amostras do HIV-2 grupo A e 4 do HIV-2 grupo B, depois de serem preparadas séries de diluições. Foram testadas uma réplica da cada uma das amostras puras e uma de cada diluição de 1:1,0E+01 a 1:9,0E+02 (2 a 5 diluições por amostra) para o HIV-2 grupo A e de 1:2,0E+01 a 1:6,0E+01 (2 a 4 diluições) para o HIV-2 grupo B, produzindo todas resultados reativos. Todas as amostras clínicas testadas foram detetadas a $\leq 3 \times$ o LoD.

Tabela 24 Amostras clínicas ou de cultura do HIV-2

Subtipo	% de reativas (reativas/amostras testadas) puras	% de reativas (reativas/amostras testadas) diluídas a $5 \times$ o LoD
A	100% (4/4)	100% (4/4)
B	100% (6/6)	100% (6/6)

Especificidade

Foi determinada a especificidade do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative através da análise de amostras de plasma EDTA negativas para o HIV, amostras de soro negativas para o HIV e amostras de DBS negativas para o HIV de dadores de sangue individuais. Um total de 613 amostras individuais de plasma EDTA e 607 amostras individuais de soro foram testadas com 2 lotes de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Além disso, foram testadas 604 amostras individuais de DBS com 3 lotes de reagentes do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative. Todas as amostras testadas foram determinadas como não reativas para o HIV-1 e o HIV-2. Em cada uma das amostras de plasma EDTA, de soro e de DBS, a especificidade do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi de 100% (limite de confiança de 95%: $\geq 99,5\%$).

Painéis de seroconversão

O desempenho do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi avaliado utilizando painéis de seroconversão disponíveis no mercado para o HIV-1 grupo M.

Painéis de seroconversão do HIV-1 grupo M

Foram utilizados 25 painéis de seroconversão disponíveis no mercado. Cada membro do painel foi testado puro com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative e os resultados foram comparados com os resultados obtidos com um teste de serologia de 4ª geração HIV Ag/Ab aprovado pela FDA e um teste comparável de ácidos nucleicos aprovado pela FDA, testado puro. Os resultados de desempenho geral estão indicados na Tabela 25.

Tabela 25 Desempenho do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative em painéis de seroconversão do HIV

Painel de sero-conversão do HIV	Número de membros do painel testados	Número de membros do painel com resultado reativo			Dias para primeiro resultado reativo			Dias de antecipação da detecção com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	
		cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	NAT comparador	Ensaio HIV Ag/Ab	cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	NAT comparador	Ensaio HIV Ag/Ab	NAT comparador	Ensaio HIV Ag/Ab
HIV6243	10	6	6	4	18	18	25	0	7
HIV9011	11	3	3	2	30	30	38	0	8
HIV9012	8	5	5	3	9	7	16	-2	7
HIV9013	7	3	2	2	18	23	23	5	5
HIV9018	10	5	5	3	21	21	28	0	7
HIV9020	21	5	5	3	83	83	90	0	7
HIV9022	9	3	4	2	23	17	25	-6	2
HIV9030	16	6	5	3	40	40	47	0	7
HIV9031	19	8	6	4	120	131	146	11	26
HIV9034	13	4	4	3	41	41	46	0	5
HIV9076	9	3	3	3	66	66	66	0	0
HIV9089	6	5	5	3	7	7	16	0	9
HIV12008	13	7	7	5	21	21	28	0	7
PRB954	7	5	5	2	7	7	17	0	10
PRB956	5	4	4	2	40	40	47	0	7
PRB958	6	6	6	4	0	0	7	0	7
PRB961	9	4	4	2	19	19	27	0	8
PRB962	6	4	4	2	7	7	14	0	7
PRB963	7	4	5	2	9	7	17	-2	8
PRB967	6	5	5	3	3	3	17	0	14
PRB968	10	6	6	4	15	15	26	0	11
PRB969	10	7	6	3	53	53	70	0	17
PRB973	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB976	4	4	4	2	0	0	7	0	7
PRB977	4	4	2	2	0	-*	13	-*	13
Total	230	120	115	70					

* Resultado inválido do NAT de comparação para o primeiro membro do painel PRB977, em que estava previsto um resultado NAT reativo. O painel (PRB977) não foi portanto incluído na avaliação dos resultados do NAT de comparação.

Especificidade analítica

A especificidade analítica do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** foi avaliada para reatividade cruzada com um painel de microrganismos a 10^5 ou 10^6 partículas, cópias ou PFU/ml, para isolados virais e isolados de estirpes bacterianas/de levedura, respetivamente (Tabela 26). Os microrganismos foram adicionados a plasma EDTA humano negativo para o HIV, e testados com e sem vírus HIV-1 e HIV-2 adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x o LoD do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** para cada vírus. Foram obtidos resultados não reativos com o **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** em todas as amostras de microrganismos sem alvos de HIV-1 e HIV-2 e resultados reativos em todas as amostras de microrganismos com alvos de HIV-1 e HIV-2. Os microrganismos testados não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative**.

Tabela 26 Microrganismos testados relativamente a reatividade cruzada

Vírus		Bactérias	Leveduras
Adenovírus tipo 5	Vírus Varicella-Zoster	Propionibacterium acnes	Candida albicans
Citomegalovírus	Vírus do Nilo Ocidental	Staphylococcus aureus	
Vírus de Epstein Barr	Vírus da encefalite de São Luís		
Vírus da hepatite A	Vírus da encefalite de Murray Valley		
Vírus da hepatite B	Vírus da dengue, tipo 1, 2, 3 e 4		
Vírus da hepatite C	Vírus da TBE (encefalite da carraça) (estirpe HYPR)		
Vírus da hepatite D	Vírus da gripe A		
Vírus T-linfotrópico humano, tipo 1 e 2	Vírus Zika		
Vírus do herpes humano tipo 6	Vírus do papiloma humano		
Vírus do herpes simples, tipo 1 e 2	Vírus da febre-amarela		

Foram testadas amostras de plasma EDTA de cada um dos estados de doença indicados na Tabela 27 (1 do Adenovírus tipo 5 e 10 de cada um dos outros estados da doença), com e sem HIV-1 e HIV-2 adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x o LoD do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** para cada vírus. Estes estados da doença não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative**.

Tabela 27 Amostras de estados de doença testadas relativamente a especificidade analítica

Estados de doença		
Adenovírus tipo 5	Vírus da hepatite B	Vírus do herpes simples do tipo 2
Citomegalovírus	Vírus da hepatite C	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I
Vírus do dengue	Vírus da hepatite E	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo II
Vírus de Epstein Barr	Vírus do herpes simples tipo 1	Vírus do Nilo Ocidental

Especificidade analítica – substâncias interferentes

Foram testados na presença e ausência de ARN de HIV-1 e HIV-2, níveis elevados de triglicéridos (33 g/l), de bilirrubina conjugada (0,2 g/l), de bilirrubina não conjugada (0,2 g/l), de albumina (60 g/l), de hemoglobina (2 g/l) e de ADN humano (2 mg/l) em amostras, assim como na presença de doenças autoimunes tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR) e anticorpos antinucleares (ANA).

Além disso, os fármacos indicados na Tabela 28 foram testados com o triplo da $C_{\text{máx}}$ na presença e ausência de ARN de HIV-1 e HIV-2.

Nenhuma das substâncias potencialmente interferentes demonstrou interferir com o desempenho do teste. Foram obtidos resultados não reativos com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative em todas as amostras sem alvo de HIV e resultados reativos em todas as amostras com alvos de HIV-1 e HIV-2.

Tabela 28 Fármacos testados relativamente a possível interferência com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative

Classe do fármaco	Nome genérico do fármaco	
Moduladores de imunidade	Peginterferon α -2a	Ribavirina
	Peginterferon α -2b	
Inibidores de HCV	Simeprevir	Sofosbuvir
Inibidores de transcriptase reversa ou de polimerase de ADN	Emtricitabina	Tenofovir
	Entecavir	Adefovir dipivoxil
	Foscarnet	Telbivudina
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudine	Valganciclovir
	Ganciclovir	
Composto para o tratamento de infeções oportunistas	Azithromycin	Pyrazinamide
	Clarithromycin	Rifabutin
	Ethambutol	Rifampicin
	Fluconazole	Sulfametoxazol
	Isoniazid	Trimetoprim
Statin	Atorvastatina	
Inibidor seletivo de recaptção de serotonina	Fluoxetina	Paroxetina
	Sertralina	
Antihistamina	Loratadina	
Beta-bloqueador	Nadolol	
Descongestionante	Fenilefrina HCl	
Fármaco anti-inflamatório não esteroide	Naproxeno	Ibuprofeno
Analgésico	Acetaminofeno	Ácido acetilsalicílico
Vitaminas	Ácido ascórbico	

Correlação

Plasma EDTA e soro

O desempenho do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** foi comparado com o desempenho do teste qualitativo **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0** (amostras de plasma EDTA para HIV-1) e com um teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE (amostras de plasma EDTA e de soro para HIV-1 e HIV-2).

Para a correlação com o teste qualitativo **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0**, foram analisadas amostras clínicas de plasma EDTA num laboratório externo. Foi obtida uma percentagem total de concordância de 100% entre os dois testes para amostras clínicas de plasma EDTA positivas para o HIV-1 e negativas para o HIV, demonstrando que o desempenho do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e o do teste qualitativo **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0** são equivalentes (Tabela 29).

Tabela 29 Resumo dos resultados da correlação de métodos para amostras de plasma EDTA para HIV-1

Correlação de métodos Amostras de plasma EDTA para HIV-1		Teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0	
		Reativo	Não reativo
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reativo	68	0
	Não reativo	0	80

Para a comparação com um teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE, foram analisadas amostras clínicas de plasma EDTA ou de soro num laboratório externo. Foi obtida uma percentagem total de concordância de 100% entre os dois testes para amostras de plasma EDTA ou de soro positivas para o HIV-1 e negativas para o HIV-1. Foi obtida uma percentagem total de concordância de 99,7% entre os dois testes para amostras de plasma EDTA ou de soro positivas para o HIV-2 e negativas para o HIV-2. Isto demonstra que o desempenho do **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e o de um teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE são equivalentes (Tabela 30 e Tabela 31).

Tabela 30 Resumo dos resultados da correlação de métodos para amostras de plasma EDTA e de soro para HIV-1

Correlação de métodos Amostras de plasma EDTA e de soro para HIV-1		Teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE		
		Reativo	Não reativo	Indeterminate
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reativo	138	0	0
	Não reativo	0	164	1*

* A amostra que apresentou um resultado não reativo com o **cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative** e um resultado indeterminado com o teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE, foi confirmado ser negativo com um teste de serologia de 4ª geração HIV Ag/Ab com a marca CE.

Tabela 31 Resumo dos resultados da correlação de métodos para amostras de plasma EDTA e de soro para HIV-2

Correlação de métodos Amostras de plasma EDTA e de soro para HIV-2		Teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE		
		Reativo	Não reativo	Indeterminate
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reativo	14	0	0
	Não reativo	1	287	1*

* A amostra que apresentou um resultado não reativo com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative e um resultado indeterminado com o teste de diferenciação de anticorpos de HIV-1/HIV-2 com a marca CE, foi confirmado ser negativo com um teste de serologia de 4ª geração HIV Ag/Ab com a marca CE.

DBS

O desempenho do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi comparado com o desempenho do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, por análise de amostras clínicas precoces de DBS de crianças, num laboratório externo. Foi obtida uma percentagem total de concordância de 99,6% entre os dois testes para amostras de DBS positivas para o HIV-1 e negativas para o HIV-1, demonstrando que o desempenho do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative e o do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 são equivalentes (Tabela 32).

Tabela 32 Resumo dos resultados da correlação de métodos para amostras de DBS para HIV-1

Correlação de métodos Amostras de DBS para HIV-1		Teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0	
		Reativo	Não reativo
cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative	Reativo	127	1*
	Não reativo	0	151

* A amostra que apresentou um resultado reativo com o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative e um resultado não reativo com o teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, foi confirmado ser positivo para o HIV-1 com nested-PCR.

Falha global do sistema

Foi determinada a taxa de falha global do sistema para o cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative, testando 100 réplicas de plasma EDTA e 100 réplicas de sangue total para DBS, adicionadas de HIV-1 do grupo M e subtipo B e de HIV-2. Estas amostras foram testadas com uma concentração alvo de aproximadamente 3 vezes o limite de deteção.

Os resultados deste estudo determinaram que todas as réplicas eram válidas e positivas para os alvos de HIV-1 e HIV-2, originando uma taxa de falha do sistema global de 0% para plasma EDTA e DBS. O intervalo de confiança bilateral de 95% exato foi de 0% para o limite inferior e 3,6% para o intervalo superior para cada alvo e cada matriz.

Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada do cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative foi determinada testando 240 réplicas de uma amostra de DBS negativa para o HIV e 225 réplicas de uma amostra de DBS com HIV-1 de título elevado a 2,0E+07 cp/ml. O estudo foi efetuado seguindo o fluxo de trabalho de preparação de amostras de DBS. No total, foram executadas cinco corridas com amostras positivas e negativas numa configuração de "tabuleiro de xadrez".

Todas as 240 réplicas da amostra negativa foram não-reativas, originando uma taxa de contaminação cruzada de 0%. O intervalo de confiança de 95% foi de 0% para o limite inferior e 1,5% para o intervalo superior.

Informações adicionais

Características principais do teste

Tipo de amostra	Plasma EDTA, soro e gotas de sangue secas (DBS)		
Quantidade de amostra mínima necessária	650 µl para amostras de plasma EDTA e de soro, ou uma amostra de DBS (70 µl de sangue seco por gota) em 1150 µl de cobas ® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER)		
Volume de processamento de amostras	500 µl para amostras de plasma EDTA e soro, ou 850 µl para amostras de DBS		
Sensibilidade analítica		<u>HIV-1 M</u>	<u>HIV-2</u>
	Plasma EDTA	12,6 cp/ml	27,9 cp/ml
	Soro	12,1 cp/ml	23,4 cp/ml
	DBS	255 cp/ml	984 cp/ml
Especificidade	100% (intervalo de confiança unilateral de 95%: 99,5%) (plasma EDTA e soro)		
	100% (intervalo de confiança unilateral de 95%: 99,5%) (DBS)		
Grupos/subtipos – inclusividade	HIV-1M (A–D, F–H, J, K, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF, CRF14_BG), HIV-1O, HIV-1N, HIV-2 (A e B)		

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

Tabela 33 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

	Software auxiliar		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Limite inferior do intervalo atribuído
	Folha de dados de códigos de barras		Fabricante
	Código do lote		Armazenar no escuro
	Risco biológico		Conteúdo suficiente para <n> testes
	Referência de catálogo		Limites de temperatura
	Consulte as instruções de utilização		Ficheiro de Definição de Teste
	Conteúdo do kit		Limite superior do intervalo atribuído
	Distribuído por		Prazo de validade
	Apenas para avaliação de desempenho do IVD		Global Trade Item Number
	Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE para dispositivos médicos de diagnóstico <i>in vitro</i> .	Rx Only	Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a ou a pedido de um profissional licenciado.

Apoio Técnico a Clientes EUA 1-800-526-1247

Fabricante e distribuidores

Tabela 34

Fabricante e distribuidores



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



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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

Marcas comerciais e patentes

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

Copyright

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. AAHVM. Fundamentals of HIV Medicine. Washington, DC;2007.
2. UNAIDS. Global AIDS Update. Geneva;2016.
3. Hoover DR, Saah AJ, Bacellar H, et al. Clinical manifestations of AIDS in the era of pneumocystis prophylaxis. *N Engl J Med*. 1993;329(69):1922-6.
4. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(6):780-7.
5. CDC. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection. Atlanta, GA;2014.
6. Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, et al. 2014 European Guideline on HIV testing. *Int J STD AIDS*. 2014;25(10):695-704.
7. Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S17-22.
8. O'Brien M, Markowitz M. Should we treat acute HIV infection? *Current HIV/AIDS Reports*. 2012;9(2):101-10.
9. Branson BM, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol*. 2011;52 Suppl 1:S3-4.
10. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943-54.
11. World Health Organization. Diagnosis of HIV infection in infants and children. Geneva, 2010.
12. Wittek M, Stürmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7(3):237-46.
13. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93.
15. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78.
16. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7.
17. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
18. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 2.0 10/2018	Foram atualizados os dizeres da descrição do modelo de agitador com aquecimento necessário. Foi atualizada a frase de rotulagem relativa à segurança de produtos, Código P P310, do cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER). Pequenas alterações gramaticais e de formatação. Atualizadas as advertências de risco. Descrições atualizadas. Adicionado símbolo Rx Only e descrição à página de símbolos harmonizados. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.
Doc Rev. 3.0 01/2019	Foi atualizada a descrição dos testes de rastreio utilizados para o rastreio de plasma humano normal (NHP), na Tabela 2, Tabela 3 e na secção Advertências e precauções. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.