

cobas[®] HIV-1

Teste quantitativo de ácidos nucleicos para utilização com os cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

Para diagnóstico *in vitro*

cobas[®] HIV-1	P/N: 09040803190
cobas[®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	P/N: 09040773190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 09051554190

Índice

Utilização prevista	5
Resumo e explicação do teste	5
Reagentes e materiais	8
Reagentes e controlos do cobas ® HIV-1	8
Reagentes cobas omni para preparação da amostra.....	11
cobas ® Specimen Pre-Extraction Reagent.....	12
Requisitos de armazenamento de reagentes	13
Materiais adicionais necessários para o cobas ® 5800 System	15
Materiais adicionais necessários para os cobas ® 6800/8800 Systems	15
Equipamentos e software necessários.....	16
Precauções e requisitos de manuseamento.....	17
Advertências e precauções	17
Manuseamento de reagentes.....	18
Boas práticas de laboratório.....	18
Colheita, transporte e armazenamento de amostras de plasma	19
Amostras de plasma EDTA.....	19
Amostras de gotas secas de plasma PSC.....	20
Instruções de utilização	22
Notas do procedimento	22
Preparação da amostra de gota seca de plasma PSC e procedimento pré-analítico.....	22
Execução do cobas ® HIV-1 no cobas ® 5800 System	27
Execução do cobas ® HIV-1 nos cobas ® 6800/8800 Systems	29

Resultados	30
Controlo de qualidade e validade dos resultados no cobas ® 5800 System.....	30
Resultados de controlo no cobas ® 5800 System	30
Controlo de qualidade e validade dos resultados nos cobas ® 6800/8800 System	31
Alarmes de controlo nos cobas ® 6800/8800 Systems	31
Interpretação dos resultados.....	32
Interpretação dos resultados no cobas ® 5800 System.....	32
Interpretação dos resultados nos cobas ® 6800/8800 Systems.....	33
Limitações do procedimento	33
Avaliação do desempenho não clínico	34
Características chave de desempenho para amostras de plasma EDTA nos cobas ® 6800/8800 Systems.....	34
Limite de deteção (LoD)	34
Intervalo linear	35
Precisão – intralaboratorial	37
Verificação de subtipo.....	38
Especificidade.....	39
Especificidade analítica	40
Especificidade analítica – substâncias interferentes.....	40
Correlação de métodos – desempenho comparado com o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0.....	41
Falha global do sistema	42
Contaminação cruzada	42
Características principais de desempenho para amostras de gotas secas de plasma PSC	43
Limite de deteção (LoD) utilizando o PSC.....	43
Intervalo linear utilizando o PSC.....	44
Verificação de subtipo utilizando o PSC	46
Especificidade utilizando o PSC	46
Falha global do sistema utilizando o PSC.....	46
Desempenho de amostras de gota de plasma seco PSC comparado com amostras de plasma	47

Avaliação do desempenho clínico	48
Reprodutibilidade.....	48
Validação da quantificação da carga viral.....	49
Avaliação clínica.....	52
Conclusão.....	55
Equivalência dos sistemas/comparação dos sistemas.....	55
Informações adicionais	56
Características chave de teste para amostras de plasma EDTA.....	56
Características chave de teste para amostras de gota de plasma seco PSC.....	56
Símbolos.....	57
Assistência técnica.....	58
Fabricante e importador.....	58
Marcas comerciais e patentes.....	58
Direitos de autor.....	58
Bibliografia.....	59
Revisão do documento.....	61

Utilização prevista

O cobas® HIV-1 é um teste *in vitro* de amplificação de ácidos nucleicos para a quantificação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em plasma EDTA ou de uma gota de plasma seco a partir de um cobas® Plasma Separation Card (PSC) de indivíduos infetados com HIV-1.

O teste destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais para a gestão clínica de pacientes infetados com HIV-1. Este teste pode ser utilizado na confirmação de infeção com HIV-1 em indivíduos reativos a anticorpos e para determinar o prognóstico do paciente medindo o nível de referência de HIV-1, ou para monitorizar os efeitos da terapia antirretroviral medindo as alterações no nível de ARN do HIV-1 ao longo da mesma.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Normalmente, após a seroconversão, os indivíduos entram numa fase clinicamente estável e relativamente assintomática que pode durar anos. O período assintomático é caracterizado por viremia persistente no plasma em níveis variáveis, determinados pelo genes do hospedeiro e por uma diminuição gradual dos linfócitos T CD4+. Embora os níveis de vírus em sangue periférico sejam relativamente baixos durante a fase assintomática, a replicação e a eliminação viral parecem ser processos dinâmicos, nos quais as elevadas taxas de produção de vírus e a infeção de células CD4+ são contrabalançadas por elevadas taxas de eliminação de vírus, morte das células infetadas e reposição de células CD4+, resultando em níveis relativamente estáveis da viremia do plasma e de células CD4+ durante aproximadamente 8 anos, em média, nos indivíduos seropositivos.

Medições quantitativas da viremia do HIV no plasma demonstraram que níveis mais elevados do vírus estão correlacionados com uma progressão clínica mais rápida da doença por HIV.^{1,2} Além disso, quase duas décadas de investigação clínica estabeleceram que as reduções dos níveis de vírus no plasma com a utilização de terapia antirretroviral (TARV) diminuem significativamente o risco de progressão clínica, incluindo a morte, a contração da SIDA, infeções oportunistas e morbilidade associada ao HIV.³ A carga viral de HIV é também preditiva do risco de transmissão do HIV, e estudos clínicos controlados aleatórios estabeleceram que um início precoce da terapia TARV com supressão da carga viral reduz em 96% a transmissão do HIV.⁴

Fundamentos dos testes de HIV-1

De momento está disponível um grande número de fármacos antirretrovirais, dirigidos à protease, à integrase, à cápsula e à transcriptase reversa virais. Análises genotípicas de vírus de clades diferentes demonstraram alterações, polimorfismos e mutações secundárias, naturais e induzidas por fármacos, em nucleótidos dentro das regiões de transcriptase reversa, de integrase e de protease do gene POL de HIV-1. O teste de resistência tornou-se uma ferramenta de diagnóstico importante na gestão de infeções com HIV-1 e é iniciada assim que a carga viral do paciente se eleve a um nível que seja detetável através de ensaios de sequenciação. A monitorização da carga viral demonstrou reduzir o risco de resistência aos fármacos e a carga viral é considerada um indicador sentinela de replicação viral ativa, prevenindo a evolução viral em pacientes em terapia.^{5,6} Por conseguinte, várias diretivas nacionais e internacionais recomendam que seja medida a carga viral do HIV-1.^{3,7-9}

Durante vários anos, as diretivas indicavam que um objetivo central da terapia era a supressão da carga viral de HIV-1 abaixo do limite de detecção de um teste (por ex., 50 cópias/ml). Em 2011, as diretrizes nos Estados Unidos começaram a indicar que resultados de carga viral de até 200 cópias/ml em pacientes em terapia TARV podem não ser indicativos de insucesso da terapia, uma vez que alguns pacientes podem ter viremia de nível baixo sem progresso virológico.³ Na Europa, as diretivas continuam a estabelecer que os resultados de carga viral devem ser mantidos abaixo de 50 cópias/ml.⁷ Pequenas diferenças básicas entre testes de carga viral podem originar diferenças importantes na interpretação clínica de resultados de carga viral quando a resposta terapêutica é monitorizada,^{10,11} uma vez que o objetivo da terapia é a supressão do vírus para um nível abaixo do qual a ocorrência de resistência aos fármacos é menos provável, um nível que ainda não foi totalmente definido.¹² Em julho de 2013, a OMS também começou a recomendar a utilização de testes de carga viral em cenários de recursos limitados, definindo 1000 cópias/ml como o limiar da definição de falha virológica com necessidade de tomadas de decisão na gestão terapêutica. Atualmente, a OMS recomenda também a utilização de amostras de gotas secas para ampliar o alcance dos testes de carga viral em cenários de recursos limitados sem acesso imediato a serviços de flebotomia ou capacidades robustas de transporte de amostras de plasma EDTA.⁸ Uma gota seca de plasma PSC, que estabiliza também o ARN do HIV em plasma seco, pode melhorar a abrangência dos testes de carga viral nesses cenários, ao permitir o transporte de amostras a distâncias mais longas e em condições ambientais mais duras do que as do plasma EDTA.

Além da monitorização da resposta terapêutica, as diretivas recomendam a utilização de uma avaliação da carga viral para determinar se um paciente cuja contagem de células CD4+ seja superior a 500 células/mm³ (carga viral superior a 100 000 cópias/ml) deve iniciar a TARV e para garantir que a sequenciação de resistência aos fármacos é bem-sucedida nos pacientes adequados (pacientes com uma carga viral superior a 1000 cópias/ml ou com uma resposta à terapêutica abaixo do ideal). A utilização de avaliação de carga viral deve ser efetuada no período pré-natal para determinar se é necessário um nascimento por cesariana para impedir a transmissão de HIV de mãe para filho (em mulheres grávidas com carga viral superior a 1000 cópias/ml).

Explicação do teste

O cobas® HIV-1 é um teste quantitativo executado no cobas® 5800 System, no cobas® 6800 System ou no cobas® 8800 System. O cobas® HIV-1 permite a detecção e quantificação do ARN do HIV-1 em plasma EDTA ou a partir de uma gota seca de plasma PSC de pacientes infetados. São utilizadas duas sondas para detetar e quantificar, mas não discriminar, os subtipos do grupo M do HIV-1 e o grupo O e o grupo N do HIV-1. A carga viral é quantificada em comparação com um padrão de quantificação de armored ARN sem HIV-1 (RNA-QS), que é introduzido em cada amostra durante o processamento das mesmas. O RNA-QS funciona como um controlo interno para monitorizar toda a preparação de amostras e o processo de amplificação por PCR. Adicionalmente, o teste utiliza três controlos externos: um positivo de título elevado, um positivo de título baixo e um controlo negativo. Os controlos externos positivo alto e positivo baixo são fabricados por diluição a partir de material de stock com um título em rastreável ao Padrão Internacional da OMS para o HIV-1. Cada lote de kit de amplificação/detecção é calibrado em conformidade com rastreamento ao Padrão Internacional da OMS para o HIV-1.

Princípios do procedimento

O cobas® HIV-1 baseia-se na preparação da amostra totalmente automática (extração e purificação dos ácidos nucleicos) seguida de amplificação por PCR e detecção. O cobas® 5800 System foi concebido como um equipamento integrado. 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 desempenhada pelos softwares

cobas® 5800 ou **cobas**® 6800/8800 Systems, que atribui resultados a todos os testes. As diferentes possibilidades de resultados são alvo não detetado, < LLoQ (limite inferior de quantificação), > ULoQ (limite superior de quantificação) ou ARN de HIV-1 detetado, um valor no intervalo linear $LLoQ < x < ULoQ$. Os resultados podem ser revistos diretamente no ecrã do sistema e podem ser exportados e impressos como um relatório.

Os ácidos nucleicos de amostras de pacientes, de controlos externos e de ARN protegido (RNA-QS) adicionado são extraídos simultaneamente. 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 do HIV-1. O gene gag do HIV-1 e a região LTR do HIV-1 (alvo duplo) são amplificados pelo **cobas**® HIV-1. A amplificação seletiva de RNA-QS é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos da sequência-alvo que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com o genoma do HIV-1. É utilizada uma enzima de polimerase do ADN termoestável para a transcrição reversa e para a amplificação por PCR. As sequências-alvo e de RNA-QS são amplificadas simultaneamente utilizando um perfil de amplificação por PCR universal com passos e número de ciclos 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 pela enzima AmpErase, que está incluída na mistura principal de PCR durante o primeiro passo do ciclo térmico. 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 contém duas sondas de deteção específicas para as sequências-alvo de HIV-1 e uma para o RNA-QS. As sondas estão marcadas com corantes sinalizadores fluorescentes específicos do alvo que permitem a deteção simultânea de alvo de HIV-1 e de RNA-QS em dois canais-alvo diferentes.^{16, 17} Quando não ligado à sequência alvo, o sinal fluorescente das sondas intactas é suprimido pelo corante supressor. 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. Em cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas e o sinal cumulativo do corante sinalizador aumenta concomitantemente. A deteção e a discriminação em tempo real dos produtos da PCR são conseguidas medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores libertados, para os alvos virais e para o RNA-QS.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® HIV-1

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

Tabela 1 cobas® HIV-1

cobas® HIV-1 Conservar entre 2 e 8 °C Cassete de 192 testes (P/N 09040803190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit 192 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.	22,3 ml
Padrão de quantificação de ARN (RNA-QS)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de padrão de quantificação de ARN protegido sem HIV contendo regiões de sequências específicas de primer e sondas (ARN não infeccioso em bacteriófago MS2), < 0,1% de azida de sódio	21,2 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	21,2 ml
Reagente Master Mix 1 (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	7,5 ml
Reagente Master Mix 2 de HIV-1 (HIV-1 MMX-R2)	Tampão de tricina, acetato de potássio, 18% de sulfóxido de dimetilo, glicerol, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,12% de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01% de primers senso e anti-senso do HIV, < 0,01% Primers senso e anti-senso do padrão de quantificação, < 0,01% de sondas de oligonucleótido marcadas com fluorescência específicas do HIV e do padrão de quantificação do HIV, < 0,01% aptâmero oligonucleotídico, < 0,1% de polimerase do ADN Z05D, < 0,10% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida de sódio	9,7 ml

Tabela 2 cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 09040773190)			
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo positivo baixo de HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 L(+))C)	< 0,001% de armored ARN do HIV-1 grupo M, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, < 0,001% de ADN (de plasmídeo) sintético do HBV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago Lambda, < 0,001% de (armored) ARN sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HbC; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	  ADVERTÊNCIA H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273: Evitar a libertação para o ambiente. 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. 55965-84-9 Massa de reação de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1).
Controlo positivo alto de HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 H(+))C)	< 0,001% de (armored) ARN sintético de título elevado do HIV-1 grupo M, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, < 0,001% de ADN (de plasmídeo) sintético do HBV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago Lambda, < 0,001% de (armored) ARN sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo por testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HbC; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 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. 55965-84-9 Massa de reação de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1).

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

** Substância perigosa

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 09051554190)			
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 HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HBe; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetável por métodos de PCR < 0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 Massa de reação de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1).</p>

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

** Substância perigosa

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 × 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 ditiotreitol, citrato de sódio dihidratado	4 × 875 ml	 <p>PERIGO</p> <p>H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H314: Provoca queimaduras na pele e 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 luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente 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. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol</p>
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 teste **cobas® HIV-1**. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 11).

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

*** Substância perigosa

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Nota: este reagente é opcional e deve ser utilizado apenas em conjunto com o PSC para gerar amostras de gota de plasma seco. Consulte o folheto informativo do PSC ms_07963084190.

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, citrato de sódio dihidratado	600 ml (15 × 40 ml)	 <p>PERIGO</p> <p>H302: Nocivo por ingestão.</p> <p>H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.</p> <p>H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.</p> <p>EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.</p> <p>P273: Evitar a libertação para o ambiente.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.</p> <p>P301 + P330 + P331: SE INGERIDO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.</p> <p>P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.</p> <p>P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.</p> <p>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.</p> <p>593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol</p>

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

** Substância perigosa

Requisitos de armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8. O cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent, utilizado no fluxo de trabalho de gota de plasma seco PSC, deve ser armazenado e manuseado conforme especificado na Tabela 9. Os requisitos de armazenamento e manuseamento do PSC são especificados no **Folheto informativo do PSC ms_07963084190**.

Quando os reagentes não estiverem no cobas® 5800 System ou 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	2 a 8 °C
cobas® HBV/HCV/HIV-1 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

Requisitos de manuseamento de reagentes para o cobas® 5800 System

Os reagentes carregados no cobas® 5800 System são armazenados a temperaturas apropriadas e as respetivas datas de validade são controladas pelo sistema. O sistema apenas permite 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 exigidas pelo cobas® 5800 System.

Tabela 7 Condições de manuseamento de reagentes exigidas pelo cobas® 5800 System

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
cobas® HIV-1	Prazo não ultrapassado	90 dias desde a primeira utilização	Máx. 40 corridas	Máx. 36 dias*
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 36 dias*
cobas® NHP Negative Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 36 dias*
cobas omni Lysis Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

^a Reagente de utilização única.

* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado no cobas® 5800 System.

Requisitos de manuseamento de reagentes para os cobas® 6800/8800 Systems

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 utilizados se todas as condições indicadas na Tabela 8 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 8 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems.

Tabela 8 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	Prazo não ultrapassado	90 dias desde a primeira utilização	Máx. 40 corridas	Máx. 40 horas
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 8 horas
cobas® NHP Negative Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável ^a	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

^a Reagente de utilização única.

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

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	Prazo não ultrapassado	30 dias desde a primeira utilização	Não aplicável	Máx. 13 horas

Materiais adicionais necessários para o cobas® 5800 System

Tabela 10 Material e consumíveis para utilização no cobas® 5800 System

Material	P/N
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Ponta CORE TIPS com filtro, 1 ml	04639642001
Ponta CORE TIPS com filtro, 300 µl	07345607001
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 ou Saco de resíduos sólidos com folheto informativo	07435967001 ou 08030073001

Materiais adicionais necessários para os cobas® 6800/8800 Systems

Tabela 11 Material 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 e reservatório de resíduos sólidos ou Saco de resíduos sólidos com suporte de cartão e kit de upgrade de gaveta	07435967001 e 07094361001 ou 08030073001 e 08387281001

Tabela 12 Outros materiais e consumíveis necessários apenas para a aplicação de gota de plasma seco PSC

Materiais
cobas® Plasma Separation Card*
Pinça ou tenaz esterilizada descartável**
Tubo capilar de 140 µl (por exemplo, tubo de plástico Vitrex) com doseador compatível (por exemplo, suporte de pipeta Vitrex)*
Dispositivo de punção de utilização única (por ex., Greiner bio-one: MiniCollect® Safety Lancet, profundidade de penetração de 2,00 mm)*
Saco de amostra (de plástico transparente com fecho re-selável) e saquetas de gel de sílica dessecante (para um total de 4 gramas) (para mais informações sobre o armazenamento e fornecimento do PSC, consulte o Folheto informativo do PSC ms_07963084190)
Saco de transporte (por exemplo, Wicoseal 180 × 60 × 240 mm)
Pipeta (por exemplo, pipeta Multistep®)
Eppendorf Thermomixer® (por exemplo, modelo R 5355 ou C ou equivalente) com Thermoblock para 24 tubos cryo
Tubos, 5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno (ou seja, tubos Greiner Bio-one Cryo.s™) com tampas

* Consulte **Folheto informativo do PSC ms_07963084190** para mais informações sobre a colheita de amostras PSC.

** Para evitar a contaminação cruzada, utilize apenas um par de pinças para cada paciente! Recomenda-se a utilização de pinças de metal esterilizadas em autoclave após utilização única.

Equipamentos e software necessários

O software **cobas®** 5800 System e o pacote de análise **cobas®** HIV-1 para o **cobas®** 5800 System deve ser instalado no equipamento **cobas®** 5800. O software Data Manager e o PC para o **cobas®** 5800 System serão fornecidos com o sistema.

O software **cobas®** 6800/8800 Systems e o pacote de análise **cobas®** HIV-1 para os **cobas®** 6800/8800 Systems deve ser instalado no(s) equipamento(s). Para a aplicação de gota de plasma seco PSC nos **cobas®** 6800/8800 Systems, o **cobas®** HIV-PSC ASAP (Assay Specific Analysis Package) deverá estar instalado no(s) equipamento(s).

O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com os sistemas.

Tabela 13 Equipamentos

Equipamento	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
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 informações adicionais, consulte a Assistência ao utilizador e/ou o Guia do utilizador do **cobas®** 5800 System ou dos **cobas®** 6800/8800 Systems.

Nota: contacte o representante local da Roche para uma lista detalhada de racks de amostras, racks para pontas obstruídas e suportes de racks aceites 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 não foi avaliado para utilização como teste de rastreio da presença de HIV-1 em sangue ou em produtos sanguíneos.
- Todas as amostras de paciente deverão 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 teste cobas® HIV-1 e cobas® 5800/6800/8800 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 com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou desionizada (lixívia doméstica diluída a 1:10) ou siga os procedimentos apropriados do laboratório.
 - Se ocorrer derrame de amostra de gota de plasma seco PSC em cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (que contém tiocianato de guanidina), não deixe que entre em contacto com desinfetantes que contenham hipoclorito de sódio, como a lixívia. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- O cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit e o cobas® NHP Negative Control Kit contêm 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 do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, e anticorpos do HBc. Os testes de plasma humano normal por métodos de PCR não apresentaram quaisquer ARN do HIV-1 (grupos M e O), ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV detetáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- Para advertências e precauções adicionais, consulte **Folheto informativo do PSC ms_07963084190**.
- **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 destes procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se, durante o manuseamento e processamento das amostras, o carryover de amostras não for controlado adequadamente.
- Informe as autoridades competentes locais sobre qualquer incidente grave que possa ocorrer ao utilizar este ensaio.

Manuseamento de reagentes

- Para evitar carryover de amostras ou controlos, manipule todos os reagentes, controlos e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeccione visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise e reagente de lavagem, antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de derrame, não utilize esse material para testes.
- O **cobas omni** Lysis 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, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contêm 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** Lysis Reagent 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 e reagentes **cobas omni**. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos.
- 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 preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). Em seguida esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrerem derrames no equipamento **cobas**® 5800, siga as instruções indicadas na Assistência ao Utilizador e/ou no Guia do utilizador do **cobas**® 5800 System para limpar e descontaminar adequadamente a superfície do(s) equipamento(s).
- Se ocorrerem derrames no equipamento **cobas**® 6800/8800, siga as instruções indicadas na Assistência ao Utilizador e/ou do Guia do utilizador do **cobas**® 6800/8800 Systems para limpar e descontaminar adequadamente a superfície do(s) equipamento(s).

Colheita, transporte e armazenamento de amostras de plasma

Nota: manuseie todas as amostras e controlos 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.

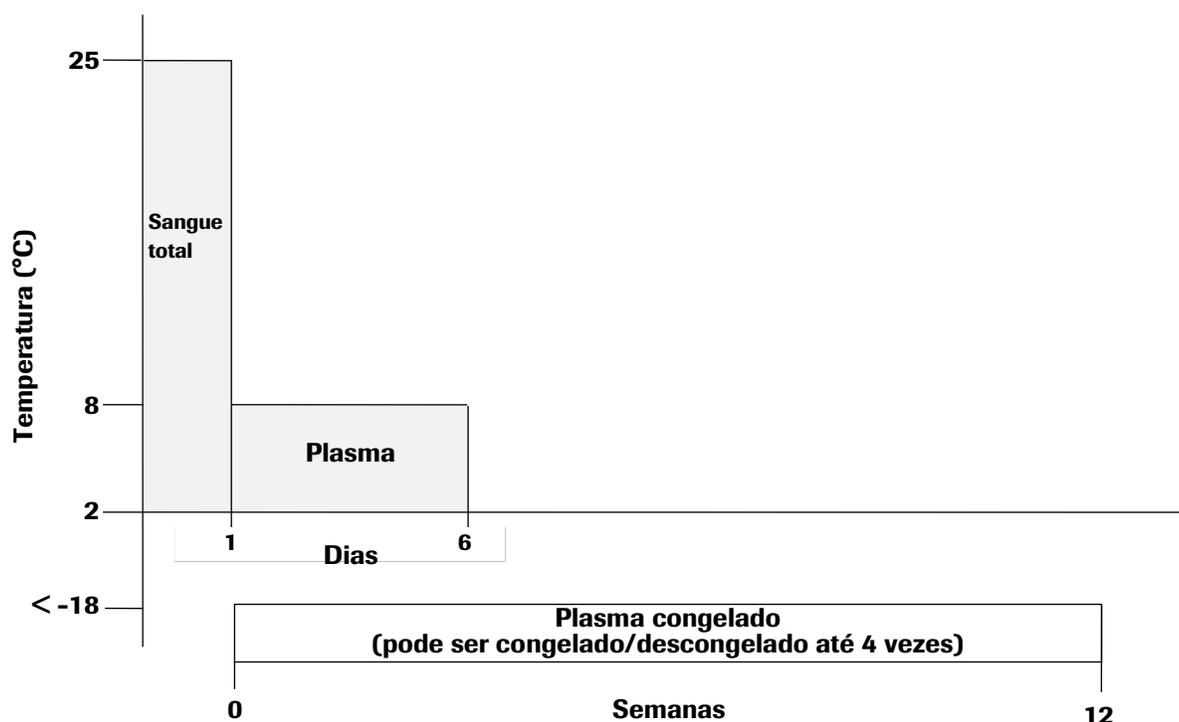
Se utilizar amostras congeladas em tubos secundários, coloque as amostras à temperatura ambiente (entre 15 e 30 °C) até ficarem completamente descongeladas e, em seguida, misture rapidamente (por ex., com agitação forte durante 3 a 5 segundos) e centrifugue para colher todo o volume de amostra no fundo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

Nota: após a centrifugação, se houver hipótese de se encontrarem células ressuspensas no plasma, considere a possibilidade efetuar uma nova centrifugação, antes de processar no equipamento.

Amostras de plasma EDTA

- O sangue total deve ser colhido 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. Consulte a Figura 1.
- O sangue total recolhido em tubos com EDTA pode ser armazenado e/ou transportado durante até 24 horas a entre 2 e 25 °C antes da preparação do plasma. A centrifugação deve ser desempenhada de acordo com as instruções do fabricante.
- Após a separação, as amostras de plasma EDTA podem ser armazenadas em tubos secundários durante até 6 dias entre 2 e 8 °C ou durante até 12 semanas a temperatura ≤ -18 °C. Para armazenamento a longo prazo, recomendam-se temperaturas ≤ -60 °C.
- As amostras de plasma são estáveis até quatro ciclos de congelamento/descongelamento a ≤ -18 °C.

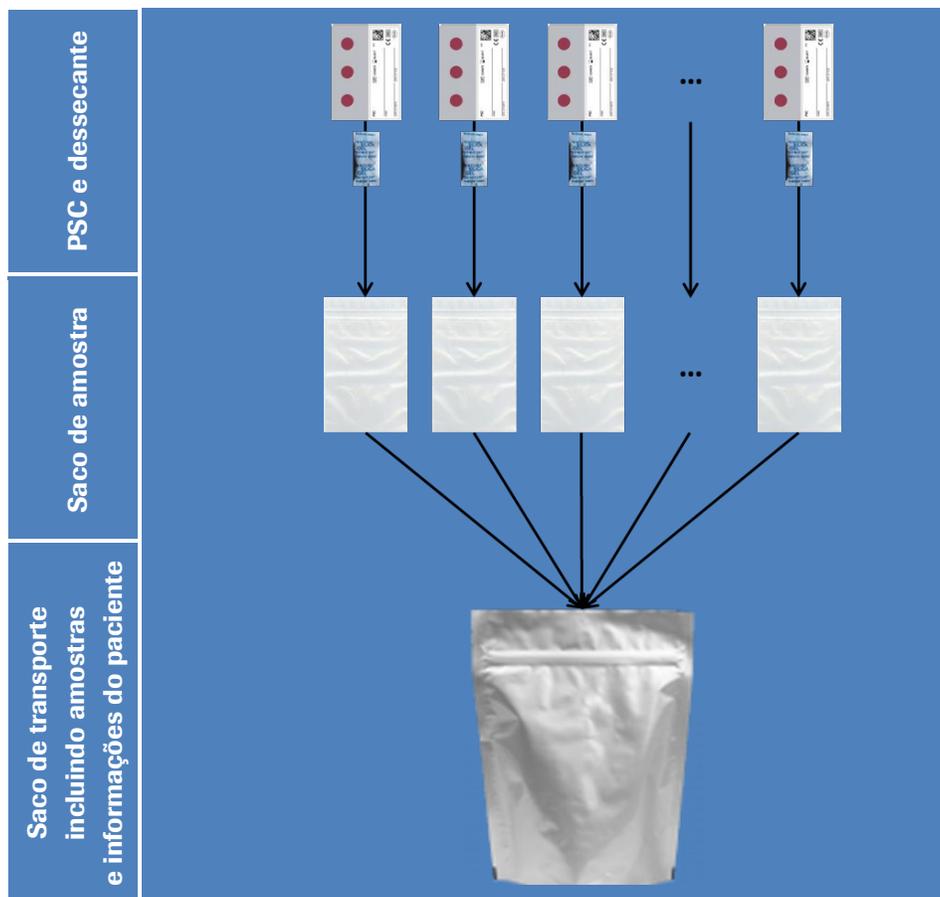
Figura 1 Condições de armazenamento de amostras de plasma EDTA



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.

Amostras de gotas secas de plasma PSC

- Efetue a colheita de amostras de gota de plasma seco PSC utilizando procedimentos clínicos apropriados (consulte **Folheto informativo do PSC ms_07963084190**).
- Verifique o prazo de validade do PSC e prossiga apenas se o PSC ainda não tiver expirado.
- Certifique-se de que o saco no qual o PSC está selado está totalmente fechado e intacto.
- Rotule o PSC com o nome do paciente, a data de nascimento e a data e hora de colheita da amostra.
- Aplique 140 µl de sangue total em cada círculo na camada de aplicação da gota do PSC delineado pela membrana utilizando um tubo capilar apropriado e um doseador. Recomenda-se encher os três círculos no PSC, para permitir a repetição do teste.
- Não aplique amostras de mais do que um paciente no mesmo PSC.
- Não deixe que as membranas entrem em contacto com luvas, ferramentas ou quaisquer superfícies potencialmente contaminadas durante este processo.
- Certifique-se de que AMBOS os lados dos círculos PSC (parte da frente: membrana com sangue; parte de trás: gota com plasma) estão saturados após 5 minutos. Verifique o lado de trás através da camada traseira transparente.
- Deixe o PSC secar à temperatura ambiente durante pelo menos 4 horas (no máximo durante uma noite), protegendo-o da luz solar direta.
- Não retire a camada de aplicação de gota. Isso será feito no laboratório, antes da extração de amostra.
- Depois de secar, armazene o PSC num saco de amostra individual com 4 gramas de dessecante, e sele o saco. Os sacos de amostras colhidas devem ser embalados num saco de transporte com a respetiva ficha de informações do paciente. Recomenda-se embalar um máximo de 25 PSC por saco de transporte (consulte a Figura 2 para ver a panorâmica).

Figura 2 Panorâmica do conceito de embalagem para transporte de PSC

- 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. Os PSC podem ser transportados durante um período de 28 dias antes de serem analisados, a uma temperatura entre 18 e 45 °C e com uma humidade até 85%. Os PSC em sacos de transporte individuais com 4 gramas de dessecante, dentro de um saco de transporte, podem ser armazenados após o transporte à temperatura ambiente (18 a 30 °C), entre 2 e 8 °C ou a ≤ -10 °C até 56 dias (com e sem separação da camada).

Instruções de utilização

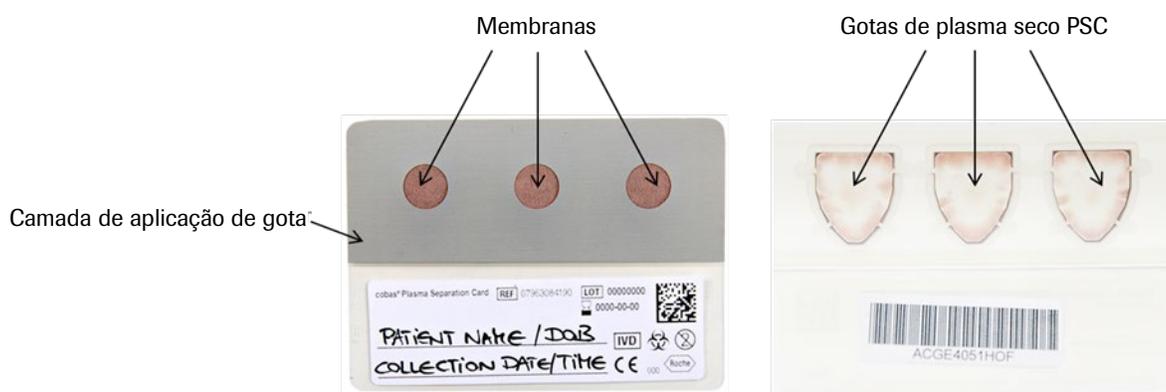
Notas do procedimento

- Não utilize reagentes do cobas® HIV-1, do cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, do cobas® NHP Negative Control Kit ou do cobas® omni depois de expirados os respetivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Para a manutenção adequada do equipamento, consulte a Assistência ao utilizador e/ou o Guia do utilizador do cobas® 5800 System ou dos cobas® 6800/8800 Systems.

Preparação da amostra de gota seca de plasma PSC e procedimento pré-analítico

- Verifique a integridade do saco de transporte antes de o abrir. Prossiga apenas se o saco de transporte estiver completamente selado.
- Abra o saco de transporte e, para cada saco de amostra, prossiga apenas se:
 - o formulário de pedido do laboratório estiver totalmente preenchido.
 - o código de barras do formulário de pedido do laboratório e o PSC corresponderem.
 - o saco de amostra estiver totalmente fechado e contiver um PSC com 4 gramas de dessecante.
 - a data de colheita da amostra estiver disponível e se a colheita de amostra tiver ocorrido nos 28 dias anteriores, e antes do prazo de validade do PSC (consulte Figura 3).
 - o PSC não estiver expirado.
 - a gota seca de plasma PSC apresentar um aspeto homogéneo no lado da frente e estiver totalmente coberta com plasma quando observada a partir do lado de trás (consulte Figura 3).

Figura 3 Gotas de plasma seco PSC a processar (esquerda: lado da frente; direita: lado de trás)

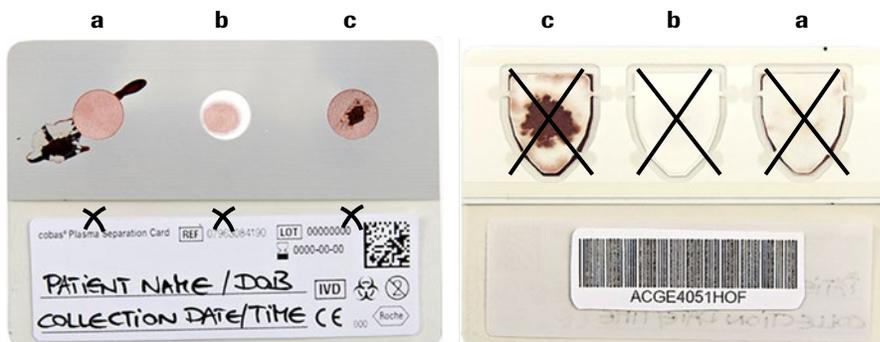


- As gotas de plasma seco PSC devem ser marcadas e rejeitadas se:
 - forem visíveis derrames de sangue (Figura 4a) ou a membrana não estiver totalmente coberta de sangue (Figura 4b) e, conseqüentemente, a gota PSC apresentar a parte da frente não homogénea e/ou a parte de trás não totalmente coberta de plasma (visível através do transportador).

- a membrana estiver danificada (Figura 4c) e, conseqüentemente, a gota PSC apresentar a parte da frente não homogênea e o lado de trás vermelho-escuro/acastanhado (visível através do transportador).

Nota: as três gotas destinam a repetição do teste. Um PSC pode conter uma gota imprópria mas providenciar, não obstante, uma boa amostra para teste. Assinale adequadamente as gotas impróprias, de modo a diferenciá-las das outras. Evite marcá-las na camada de aplicação de gota. Compare sempre as três gotas entre si para avaliar a respetiva qualidade.

Figura 4 Critérios de rejeição de círculos PSC (esquerda: lado da frente; direita: lado de trás) Círculos com derrames (a), membrana não coberta (b) ou membranas visivelmente danificadas (c) não devem ser processados. As zonas de aplicação deverão ser claramente assinaladas quando tiverem sido rejeitadas.

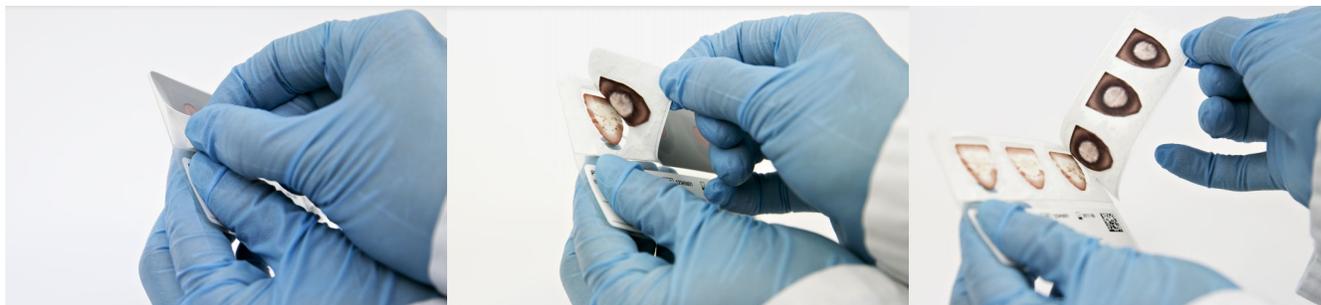


- Rotule um tubo (5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno [ou seja, Greiner Bio-one Cryo.s™]) para cada PSC com o código de barras correspondente do formulário de pedido do laboratório (Figura 5) e coloque-os numa rack. Transfira os tubos para uma câmara de fluxo laminar juntamente com os sacos de amostras contendo os PSC. Para uma etiquetagem com código de barras correta, consulte a Assistência ao utilizador e/ou o Guia do utilizador do cobas® 5800 System ou dos cobas® 6800/8800 Systems.

Figura 5 Rotulagem do tubo com o código correspondente do PSC



- Retire as tampas dos tubos dentro da câmara de fluxo laminar.
- Para o PSC selecionado, abra o saco de amostra e retire a camada de aplicação de gota (Figura 6).

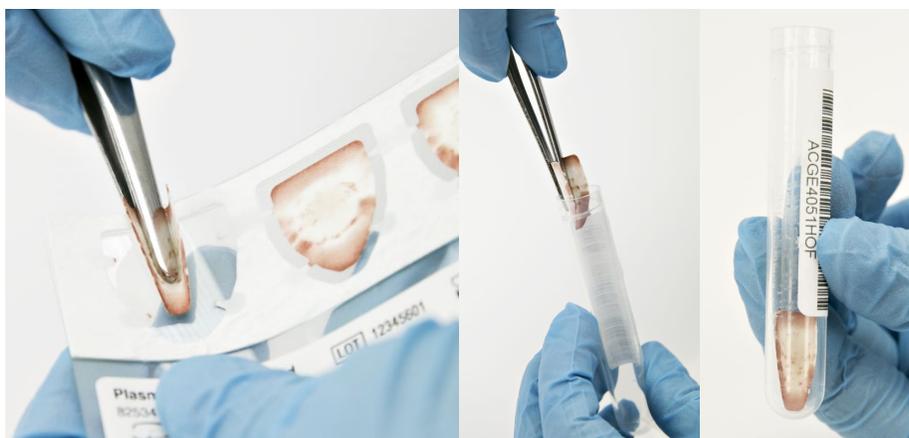
Figura 6 Remoção da camada de aplicação de gota

- Dobre ligeiramente o PSC e, utilizando fórceps ou uma pinça, retire uma gota seca de plasma, puxando-a para cima. Dobre a gota de plasma seco removida no PSC para facilitar a sua inserção no tubo (Figura 7). Utilize um par de fórceps ou uma pinça por paciente.

Nota: as gotas secas de plasma poderão tornar-se quebradiças quando armazenadas. Consulte os requisitos de armazenamento para os PSC. Manuseie-os com cuidado ao inseri-los no tubo.

Figura 7 Remoção da gota seca de plasma do PSC e a sua dobragem

- Transfira uma gota de plasma seco PSC pré-dobrada para o tubo correspondente de modo que a ponta inferior da gota de plasma seco PSC chegue ao fundo do tubo e fique fixada à parede do tubo para evitar erros de pipetagem (Figura 8). Ajuste a posição da gota de plasma seco PSC com uma ponta de pipeta estéril, se necessário. Certifique-se de que o tubo e o PSC da gota de plasma seco PSC apresentam o mesmo código de barras.

Figura 8 Transferência da gota de plasma seco PSC para o tubo

- Coloque o PSC com as restantes gotas secas de plasma de volta no respetivo saco de amostra original contendo 4 gramas de dessecante fresco, para repetição do teste, se necessário (Figura 9). Os PSC podem ser armazenados por um período de 56 dias após o transporte, com e sem separação da camada de aplicação de gota (a 18-30 °C, 2-8 °C ou ≤ -10 °C).

Figura 9 PSC no saco de amostra para eventual repetição do teste



- Deixe o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER) equilibrar à temperatura ambiente antes de utilizar. Pipete 1300 µl de SPER nos tubos contendo as gotas secas de plasma PSC (Figura 10) e coloque as tampas nos tubos. As tampas dos tubos devem ser colocadas corretamente para evitar a evaporação.

Figura 10 Adição de 1300 µl de SPER



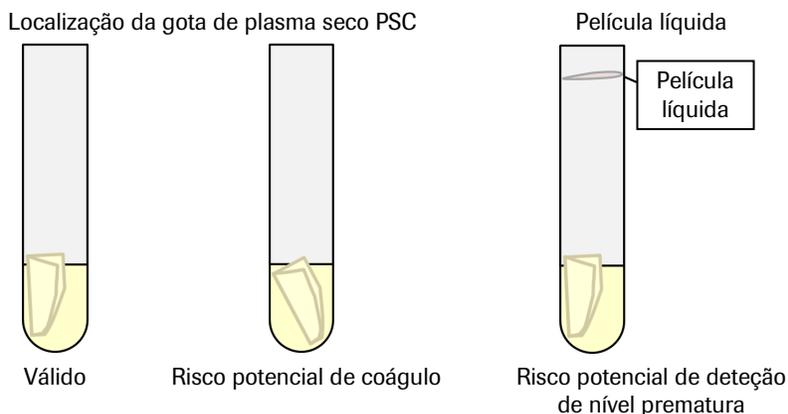
- Coloque os tubos nas posições 1 a 24 num Eppendorf Thermomixer® pré-aquecido (por exemplo, modelo R 5355 ou C ou equivalente) com Thermoblock para 24 tubos cryo e incube durante 10 minutos a 56 °C e 1000 rpm para extrair o vírus do plasma seco (Figura 11). Inicie a incubação imediatamente após a adição de SPER.

Figura 11 Incubação

- Transfira os tubos para uma rack de amostra e retire as tampas dos tubos, uma a uma, para minimizar a contaminação cruzada (Figura 12). Troque de luvas depois de remover as tampas.

Figura 12 Remoção das tampas dos tubos

- Certifique-se de que a gota seca de plasma PSC está colocada corretamente ao longo das paredes do tubo (Figura 13) para evitar coágulos de amostra. Ajuste a posição da gota de plasma seco PSC com uma ponta de pipeta estéril, se necessário.
- Elimine a eventual película líquida localizada acima do nível de líquido utilizando uma ponta de pipeta estéril (para evitar a detecção de nível prematura).
- Carregue os tubos para os **cobas**® 5800 System ou **cobas**® 6800/8800 Systems.

Figura 13 Preparação de gotas de plasma seco PSC antes do fluxo de trabalho analítico

Nota: certifique-se de remover a eventual película líquida durante o processo.

Execução do cobas® HIV-1 no cobas® 5800 System

É possível executar o cobas® HIV-1 com dois volumes mínimos de amostra: 350 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 200 µl) e 650 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 500 µl). O procedimento de teste é descrito detalhadamente na Assistência ao utilizador e/ou no Guia do utilizador do cobas® 5800 System. A Figura 14 a seguir resume o procedimento.

O cobas® HIV-1 pode ser executado com 1300 µl de cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (para o fluxo de trabalho de amostras PSC de 850 µl). Tenha em atenção que o fluxo de trabalho de PSC cobas® HIV-1 pode ser executado em modo de batch misto com amostras de plasma ou soro e o procedimento de gota de sangue seco do cobas® HIV-1/ HIV-2 Qualitative. O procedimento de teste é descrito detalhadamente na Assistência ao utilizador e/ou no Guia do utilizador do cobas® 5800 System. A Figura 14 resume também o procedimento para amostras de gota de plasma seco PSC.

Certifique-se de que utiliza o tipo de amostra correto (PSC) e o ASAP correto (cobas® HIV-PSC ASAP) antes de iniciar o procedimento de teste.

Figura 14 Procedimento do teste cobas® HIV-1 no cobas® 5800 System

1	Iniciar sessão no sistema
2	Carregar amostras no sistema: <ul style="list-style-type: none">• Carregar racks de amostras no sistema• O sistema prepara automaticamente• Pedir testes
3	Reabastecer reagentes e consumíveis conforme pedido pelo sistema: <ul style="list-style-type: none">• Carregar a(s) cassette(s) de reagente específica(s) do teste• Carregar mini racks de controlo• Carregar pontas de processamento• Carregar pontas de eluição• Carregar placas de processamento• Carregar placas de resíduos líquidos• Carregar placas de amplificação• Carregar cassette de MGP• Reabastecer diluente de amostras• Reabastecer reagente de lise• Reabastecer reagente de lavagem
4	Inicie a corrida premindo o botão de iniciar processamento na interface de utilizador; todas as corridas subsequentes iniciarão automaticamente se não forem adiadas manualmente
5	Rever e exportar os resultados
6	Retirar e colocar a tampa nos tubos de amostra que cumprem os requisitos mínimos de volume se necessário para utilização futura Limpar o equipamento: <ul style="list-style-type: none">• Descarregar mini racks de controlo vazias• Descarregar a(s) cassette(s) de reagente específica(s) do teste• Esvaziar gaveta de placas de amplificação• Esvaziar recipiente de resíduos líquidos• Esvaziar recipiente de resíduos sólidos

Execução do cobas® HIV-1 nos cobas® 6800/8800 Systems

É possível executar o cobas® HIV-1 com dois volumes mínimos de amostra: 350 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 200 µl) e 650 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 500 µl). O procedimento de teste é descrito detalhadamente na Assistência ao utilizador e/ou no Guia do utilizador dos cobas® 6800/8800 Systems. A Figura 15 a seguir resume o procedimento.

O cobas® HIV-1 pode ser executado com 1300 µl de cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (para o fluxo de trabalho de amostras PSC de 850 µl). Tenha em atenção que o fluxo de trabalho de PSC cobas® HIV-1 foi avaliado em funcionalidade de batch misto apenas com o fluxo de trabalho cobas® HIV-1/HIV-2 Qualitative de gotas de sangue seco. O procedimento de teste é descrito detalhadamente na Assistência ao utilizador e/ou no Guia do utilizador dos cobas® 6800/8800 Systems. A Figura 15 resume também o procedimento para amostras de gota de plasma seco PSC.

Certifique-se de que utiliza o tipo de amostra correto (PSC) e o ASAP correto (cobas® HIV-PSC ASAP) antes de iniciar o procedimento de teste.

Figura 15 Procedimento do teste cobas® HIV-1 nos cobas® 6800/8800 Systems

1	Iniciar sessão no sistema Premir “Iniciar” para preparar o sistema Pedir testes
2	Reabastecer reagentes e consumíveis conforme solicitado pelo sistema <ul style="list-style-type: none"> • Carregar a cassete de reagente específica do teste • Carregar cassetes de controlo • Carregar pontas de pipetagem • Carregar placas de processamento • Carregar reagente MGP • Carregar placas de amplificação • Reabastecer diluente de amostras • Reabastecer reagente de lise • Reabastecer reagente de lavagem
3	Carregar amostras no sistema <ul style="list-style-type: none"> • Carregar racks de amostras e racks de pontas obstruídas no módulo de abastecimento de amostras • Confirmar que as amostras foram aceites no módulo de transferência
4	Iniciar a execução, seleccionando o botão “Iniciar manualmente” na interface do utilizador ou fazer com que se inicie automaticamente após 120 minutos ou se o batch estiver cheio
5	Rever e exportar os resultados
6	Retirar e colocar a tampa nos tubos de amostra que cumprem os requisitos mínimos de volume se necessário para utilização futura Limpar o equipamento <ul style="list-style-type: none"> • Descarregar cassetes de controlo vazias • Esvaziar gaveta de placas de amplificação • Esvaziar recipiente de resíduos líquidos • Esvaziar recipiente de resíduos sólidos

Resultados

O cobas® 5800 System e os cobas® 6800/8800 Systems determinam automaticamente a concentração de ARN de HIV-1 das amostras e dos controlos. A concentração de ARN de HIV-1 é expressa em cópias por mililitro (cp/ml) ou em unidades internacionais por mililitro (UI/ml). O fator de conversão para o cobas® HIV-1 é 0,6 cp/UI.

Controlo de qualidade e validade dos resultados no cobas® 5800 System

- São processados, pelo menos, a cada 72 horas ou com cada novo lote de kit, um controlo negativo [(-) C] e dois controlos positivos, um controlo positivo baixo [HIV-1 L(+)]C] e um controlo positivo alto [HIV-1 H(+)]C]. Os controlos positivo e/ou negativo podem ser programados mais frequentemente com base nos regulamentos locais e/ou nos procedimentos do laboratório.
- No relatório e/ou no software do cobas® 5800 System, verifique os alarmes e os respetivos resultados associados, para se certificar da validade do batch.
- O batch é válido se não ocorrerem alarmes nos três controlos, que incluem um controlo negativo e dois controlos positivos: HIV-1 L(+)]C, HIV-1 H(+)]C. O resultado do controlo negativo é exibido como (-) C e os resultados do controlo positivo baixo e do controlo positivo alto são exibidos como HxV L(+)]C e HxV H(+)]C.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo cobas® 5800 software, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

NOTA: O cobas® 5800 System é fornecido com a predefinição de executar conjunto de controlos (positivo e negativo) com cada corrida, mas pode ser configurado para uma programação menos frequente para até cada 72 horas com base nos regulamentos locais e/ou nos procedimentos do laboratório. Para mais informações, contacte o seu técnico de assistência Roche e/ou o serviço de apoio ao cliente da Roche.

Resultados de controlo no cobas® 5800 System

Os resultados dos controlos estão indicados no software do cobas® 5800 na aplicação “Controlos”.

- Os controlos estão assinalados com um “Válido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os alvos do controlo forem considerados válidos. Os controlos estão assinalados com um “Inválido” na coluna “Resultado de controlo” se um ou todos os alvos do controlo forem considerados inválidos.
- Os controlos assinalados com um “Inválido” apresentam um alarme na coluna “Alarmes”. Na vista de detalhes, são apresentadas mais informações sobre o motivo pelo qual o controlo é mostrado como inválido, incluindo informações sobre o alarme.
- Se um dos controlos positivos for inválido, repita o teste de todos os controlos positivos e todas as amostras associadas. Se o controlo negativo for inválido, repita os testes de todos os controlos e todas as amostras associadas.

Controlo de qualidade e validade dos resultados nos cobas® 6800/8800 System

- São processados com cada batch um controlo negativo (-) C e dois controlos positivos, controlo positivo baixo de HIV-1 L(+)C e um controlo positivo alto de HIV-1 H(+)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 ocorrerem alarmes nos três controlos, que incluem um controlo negativo e dois controlos positivos: HIV-1 L(+)C, HIV-1 H(+)C. O resultado do controlo negativo é exibido como (-) C e os resultados do controlo positivo baixo e do controlo positivo alto são exibidos como HxV L(+)C e HxV H(+)C.

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

Alarmes de controlo nos cobas® 6800/8800 Systems

Tabela 14 Alarmes de controlos negativos e positivos

Controlo negativo	Alarme	Resultado	Interpretação
(-) C	Q02 (Controlo do batch, falhou)	Inválido	Um resultado inválido ou o resultado de titulação calculado do controlo negativo não é negativo.
Controlo positivo	Alarme	Resultado	Interpretação
HxV L(+)C	Q02 (Controlo do batch, falhou)	Inválido	Um resultado inválido ou o resultado de titulação calculado do controlo positivo baixo não está dentro do intervalo atribuído.
HxV H(+)C	Q02 (Controlo do batch, falhou)	Inválido	Um resultado inválido ou o resultado de titulação calculado do controlo positivo alto não está dentro do intervalo atribuído.

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

HxV L(+)C significa controlo positivo baixo do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 e HxV H(+)C significa controlo positivo alto do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 no software **cobas**® 6800/8800.

Interpretação dos resultados

Para um batch de controlo válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes nos relatórios e/ou nos softwares do **cobas**® 5800 System e dos **cobas**® 6800/8800 Systems. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido pode incluir resultados válidos e inválidos.

Tabela 15 Interpretação dos resultados de amostras

Resultados	Interpretação
Target Not Detected	ARN de HIV não detetado. Reportar resultados como “HIV não detetado”.
< Titer Min	O título calculado está abaixo do limite inferior de quantificação (LLoQ) do ensaio. Reportar resultados como “HIV detetado, inferior a (título mín.)”. Título mín. = 20 cp/ml e 33 UI/ml (500 µl de plasma) Título mín. = 50 cp/ml e 83 UI/ml (200 µl de plasma) Título mín. = 790 cp/ml e 1317 UI/ml (PSC)
Titer	O título calculado está dentro do intervalo linear do ensaio – superior ou igual ao título mín. e inferior ou igual ao título máx. Reportar resultados de “(Título) de HIV-1 detetado”.
> Titer Max ^a	O título calculado está acima do limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio. Reportar resultados como “HIV detetado, superior a (título máx.)”. Título máx. = 1,00E+07 cp/ml e 1,67E+07 UI/ml (500 µl, 200 µl e PSC)

^a Resultado de amostra > Titer Max refere-se às amostras positivas de HIV-1 detetadas com títulos acima do limite superior de quantificação (ULoQ). Caso seja desejado um resultado quantitativo, a amostra original deve ser diluída com plasma EDTA com HIV-1 negativo, em função do tipo da amostra original, e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado reportado pelo fator de diluição.

Interpretação dos resultados no cobas® 5800 System

Os resultados das amostras estão indicados no software do **cobas**® 5800 na aplicação “Resultados”.

Para um batch válido de controlo, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software do **cobas**® 5800 System e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- As amostras associadas ao batch de controlo válido são indicados como “Válido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os Resultados dos alvos de controlo forem reportados como válidos. As amostras associadas ao batch de controlo falhado são indicados como “Inválido” na coluna “Resultado de controlo” se todos os Resultados dos alvos de controlo forem reportados como inválidos.
- Se os controlos associados de um resultado de amostra forem inválidos, será adicionado um alarme específico ao resultado de amostra como se segue:
 - Q05D: falha de validação de resultado, devido a um controlo positivo inválido
 - Q06D: falha de validação de resultado, devido a um controlo negativo inválido
- Os valores na coluna “Resultados” para o resultado do alvo de amostra individual deve ser interpretado como indicado na Tabela 15 acima.
- Se um ou mais alvos de amostra estiverem marcados com “Inválido”, o software **cobas**® 5800 indica um alarme na coluna “Alarmes”. Na vista de detalhes, são apresentadas mais informações sobre o motivo pelo qual o(s) alvos de amostra é(são) mostrado(s) como inválido, incluindo informações sobre o alarme.

Interpretação dos resultados nos cobas® 6800/8800 Systems

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

- 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 do resultado do alvo de amostra individual deve ser interpretado como indicado na Tabela 15 acima.

Limitações do procedimento

- O fluxo de trabalho de plasma cobas® HIV-1 foi avaliado apenas para utilização em combinação com o cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, cobas® NHP Negative Control Kit, cobas omni MGP Reagent, cobas omni Lysis Reagent, cobas omni Specimen Diluent e cobas omni Wash Reagent para utilização nos cobas® 5800/6800/8800 Systems.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- A quantificação do ARN do HIV-1 depende do número de partículas virais presentes nas amostras e pode ser afetada pelos métodos de colheita de amostra, por fatores inerentes ao próprio doente (por ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou o estágio da infeção.
- Embora raras, as mutações dentro de regiões altamente conservadas de um genoma viral abrangidas pelo cobas® HIV-1 podem afetar a ligação de primers e/ou sonda, resultando na subquantificação do vírus ou na não deteção da presença do vírus.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem 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 específicos procedimentos e políticas.
- O cobas® HIV-1 não se destina à utilização como teste de rastreio da presença de HIV-1 em sangue ou em produtos sanguíneos.

Avaliação do desempenho não clínico

Características chave de desempenho para amostras de plasma EDTA nos cobas® 6800/8800 Systems

Limite de detecção (LoD)

Padrão Internacional da OMS

O limite de detecção do cobas® HIV-1 foi determinado por análise de diluições em série do Padrão internacional da OMS da OMS para o ARN de HIV-1 relativo a ensaios com tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (2º Padrão internacional da OMS da OMS) do grupo M, subtipo B, obtido a partir do NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control), em plasma EDTA humano negativo para o HIV, utilizando volumes de processamento de amostras de 500 µl e 200 µl. Foram testados painéis de cinco níveis de concentração e ainda um negativo com três lotes de reagentes cobas® HIV-1, corridas múltiplas, dias, operadores e equipamentos diferentes.

Os resultados do plasma EDTA obtidos com ambos os volumes de processamento de amostras são exibidos na Tabela 16 e na Tabela 17. O estudo demonstra que o cobas® HIV-1 detetou ARN de HIV-1 RNA com uma concentração de 13,2 cp/ml (22,0 UI/ml) conforme determinado por Probit com uma taxa de positividade de 95% relativamente ao volume de processamento de amostras de 500 µl e com uma concentração de 35,5 cp/ml (59,2 UI/ml) ou superior conforme determinado por Probit com uma taxa de positividade de 95% relativamente ao volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 16 Limite de detecção em plasma EDTA (500 µl)

Concentração de título de entrada (ARN de HIV-1 cp/ml)	Concentração de título de entrada (ARN de HIV-1 UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
40,0	66,7	189	189	100,0%
20,0	33,3	189	186	98,4%
10,0	16,7	189	171	90,5%
5,0	8,3	189	125	66,1%
2,5	4,2	189	67	35,4%
0,0	0,0	189	0	0,0%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%		13,2 cp/ml; intervalo de confiança de 95%: 11,4-15,9 cp/ml 22,0 UI/ml; intervalo de confiança de 95%: 19,0-26,5 UI/ml		

Tabela 17 Limite de detecção em plasma EDTA (200 µl)

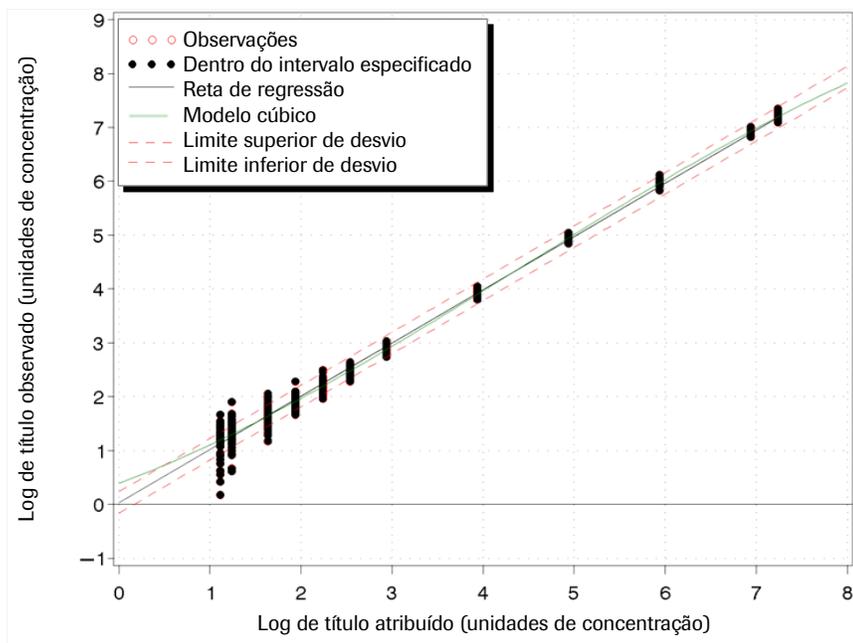
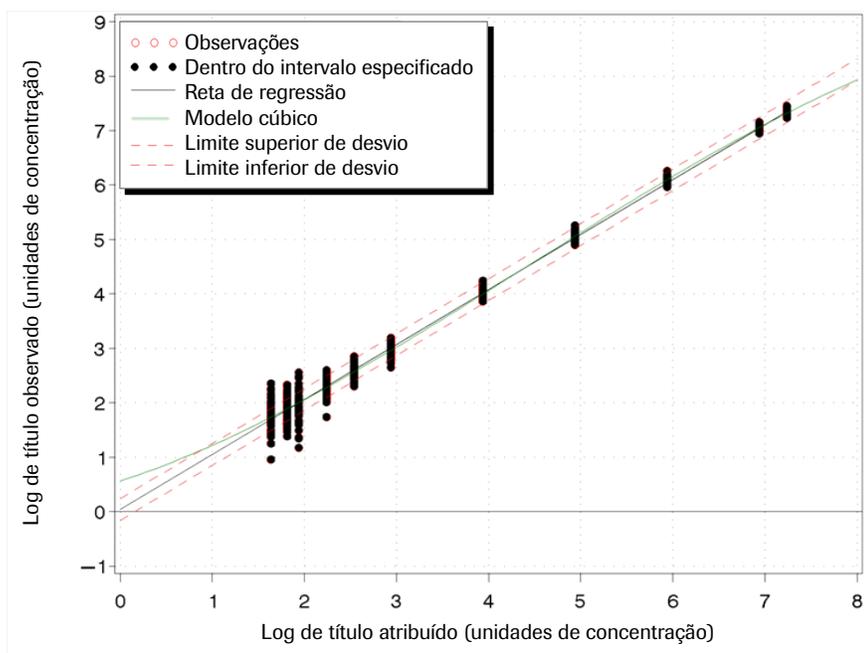
Concentração de título de entrada (ARN de HIV-1 cp/ml)	Concentração de título de entrada (ARN de HIV-1 UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
200,0	333,3	189	189	100,0%
100,0	166,7	188	188	100,0%
50,0	83,3	189	186	98,4%
25,0	41,7	189	164	86,8%
12,5	20,8	189	112	59,3%
0,0	0,0	188	0	0,0%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%		35,5 cp/ml; intervalo de confiança de 95%: 30,8-43,2 cp/ml 59,2 UI/ml; intervalo de confiança de 95%: 51,3-72,0 UI/ml		

Intervalo linear

O estudo da linearidade do **cobas**® HIV-1 foi realizado analisando um painel de 12 membros (para volume de processamento de amostras de 500 µl) e um de 11 membros (para volume de processamento de 200 µl) obtidos a partir de uma série de diluições que abrange o intervalo linear do HIV-1, grupo M, subtipo B predominante. Os membros do painel foram preparados a partir de amostra de sobrenadante de cultura de células com ARN de HIV-1 positivo de título elevado. A avaliação foi conduzida de acordo com a diretiva EP06-A do CLSI.²⁰ Foram analisados três lotes de reagentes em três **cobas**® 6800/8800 Systems, por três operadores e num total de 16 réplicas por membro do painel e por lote, ao longo de quatro dias de testes (quatro réplicas por lote do kit e por dia).

Com volume de processamento de 500 µl, o **cobas**® HIV-1 é linear de 20 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (33,3 UI/ml a 1,67E+07 UI/ml) e exibe um desvio absoluto de $\pm 0,2 \log_{10}$ no plasma EDTA humano, calculado com o método de regressão não linear mais adequado (consulte a Figura 16). Ao longo do intervalo linear, a exatidão do teste estava dentro de $\pm 0,2 \log_{10}$.

Com volume de processamento de 200 µl, o **cobas**® HIV-1 é linear de 50 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (83,3 UI/ml a 1,67E+07 UI/ml) e exibe um desvio absoluto de $\pm 0,2 \log_{10}$ no plasma EDTA humano, calculado com o método de regressão não linear mais adequado (consulte a Figura 17). Ao longo do intervalo linear, a exatidão do teste estava dentro de $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figura 16 Determinação de intervalo linear em plasma EDTA (500 µl)**Figura 17** Determinação de intervalo linear em plasma EDTA (200 µl)

Precisão – intralaboratorial

A precisão do **cobas**® HIV-1 foi determinada através de análises de diluições em série de uma amostra de HIV-1 positiva alta (grupo M, subtipo B; vírus em cultura) em plasma EDTA com HIV negativo. Foram testados oito níveis de diluição (volume de processamento de amostras de 500 µl) e sete níveis de diluição (volume de processamento de amostras de 200 µl) em 48 réplicas para cada nível e volume de processamento com três lotes de reagentes do teste **cobas**® HIV-1 utilizando três equipamentos e três operadores ao longo de 12 dias. Cada amostra foi analisada de forma totalmente automática seguindo todo o procedimento do teste **cobas**® HIV-1 em **cobas**® 6800/8800 Systems. A precisão aqui reportada representa todos os aspectos do procedimento de teste. Os resultados são exibidos na Tabela 18 e na Tabela 19.

O **cobas**® HIV-1 demonstrou alta precisão em três lotes de reagentes testados num intervalo de concentração entre 1,00E+02 cp/ml e 1,00E+07 cp/ml com volume de processamento de amostras de 500 µl e entre 2,00E+02 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml com volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 18 Precisão intra-laboratório do **cobas**® HIV-1 (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de 500 µl)*

Concentração nominal (cp/ml)	Concentração atribuída (cp/ml)	Material de origem	Plasma EDTA			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+07	8,67E+06	Cultura celular	0,04	0,06	0,03	0,05
1,00E+06	8,67E+05	Cultura celular	0,06	0,05	0,04	0,05
1,00E+05	8,67E+04	Cultura celular	0,05	0,07	0,04	0,05
1,00E+04	8,67E+03	Cultura celular	0,06	0,06	0,04	0,05
1,00E+03	8,67E+02	Cultura celular	0,07	0,06	0,07	0,07
4,00E+02	3,47E+02	Cultura celular	0,09	0,10	0,09	0,09
2,00E+02	1,73E+02	Cultura celular	0,11	0,08	0,14	0,11
1,00E+02	8,67E+01	Cultura celular	0,15	0,11	0,10	0,12

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação \log_{10} . As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Tabela 19 Precisão intra-laboratório do **cobas**® HIV-1 (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de 200 µl)*

Concentração nominal (cp/ml)	Concentração atribuída (cp/ml)	Material de origem	Plasma EDTA			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+07	8,67E+06	Vírus em cultura	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+06	8,67E+05	Vírus em cultura	0,07	0,05	0,05	0,06
1,00E+05	8,67E+04	Vírus em cultura	0,07	0,07	0,06	0,07
1,00E+04	8,67E+03	Vírus em cultura	0,08	0,08	0,06	0,08
1,00E+03	8,67E+02	Vírus em cultura	0,12	0,12	0,08	0,11
4,00E+02	3,47E+02	Vírus em cultura	0,11	0,13	0,09	0,11
2,00E+02	1,73E+02	Vírus em cultura	0,20	0,12	0,15	0,16

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação \log_{10} . As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Verificação de subtipo

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

- verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N
- verificação da linearidade dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N
- A atribuição de títulos foi desempenhada utilizando o cobas® HIV-1.

Verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N

As amostras de HIV-1 em cultura para HIV-1M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O e HIV-1N foram diluídas em três diferentes níveis de concentração em plasma EDTA. A determinação da taxa de positividade foi realizada com 63 réplicas para cada nível. Os testes foram efetuados com 1 lote de reagentes cobas® HIV-1. Os resultados de plasma EDTA utilizando 500 µl são exibidos na Tabela 20. Estes resultados demonstram que o cobas® HIV-1 detetou HIV para HIV-1M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O e HIV-1N à concentração invocada de 20 cp/ml ou inferior, com um intervalo de confiança superior unilateral de 95% igual ou superior à taxa de positividade esperada de 95%.

Tabela 20 Verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M, do grupo O e do grupo N do HIV-1 em plasma EDTA a 500 µl

Grupo	Subtipo	10 cp/ml			20 cp/ml			40 cp/ml		
		N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)
M	A	63	59	93,7% (97,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	C	63	51	81,0% (88,6%)	63	61	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)
	D	63	48	76,2% (84,7%)	62	60	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)
	F	63	59	93,7% (97,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	G	63	54	85,7% (92,3%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	H	63	52	82,5% (89,9%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	CRF01_AE	63	52	82,5% (89,9%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	CRF02_AG	63	56	88,9% (94,7%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	O	63	49	77,8% (86,0%)	63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)
N	63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)	

* Intervalo de confiança superior unilateral de 95%

Do mesmo modo, o limite de detecção foi verificado relativamente aos 10 subtipos testados com volume de 200 µl. Os dados são resumidos na Tabela 21. Estes resultados demonstram que o cobas® HIV-1 detetou ARN de HIV para HIV-1M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG) e HIV-1N à concentração referida de 50 cp/ml ou inferior, com um intervalo de confiança superior unilateral de 95% igual ou superior à taxa de positividade esperada de 95%. O HIV-1O foi verificado a 100 cp/ml.

Tabela 21 Verificação do limite de deteção dos subtipos do grupo M, do grupo O e do grupo N do HIV-1 em plasma EDTA a 200 µl

Grupo	Subtipo	25 cp/ml			50 cp/ml			100 cp/ml		
		N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)
M	A	63	54	85,7% (92,3%)	63	60	95,2% (98,7%)	63	63	100% (100%)
	C	63	50	79,4% (87,3%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	D	63	51	81,0% (88,6%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	F	63	56	88,9% (94,7%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	G	63	52	82,5% (89,9%)	63	62	98,4% (99,9%)	63	63	100% (100%)
	H	63	61	96,8% (99,4%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	CRF01_AE	63	53	84,1% (91,1%)	63	57	90,5% (95,8%)	63	63	100% (100%)
	CRF02_AG	63	49	77,8% (86,0%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)
	O	63	44	69,8% (79,3%)	63	56	88,9% (94,7%)	63	63	100% (100%)
N	63	55	87,3% (93,5%)	63	63	100% (100%)	63	63	100% (100%)	

* Intervalo de confiança superior unilateral de 95%

Verificação do intervalo linear dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N

A série de diluições, utilizada ao longo do intervalo linear na verificação do estudo de linearidade do cobas® HIV-1 para os diferentes subtipos, é constituída por um painel de sete membros para o volume de processamento de 500 µl e um painel de seis membros para o volume de processamento de 200 µl. Os membros do painel foram preparados a partir de amostras de cultura sobrenadante de células com ARN de HIV-1 positivo de título elevado, do subtipo respetivo. Os testes foram efetuados com dois lotes de reagentes cobas® HIV-1; foram testadas 14 réplicas por nível em plasma EDTA.

O intervalo linear do cobas® HIV-1 foi verificado para os subtipos do grupo M, para o grupo O e para o grupo N. O desvio máximo entre a regressão linear e a regressão não linear mais adequada foi igual ou inferior a 0,2 log₁₀.

Especificidade

A especificidade do cobas® HIV-1 foi determinada através da análise de amostras de plasma EDTA negativas para o HIV de dadores individuais. Foram testadas 600 amostras individuais de plasma EDTA com dois lotes de reagentes cobas® HIV-1. Todas as amostras tiveram resultado negativo relativamente a ARN de HIV-1. No painel de teste, a especificidade do cobas® HIV-1 foi 100% (intervalo de confiança de 95%: ≥ 99,5%).

Especificidade analítica

A especificidade analítica do **cobas**® HIV-1 foi avaliada através da diluição de um painel de microrganismos com ARN de HIV positivo e com plasma EDTA com ARN de HIV negativo. Os microrganismos foram adicionados a plasma EDTA negativo humano e testados com e sem ARN de HIV. Nenhum dos agentes patogênicos não HIV interferiu com o desempenho do teste. Foram obtidos resultados negativos com o **cobas**® HIV-1 em todas as amostras de microrganismos sem alvo de HIV-1 e resultados positivos em todas as amostras de microrganismos com alvo de HIV-1. O título médio de \log_{10} de cada uma das amostras positivas de HIV-1 contendo organismos com potencial de reatividade cruzada estava dentro de $\pm 0,3 \log_{10}$ do título médio de \log_{10} do respetivo controlo positivo.

Tabela 22 Microrganismos testados relativamente a reatividade cruzada

Vírus		Bactérias	Leveduras
Adenovírus tipo 5	Vírus Varicella-Zoster	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovírus	Vírus do Nilo Ocidental	<i>Staphylococcus aureus</i>	
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 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		

Especificidade analítica – substâncias interferentes

Níveis elevados de triglicéridos (até 34,5 g/l), de bilirrubina conjugada (0,25 g/l), de bilirrubina não conjugada (0,25 g/l), de albumina (58,7 g/l), de hemoglobina (2,9 g/l) e de ADN humano (2 mg/l) em amostras, assim como a presença de doenças autoimunes tais como lúpus eritematoso sistémico (LES), artrite reumatoide (AR) e anticorpos antinucleares (FAN) foram testados na presença e ausência de ARN de HIV.

Mais ainda, os fármacos listados na Tabela 23 foram testados com o triplo da $C_{\text{máx}}$ na presença e ausência de ARN de HIV.

Nenhuma das substâncias potencialmente interferentes demonstrou interferir com o desempenho do teste. Foram obtidos resultados negativos com o **cobas**® HIV-1 em todas as amostras sem alvo de HIV e resultados positivos em todas as amostras com alvo de HIV-1. O título médio de \log_{10} de uma das amostras de HIV-1 positivo contendo substâncias potencialmente interferentes estava $\pm 0,3 \log_{10}$ dentro do título médio de \log_{10} do respetivo controlo positivo.

Tabela 23 Fármacos testados relativamente à potencial interferência com a quantificação de ARN de HIV pelo **cobas® HIV-1**

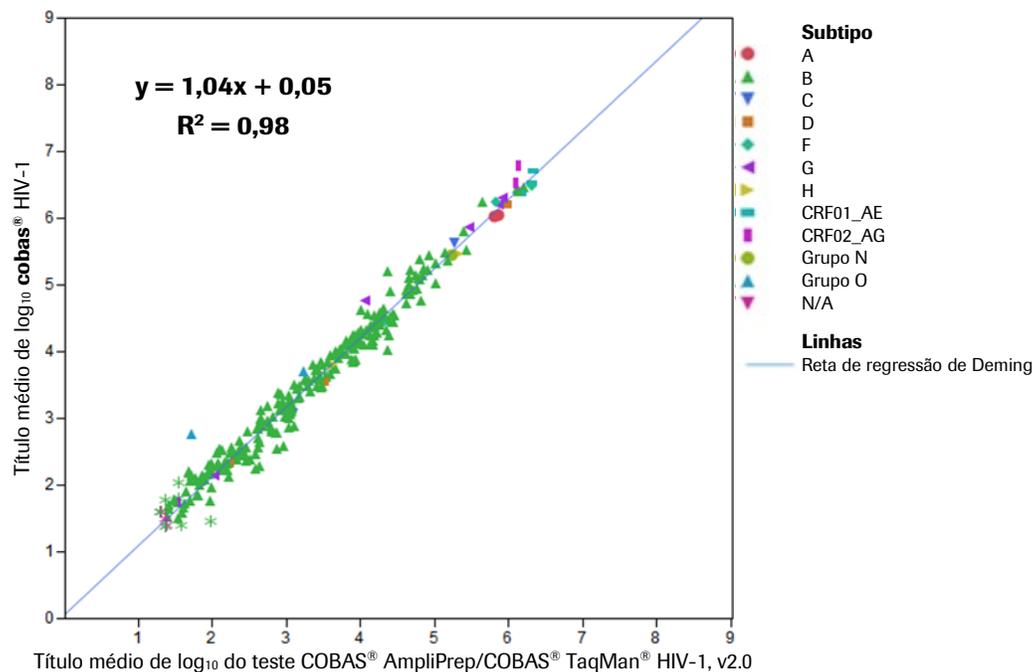
Classe do fármaco	Nome genérico do fármaco	
Moduladores de imunidade	Peginterferon α -2a	Peginterferon α -2b
	Ribavirina	
Inibidor de fusão de HIV	Maraviroc	
Inibidor de integrase de HIV	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Inibidores de transcriptase reversa não nucleotídica de HIV	Efavirenz	Nevirapine
	Etravirina	Rilpivirine
Inibidores de protease de HIV	Atazanavir	Lopinavir
	Tipranavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
Inibidor de protease de HCV	Boceprevir	Telaprevir
	Simeprevir	
Inibidores de transcriptase reversa ou de polimerase de ADN	Abacavir	Tenofovir
	Emtricitabine	Adefovir dipivoxil
	Entecavir	Telbivudine
	Foscarnet	Zidovudine
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudine	Valganciclovir
	Ganciclovir	Sofosbuvir
Composto para o tratamento de infeções oportunistas	Azithromycin	Pyrazinamide
	Clarithromycin	Rifabutin
	Ethambutol	Rifampicin
	Fluconazole	Sulfametoxazol
	Isoniazida	Trimetoprim

Correlação de métodos – desempenho comparado com o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0

Os desempenhos do **cobas® HIV-1** e do teste **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0** (teste **TaqMan® HIV-1, v2.0**) foram comparados através da análise de 251 amostras de plasma EDTA de pacientes infetados com HIV-1 e através da análise de 16 culturas sobrenadantes de células diluídas. As amostras abrangiam HIV-1M (A-D, F-H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O e HIV-1N e foram testadas em duplicado externamente. Foram gerados títulos abaixo do intervalo de quantificação (< 20 cp/ml) para uma das duas réplicas de cinco amostras tanto no **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® System** como no **cobas® 6800/8800 Systems**, e de cinco amostras somente no **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® System**. Uma amostra no **COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®** gerou apenas uma alíquota válida. Os títulos abaixo do intervalo de quantificação foram excluídos da análise. A regressão de Deming foi executada tendo em conta os títulos com transformação logarítmica. Nas amostras em que ambas as réplicas estavam dentro do intervalo de quantificação, o título médio de log₁₀ foi utilizado na análise.

Os resultados da regressão de Deming estão indicados na Figura 18. O símbolo * na Figura 18 indica determinação individual.

Figura 18 Análise de regressão do **cobas**® HIV-1 versus teste TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, amostras de plasma EDTA



Falha global do sistema

A taxa de falha do sistema global do **cobas**® HIV-1 foi determinada testando 100 réplicas de plasma EDTA ao qual foi adicionado HIV-1 grupo M subtipo B. Estas amostras foram testadas com uma concentração alvo de aproximadamente $3 \times \text{LoD}$.

Os resultados do estudo determinaram que todas as réplicas eram válidas e positivas para o alvo de HIV-1, originando uma taxa de falha do sistema global de 0%. O intervalo de confiança bilateral exato de 95% foi de 0% para o limite inferior e de 3,6% para o intervalo superior [0%: 3,6%].

Contaminação cruzada

Foi determinada a taxa de resíduos para o **cobas**® HIV-1, analisando 240 réplicas de uma amostra de plasma EDTA humano com HIV negativo e 225 réplicas de uma amostra de HIV-1 de título elevado a $4,00\text{E}+06$ cp/ml. O estudo foi realizado utilizando o **cobas**® 6800 System. No total, foram executadas cinco corridas com amostras positivas e negativas numa configuração de “tabuleiro de xadrez”.

Todas as 240 réplicas da amostra negativa eram negativas, originando uma taxa de resíduos de 0%. O intervalo de confiança bilateral exato de 95% foi de 0% para o limite inferior e de 1,5% para o intervalo superior [0%: 1,5%].

Características principais de desempenho para amostras de gotas secas de plasma PSC

Limite de detecção (LoD) utilizando o PSC

O limite de detecção no plasma do cobas® HIV-1 em combinação com o PSC foi determinado por análise de títulos de plasma atribuídos a diluições em série de sobrenadante de cultura de células de HIV-1 do grupo M, em sangue total humano negativo para HIV. Foram testados painéis de cinco níveis de concentração e ainda um negativo com três lotes de PSC e três lotes de reagentes de teste cobas® HIV-1, corridas múltiplas, dias, operadores e equipamentos diferentes. As amostras do membro mais elevado do painel foram centrifugadas e foi atribuído um título ao plasma pelo método de diluições seriadas do calibrador (CBM) utilizando o cobas® HIV-1 com o 3º padrão internacional da OMS para HIV-1, grupo M, subtipo B para preparação dos calibradores alto e baixo.

Os resultados combinados de três lotes de PSC, dados negativos e séries de diluições com atribuições de títulos de plasma individuais (CBM) são mostrados na Tabela 24. O estudo demonstra que o cobas® HIV-1, em combinação com o PSC, detetou ARN de HIV-1 a uma concentração de 790,2 cp/ml com uma taxa de positividade de 95% por análise Probit.

Tabela 24 Limite de detecção em combinação com o PSC

Concentração de título de plasma atribuído (ARN de HIV-1 cp/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
1971,1	62	62	100,00
1925,3	63	63	100,00
1358,1	62	62	100,00
985,5	63	62	98,41
962,6	63	62	98,41
679	63	59	93,65
657	63	59	93,65
641,8	63	57	90,48
452,7	63	52	82,54
328,5	63	47	74,60
320,9	63	46	73,02
226,3	62	49	79,03
164,3	63	36	57,14
160,4	63	35	55,56
113,2	63	38	60,32
0	189	0	0,00
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%	790,2 cp/ml; intervalo de confiança de 95%: 658,9-1003,6 cp/ml 1317 UI/ml; intervalo de confiança de 95%: 1098,2-1672,7 UI/ml		

Estimativa de LoD em sangue total

Os títulos correspondentes em sangue total da mesma amostra não podem ser determinados com exatidão, uma vez que o sangue total não é um tipo de amostra para testes de carga viral. Os títulos de sangue total baseados na quantidade de ARN de HIV-1 adicionada às amostras de sangue total não foram utilizados para estimativa do LoD porque a quantidade de ARN adicionada não corresponde necessariamente à quantidade de ARN no plasma. Mesmo após a centrifugação, o ARN pode permanecer na camada leuco-plaquetária (*buffy coat*) ou estar associado à fração celular do sangue total. No entanto, uma vez que outras tecnologias, como gotas de sangue seco, usaram títulos de sangue total adicionado para calcular o seu limite de detecção no sangue total, pode ser providenciada uma estimativa do LoD em sangue total PSC com base num fator empírico, o qual se presume que esteja relacionado com o teor médio de hematócritos (45%) das amostras (Tabela 25).

Os valores de LoD em sangue total são estimativas baseadas no pressuposto:

Estimativa de LoD em sangue total = LoD de plasma PSC ÷ 1,8

Tabela 25 Estimativa de LoD em sangue total

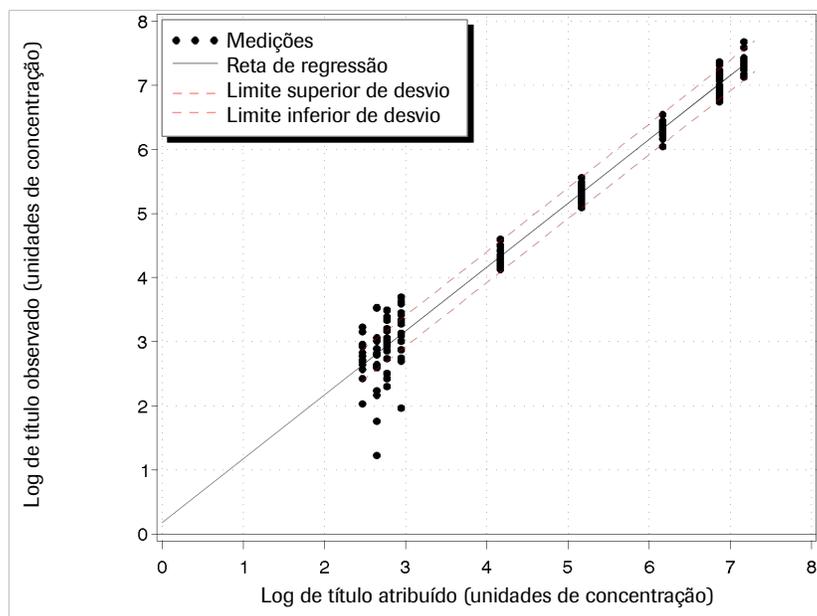
LoD por análise PROBIT (taxa de positividade de 95%)	439,0 cp/ml
Intervalo de confiança de 95%	366,1-557,6 cp/ml

Intervalo linear utilizando o PSC

O estudo da linearidade do cobas® HIV-1 em combinação com o PSC foi realizado com uma série de diluições constituída por um painel de 9 membros que abrangem o intervalo linear do HIV-1, grupo M, subtipo B predominante. Os membros do painel foram preparados a partir de amostra de sobrenadante de cultura de células com ARN de HIV-1 positivo de título elevado. A avaliação foi conduzida de acordo com a diretiva EP06-A do CLSI.²⁰ Foram analisados dois lotes de PSC de dois lotes de reagentes em dois cobas® 6800/8800 Systems, por três operadores e num total de 20 réplicas por membro do painel e por lote de reagentes/PSC.

As amostras de um membro do painel foram centrifugadas e foi atribuído um título ao plasma pelo método de diluições seriadas do calibrador (CBM) utilizando o cobas® HIV-1 com o 3º padrão internacional da OMS para HIV-1, grupo M de HIV-1, subtipo B para preparação dos calibradores alto e baixo.

Em combinação com o PSC, o cobas® HIV-1 é linear de 790 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml e exibe um desvio absoluto em relação ao método de regressão não linear mais ajustado de menos de $\pm 0,24 \log_{10}$ com o PSC (consulte a Figura 19). Ao longo do intervalo linear, a exatidão do teste estava dentro do desvio de $\pm 0,3 \log_{10}$ do ajuste da regressão linear.

Figura 19 Determinação do intervalo linear utilizando o PSC

Precisão – intra-laboratório utilizando o PSC

A precisão do **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC foi determinada através de análise de diluições em série de uma amostra de HIV-1 positiva alta (amostra de sobrenadante de cultura de células com ARN de HIV-1 positivo de título elevado) em sangue total EDTA negativo para HIV. Foram testados cinco níveis de diluição em 48 réplicas para cada nível e volume de processamento com dois lotes de PSC e dois lotes de reagentes de testes **cobas**® HIV-1, utilizando dois equipamentos e dois operadores ao longo de 12 dias. Cada amostra foi analisada de forma totalmente automática seguindo todo o fluxo de trabalho de PSC e todo o procedimento do teste **cobas**® HIV-1 em **cobas**® 6800/8800 Systems. A precisão aqui reportada representa todos os aspetos do procedimento de teste. Os resultados são exibidos na Tabela 26.

O **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC mostrou alta precisão em dois lotes de PSC e reagentes testados num intervalo de concentração de 2,00E+03 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml.

Tabela 26 Precisão intra-laboratório do **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC

Concentração medida (cp/ml em plasma EDTA centrifugado)	Material de origem	DP em pool
1,02E+07	Cultura celular	0,08
9,12E+05	Cultura celular	0,08
8,32E+04	Cultura celular	0,09
7,94E+03	Cultura celular	0,13
2,00E+03	Cultura celular	0,23

Verificação de subtipo utilizando o PSC

Embora o subtipo do HIV não deva afetar o desempenho do PSC, amostras de HIV-1 de cultura de subtipos comuns de HIV-1M (A, C e D) foram diluídas para um nível de concentração em sangue total. A determinação da precisão e da exatidão foi realizada com 12 réplicas para cada amostra. Os testes foram efetuados com 1 lote de PSC e 1 lote de reagentes **cobas**® HIV-1.

Cada amostra de sangue total foi centrifugada e foi atribuído um título ao plasma pelo método de diluições seriadas do calibrador (CBM) utilizando o **cobas**® HIV-1 com o 3º padrão internacional da OMS para HIV-1, grupo M de HIV-1, subtipo B para preparação dos calibradores alto e baixo.

Os resultados são exibidos na Tabela 27. Estes resultados confirmam que o **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC detetou e quantificou corretamente subtipos A, C e D de HIV-1M.

Tabela 27 Verificação de subtipos A, C e D de HIV-1, grupo M

Subtipo de HIV-1 M	N.º de réplicas válidas	Exatidão	Precisão	Equivalência de plasma vs. plasma PSC
Subtipo A	12	-0,13	0,14	-0,20
Subtipo C	12	-0,08	0,12	-0,10
Subtipo D	12	-0,04	0,11	-0,10

Especificidade utilizando o PSC

A especificidade do **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC foi determinada por análise de amostras de sangue total EDTA negativo para HIV de doadores individuais. No total, foram testadas 159 amostras de sangue total EDTA individuais com dois lotes de PSC e dois lotes de reagentes **cobas**® HIV-1. Todas as amostras tiveram resultado negativo relativamente a ARN de HIV-1. No painel de teste, a especificidade do **cobas**® HIV-1 foi 100% (intervalo de confiança de 95%: $\geq 98,13\%$).

Falha global do sistema utilizando o PSC

A taxa de falha global do sistema do **cobas**® HIV-1 em combinação com o PSC foi determinada testando 100 réplicas de sangue total EDTA ao qual foi adicionado HIV-1 grupo M subtipo B. Estas amostras foram testadas com uma concentração alvo de aproximadamente $3 \times \text{LoD}$.

Os resultados do estudo determinaram que todas as réplicas eram válidas e positivas para o alvo de HIV-1, originando uma taxa de falha do sistema global de 0%.

Desempenho de amostras de gota de plasma seco PSC comparado com amostras de plasma

O desempenho de amostras de gota de plasma seco PSC foi comparado com amostras de plasma EDTA centrifugadas por análise de 132 amostras de pacientes infectados com HIV-1 (FP = colheita prospectiva, VL = teste de carga viral, CD = amostras remanescentes de contagem CD4). As amostras foram testadas uma réplica cada (gota de plasma seco PSC e plasma EDTA) num local externo. Os títulos abaixo do intervalo de quantificação foram excluídos da análise. A regressão de Deming foi executada tendo em conta os títulos com transformação logarítmica.

Os resultados da regressão de Deming estão indicados na Figura 20. Os símbolos * e ● na Figura 20 mostram determinações individuais.

Figura 20 Regressão de Deming

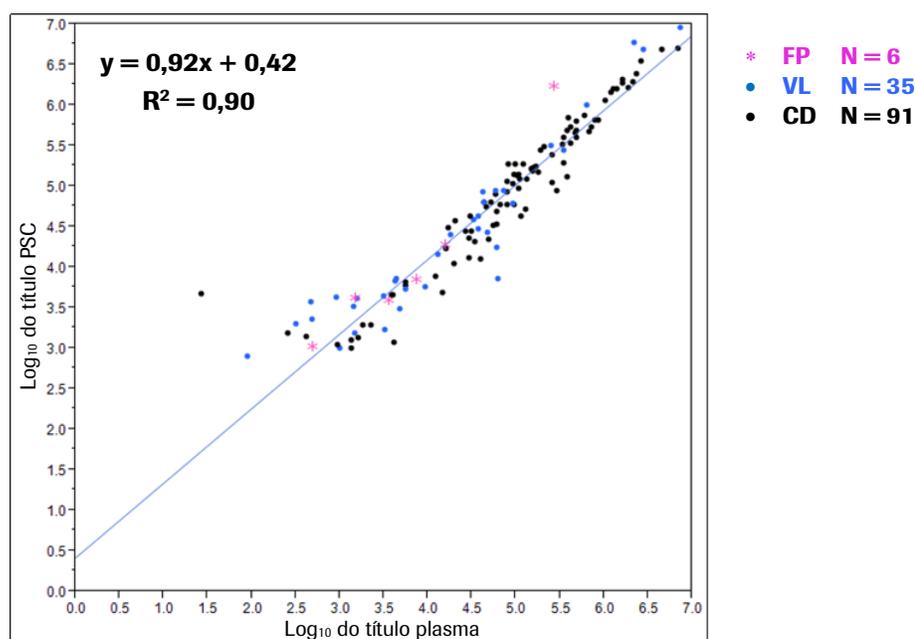


Tabela 28 Resumo dos dados estatísticos

Equivalência de matrizes (tipo de plasma)	Número de amostras com título válido	Análise de Bland-Altman		Análise de regressão de Deming		
		Diferença log ₁₀ média	95% IC [inferior/superior]	Declive	Interceção	R-quadrático
PSC vs plasma líquido	132	0,05	[-0,01; 0,11]	0,92	0,42	0,90

Avaliação do desempenho clínico

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do **cobas**® HIV-1 foi avaliada em plasma EDTA utilizando o volume de processamento de amostra de 500 µl no **cobas**® 6800 System. O estudo foi efetuado utilizando painéis elaborados a partir de stock bem caracterizado de vírus de cultura HIV-1 grupo M, subtipo B e de plasma EDTA que era negativo para ARN do HIV-1 e anticorpos do HIV-1/2. O painel de 8 membros incluía 1 membro do painel negativo e 7 membros do painel positivos cobrindo o intervalo linear do **cobas**® HIV-1, assim como pontos de decisão clínica chave para a utilização prevista, suportado pelas diretrizes do Department of Health and Human Services de 2015 para a utilização de agentes antirretrovirais em adultos e adolescentes infetados com o HIV-1.³ Os testes foram efetuados utilizando 3 lotes de reagente, 3 centros de teste, 2 operadores por centro, 2 corridas por dia, 6 dias de testes por lote de reagente e 3 réplicas por corrida.

A reprodutibilidade foi avaliada utilizando um modelo de efeitos aleatórios que incluía lote, centro, operador, dia, corrida e dentro da corrida. Tabela 29 indica a variação total, os desvios padrão (DP) da precisão total e os coeficientes de variação (CV) do lognormal para o **cobas**® HIV-1, conforme determinado por análise da variação. O componente de dentro da corrida foi o que contribuiu mais na variabilidade para a maioria dos membros do painel.

Tabela 29 Percentagem atribuível da variação total, desvio padrão da precisão total e CV do lognormal da quantificação do ARN do HIV por membro do painel positivo no **cobas**® 6800 System (reprodutibilidade)

Concentração de ARN do HIV (log ₁₀ cópias/ml)		N.º de testes ^c	Percentagem da variação total (CV(%))						Variação total CV(%) ^d
Esperado	Média ^a (DP) ^b		Lote	Centro	Operador	Dia	Execução	Dentro da corrida	
1,70	1,69 (0,191)	323	17% (18,23)	0% (0,00)	0% (0,00)	1% (3,42)	5% (9,66)	78% (40,32)	46,25
2,30	2,22 (0,116)	321	32% (15,15)	0% (0,00)	1% (2,26)	4% (5,60)	0% (0,00)	63% (21,55)	27,27
2,60	2,48 (0,102)	323	34% (13,84)	4% (4,85)	3% (3,75)	0% (0,00)	1% (2,74)	58% (17,99)	23,86
3,00	2,84 (0,092)	324	39% (13,30)	0% (0,00)	1% (2,01)	0% (0,00)	7% (5,67)	52% (15,37)	21,33
4,00	3,86 (0,081)	324	43% (12,33)	1% (1,94)	3% (3,34)	10% (5,82)	6% (4,54)	37% (11,39)	18,85
5,00	4,92 (0,084)	324	43% (12,64)	0% (0,00)	3% (3,56)	6% (4,65)	6% (4,52)	42% (12,60)	19,44
6,70	6,63 (0,087)	324	45% (13,60)	0% (0,00)	2% (3,00)	3% (3,42)	0% (0,00)	50% (14,23)	20,32

Nota: Esta tabela inclui apenas resultados com carga viral detetável.

^a Calculada utilizando o procedimento SAS MIXED baseado em medições transformadas de log₁₀.

^b Calculado utilizando a variabilidade total do procedimento SAS MIXED baseado em medições transformadas de log₁₀.

^c Número de testes válidos com carga viral detetável.

^d Modelo lognormal utilizado para CV(%) = $\sqrt{10^{[DP^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

CV(%) = percentagem do coeficiente de variação; HIV = vírus da imunodeficiência humana; N.º = número; ARN = ácido ribonucleico; DP = desvio padrão; sqrt = raiz quadrada.

Na Tabela 30 a seguir, a concordância na percentagem de negativos (CPN) para o cobas® 6800 System utilizando todos os testes válidos do membro do painel negativo foi de 100%.

Tabela 30 Concordância na percentagem de negativos utilizando o membro do painel negativo

Concentração de ARN de HIV esperada	N.º de testes	Resultados positivos	Resultados negativos	Concordância na percentagem de negativos ^a	IC de 95% ^b
Negativo	322	0	322	100,00	(98,86, 100,00)

^a CPN = (número de resultados negativos ÷ número total de testes válidos no membro do painel negativo) × 100.

^b Calculada usando o método de intervalo de confiança binomial exata de Clopper-Pearson.

IC = intervalo de confiança; HIV = vírus da imunodeficiência humana; N.º = número; CPN = concordância na percentagem de negativos; ARN = ácido ribonucleico.

Validação da quantificação da carga viral

O desempenho do cobas® HIV-1 no cobas® 6800 System foi comparado com o desempenho do teste aprovado pela FDA COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 (teste TaqMan® HIV-1, v2.0), por análise de amostras de plasma EDTA emparelhadas de 410 sujeitos com cargas virais de HIV-1 que abrangem o intervalo linear de ambos os testes. As características demográficas dos sujeitos estão indicadas na Tabela 31.

Tabela 31 Resumo das características demográficas

Características demográficas	Estatísticas
	(N = 410)
Idade (anos)	
Média (DP)	41,8 (11)
Mediana	43
Intervalo	19-72
Sexo, n (%)	
Homem	321 (78,3%)
Mulher	89 (21,7%)
Raça, n (%)	
Asian	5 (1,2%)
Negro	163 (39,8%)
Latino	17 (4,1%)
Branco	94 (22,9%)
Outra	91 (22,2%)
Desconhecido	40 (9,8%)
Etnia, n (%)	
Hispanico	101 (24,6%)
Não-hispanico	231 (56,3%)
Desconhecido	78 (19,0%)
Medicação antiviral, n (%)	
Sim	208 (50,7%)
Não	137 (33,4%)
Desconhecido	65 (15,9%)
Contagem de células CD4 (células/μl), n (%)	
N	391
Média (DP)	438,1 (267,7)
Mediana	401
Intervalo	0-1548

DP = desvio padrão.

Das 410 amostras emparelhadas testadas, 305 tinham medições de carga viral dentro do intervalo linear de ambos os ensaios. Tabela 32 indica a diferença média de carga viral emparelhada entre o **cobas**® HIV-1 e o teste TaqMan® HIV-1, v2.0.

Tabela 32 Média da diferença de carga viral emparelhada entre o **cobas**® HIV-1 e o teste TaqMan® HIV-1, v2.0

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
305	0,112	0,013	(0,086, 0,137)

IC = intervalo de confiança.

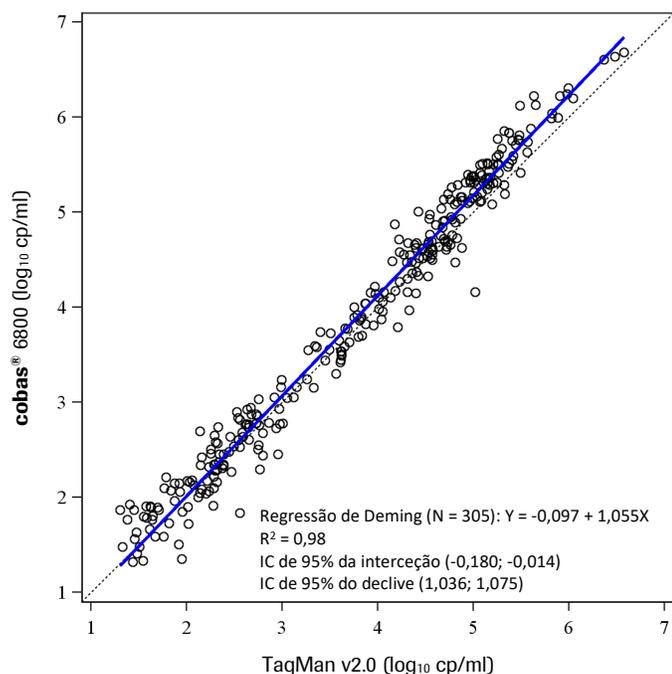
Os resultados da análise de regressão de Deming entre o **cobas**® HIV-1 e o teste TaqMan® HIV-1, v2.0 estão tabulados na Tabela 33 e apresentados graficamente na Figura 21. A linha a ponteadado indica uma concordância perfeita entre os dois métodos de teste.

Tabela 33 Estimativas de parâmetros da análise de regressão de Deming entre o **cobas**® HIV-1 no **cobas**® 6800 System e o teste TaqMan® HIV-1, v2.0

Número de amostras emparelhadas = 305				
Parâmetro	Estimativa do parâmetro (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão	IC de 95%	R ²
Interceção	-0,097	0,042	(-0,180, -0,014)	0,98
Declive	1,055	0,010	(1,036, 1,075)	

IC = intervalo de confiança.

Figura 21 Análise de regressão de Deming entre o **cobas**® HIV-1 no **cobas**® 6800 System e o teste TaqMan® HIV-1, v2.0



Também foram testados subconjuntos de amostras emparelhadas para comparar resultados do **cobas**® HIV-1 utilizado volumes de processamento de amostras de 200 µl e 500 µl em ambos os **cobas**® 6800 e **cobas**® 8800 Systems. Todas as comparações indicaram uma média de diferença emparelhada de menos de 0,095 log₁₀ cópias/ml.

Para a comparação entre os volumes de amostra, a Tabela 34 mostra a diferença emparelhada média entre os resultados do cobas® HIV-1 utilizando os volumes de processamento de amostras de 200 µl e 500 µl no cobas® 6800 System.

Tabela 34 Média da diferença de carga viral emparelhada entre os volumes de processamento de amostras de 200 µl e 500 µl no cobas® 6800 System

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
111	0,094	0,014	(0,067, 0,121)

IC = intervalo de confiança.

Tabela 35 mostra a diferença emparelhada média entre os resultados do cobas® HIV-1 utilizando os volumes de processamento de amostras de 200 µl e 500 µl no cobas® 8800 System.

Tabela 35 Média da diferença de carga viral emparelhada entre os volumes de processamento de amostras de 200 µl e 500 µl no cobas® 8800 System

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
111	0,080	0,012	(0,056, 0,105)

IC = intervalo de confiança.

Para a comparação entre os sistemas, a Tabela 36 indica a diferença emparelhada média entre os resultados do cobas® HIV-1 no cobas® 6800 System e no cobas® 8800 System utilizando o volume de processamento de amostra de 200 µl.

Tabela 36 Média da diferença de carga viral emparelhada entre o cobas® 6800 System e o cobas® 8800 System utilizando o volume de processamento de amostra de 200 µl

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
109	0,011	0,013	(-0,014, 0,036)

IC = intervalo de confiança.

Tabela 37 indica a diferença emparelhada média entre os resultados do cobas® HIV-1 no cobas® 6800 System e no cobas® 8800 System utilizando o volume de processamento de amostra de 500 µl.

Tabela 37 Média da diferença de carga viral emparelhada entre o cobas® 6800 System e o cobas® 8800 System utilizando o volume de processamento de amostra de 500 µl

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
123	-0,001	0,012	(-0,024, 0,022)

IC = intervalo de confiança.

Também foi testado um subconjunto de amostras emparelhadas abrangendo o intervalo linear de ensaio, para comparar os resultados do cobas® HIV-1 de tubos de preparação de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de teste de diagnóstico molecular e tubos de plasma EDTA plasma tubes sem um separador de gel. Esta comparação foi efetuada utilizando o cobas® 6800 System. Os resultados são exibidos na Tabela 38.

Tabela 38 Média da diferença de carga viral emparelhada entre tubos de preparação de plasma BD Vacutainer® PPT™ e tubos de plasma EDTA

Número de amostras emparelhadas	Média de diferença emparelhada (log ₁₀ cópias/ml)	Erro padrão da média da diferença emparelhada	IC de 95% da média da diferença emparelhada
42	0,026	0,027	(-0,029, 0,081)

IC = intervalo de confiança.

Avaliação clínica

Foi examinada a utilização do cobas® HIV-1 na monitorização de sujeitos infetados com o HIV-1 sob terapia antirretroviral, testando amostras de participantes num estudo clínico de fase III efetuado pela Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. (BI), número do estudo BI 1100.1486 (estudo VERxVE) utilizando o volume de processamento de amostras de 500 µl no cobas® 6800 System. Foram incluídos os sujeitos que tivessem volume de amostra suficiente para até 144 semanas de seguimento do cobas® HIV-1 e não tenham descontinuado o estudo VERxVE devido a eventos adversos. Os resultados de carga viral após 24 a 48 semanas de tratamento utilizando um limiar de 50 cópias/ml e um limiar de 200 cópias/ml, foram comparados a uma definição virológica de insucesso da terapia. Uma falha virológica foi definida como uma carga viral maior ou igual a 50 cópias/ml na última visita do estudo do sujeito depois de pelo menos 48 semanas de tratamento.

A Tabela 39 apresenta as características demográficas dos 355 sujeitos incluídos no estudo.

Tabela 39 Características demográficas

Características demográficas	Estatísticas
	(N = 355)
Idade (anos)	
Média (DP)	38 (9,3)
Mediana	38
Intervalo	19-68
Sexo, n (%)	
Homem	322 (90,7%)
Mulher	33 (9,3%)
Raça/Etnia, n (%)	
Asian	5 (1,4%)
Negro/Afro-americano	45 (12,7%)
Branco/Caucasiano	303 (85,4%)
Outra	2 (0,6%)
Contagem de CD4 no rastreio (células/μl), n (%)	
50 a < 200	117 (33,0%)
200 a < 350	209 (58,9%)
350 a < 400	17 (4,8%)
\geq 400	9 (2,5%)
Desconhecido	3 (0,8%)

DP = desvio padrão.

Os resultados das comparações que usam os limiares de 50 cópias/ml e 200 cópias/ml a 24 e a 48 semanas de tratamento com falha virológica são apresentados na Tabela 40 e Tabela 41.

As análises do limiar virológico de 50 cópias/ml com falha virológica (à semana 24 e à semana 48) estão indicadas na Tabela 40. À semana 24, o VPP era de 15,6% (10/64, IC de 95%: 7,8%, 26,9%), e à semana 48, o VPP era de 25,7% (9/35, IC de 95%: 12,5%, 43,3%). À semana 24, o VPN era de 90,9% (251/276, IC de 95%: 86,9%, 94,1%), e à semana 48, o VPN era de 91,1% (285/313, IC de 95%: 87,3%, 94%). À semana 24, a RP (razão de probabilidades) era de 1,86 (IC de 95%: 0,75, 4,29), que não era estatisticamente significativo ($p = 0,191$). À semana 48, a RP (razão de probabilidades) era de 3,51 (IC de 95%: 1,31, 8,71), que era estatisticamente significativo ($p = 0,012$).

Tabela 40 Comparação de um limiar virológico de 50 cópias/ml com falha virológica

Visita em tratamento	Limiar virológico	Falha virológica ^a		Total
		Sim	Não	
Semana 24	≥ 50 cp/ml	10	54	64
	< 50 cp/ml	25	251	276
	Total	35	305	340 ⁺
Semana 48	≥ 50 cp/ml	9	26	35
	< 50 cp/ml	28	285	313
	Total	37	311	348 ⁺

⁺ Resultados válidos obtidos pelo cobas® HIV-1.

^a A falha virológica é classificada como “Sim” se a carga viral de uma amostra for maior ou igual a 50 cp/ml à semana 144 ou à visita final se não houve visita na semana 144. A visita final teve de ser a semana 48 ou mais tarde.

Quando limiares de 200 cp/ml foram utilizados para definir falha virológica, conforme indicado na Tabela 41, à semana 24, o VPP era de 22,2% (2/9, IC de 95%: 2,8%, 60%), e à semana 48, o VPP aumentou para 100% (2/2, IC de 95%: 15,8%, 100%). À semana 24, o VPN era de 90,0% (298/331, IC de 95%: 86,3%, 93%), e à semana 48, o VPN era de 89,9% (311/346, IC de 95%: 86,2%, 92,9%). À semana 24, a RP (razão de probabilidades) era de 2,57 (IC de 95%: 0,25, 14,27), que não era estatisticamente significativo ($p = 0,469$). À semana 48, a RP (razão de probabilidades) era de 20,76 (IC de 95%: 2,46, não calculável), que era estatisticamente significativo ($p = 0,022$).

Tabela 41 Comparação de um limiar virológico de 200 cópias/ml com falha virológica

Visita em tratamento	Limiar virológico	Falha virológica ^a		Total
		Sim	Não	
Semana 24	≥ 200 cp/ml	2	7	9
	< 200 cp/ml	33	298	331
	Total	35	305	340 ⁺
Semana 48	≥ 200 cp/ml	2	0	2
	< 200 cp/ml	35	311	346
	Total	37	311	348 ⁺

⁺ Resultados válidos obtidos pelo cobas® HIV-1.

^a A falha virológica é classificada como “Sim” se a carga viral de uma amostra for maior ou igual a 50 cp/ml à semana 144 ou à visita final se não houve visita na semana 144. A visita final teve de ser a semana 48 ou mais tarde.

Todas as razões de probabilidades (RP) foram acima de 1 e aumentaram entre as 24 e as 48 semanas de tratamento. Foram vistas as razões de probabilidades estatisticamente significativas de ambos os limiares à semana 48. Em ambos os limiares, o VPN alto demonstra a capacidade do teste de prever que pacientes não estão a ter insucesso da terapia a cada ponto no tempo.

A análise das razões de probabilidades também demonstrou que em pacientes em terapia, as medições de carga viral que são superiores aos limiares indicados, têm maior probabilidade de correlação com a subsequente falha virológica (valor preditivo positivo, ou VPP). No entanto, o pequeno número de insucessos da terapia no estudo, limitou a análise estatística do VPP para falha virológica.

Além disso, o desempenho clínico do **cobas**® HIV-1 com o dispositivo de colheita de amostras **cobas**® Plasma Separation Card (PSC) foi avaliado em estudos externos que suportam a utilização do PSC para uma monitorização da carga viral do HIV-1 precisa, viável e fiável.²¹

Conclusão

O **cobas**® HIV-1 pode quantificar com fiabilidade o HIV-1 e monitorizar a resposta à terapia antirretroviral. Os resultados destes estudos suportam a utilidade do teste na gestão clínica de pacientes infetados pelo HIV-1.

Equivalência dos sistemas/comparação dos sistemas

Foi demonstrada a equivalência dos sistemas **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 e **cobas**® 8800 através de estudos de desempenho.

Os resultados apresentados nas Instruções de utilização, suportam um desempenho equivalente em todos os sistemas.

Informações adicionais

Características chave de teste para amostras de plasma EDTA

Tipo de amostra	Plasma EDTA
Quantidade de amostra mínima necessária	650 µl ou 350 µl
Volume de processamento de amostras	500 µl ou 200 µl
Sensibilidade analítica	13,2 cp/ml (500 µl) 35,5 cp/ml (200 µl)
Intervalo linear	500 µl: 20 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml 200 µl: 50 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml
Especificidade	100% (intervalo de confiança unilateral de 95%: 99,5%)
Genótipos detetados	HIV-1M (A-D, F-H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O, HIV-1N

Características chave de teste para amostras de gota de plasma seco PSC

Tipo de amostra	Gota seca de plasma proveniente de Plasma Separation Card
Quantidade de amostra mínima necessária	140 µl de sangue total
Volume de processamento de amostras	850 µl
Sensibilidade analítica	790,2 cp/ml
Intervalo linear	790 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml
Especificidade	100% (intervalo de confiança unilateral de 95%: 98,3%)

Símbolos

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

Tabela 42 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

 Age/DOB	Idade ou data de nascimento		Dispositivo não para testes efetuados próximo dos pacientes	 QS IU/PCR	UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
 SW	Software auxiliar		Dispositivo não para autotestes	 SN	Número de série
 Assigned Range [copies/mL]	Intervalo atribuído (cópias/ml)		Distribuidor <i>(Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)</i>	 Site	Centro
 Assigned Range [IU/mL]	Intervalo atribuído (UI/ml)		Não reutilizar	 Procedure Standard	Procedimento padrão
 EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Mulher	 STERILE EO	Esterilizado com óxido de etileno
 BARCODE	Folha de dados de códigos de barras		Apenas para avaliação do desempenho IVD		Armazenar no escuro
 LOT	Número do lote	 GTIN	Global Trade Item Number		Limite de temperatura
	Risco biológico		Importador	 TDF	Ficheiro de definição de teste
 REF	Referência de catálogo	 IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Este lado para cima
	Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 LLR	Limite inferior do intervalo atribuído	 Procedure UltraSensitive	Procedimento ultrasensível
 Collect Date	Data da colheita		Homem	 UDI	Identificação exclusiva do equipamento
	Consulte as instruções de utilização		Fabricante	 ULR	Limite superior do intervalo atribuído
	Conteúdo suficiente para <n> testes	 CONTROL -	Controlo negativo	 Urine Fill Line	Linha de enchimento da urina
 CONTENT	Conteúdo do kit		Não esterilizado	 Rx Only	Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.
 CONTROL	Controlo		Nome do paciente		Prazo de validade
	Data do fabrico		Número do paciente		
	Dispositivo para testes efetuados próximo dos pacientes		Abra aqui		
	Dispositivo para autotestes	 CONTROL +	Controlo positivo		
 QS copies / PCR	Cópias QS por reação PCR, utilize as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.				

Assistência técnica

Para apoio técnico (assistência) entre em contacto com a sua filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante e importador

Tabela 43 Fabricante e importador



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

Fabricado nos EUA



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany

Marcas comerciais e patentes

Este produto está coberto por um ou mais patentes dos EUA n.ºs 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993, 10358675, 8129118 e 6727067, e respetivas patentes estrangeiras equivalentes.

COBAS, COBAS OMNI, AMPERASE, AMPLIPREP e TAQMAN são marcas comerciais da Roche.

A marca comercial “Armored RNA®” é propriedade da Asuragen, Inc. e da Cenetron Diagnostics, Ltd.

ProClin® é uma marca registada da Rohm and Haas Company.

Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

A tecnologia de prevenção de carryover na enzima AmpErase® está coberta pela patente dos EUA n.º 7,687,247 de propriedade da Life Technologies e licenciada para a Roche Molecular Systems, Inc.

Certos componentes deste produto estão cobertos por uma ou mais patentes dos EUA e pelas respetivas patentes estrangeiras equivalentes emitidas para a Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. e licenciadas para a Roche Molecular Systems, Inc. e a F. Hoffman-La Roche Ltd.

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

Direitos de autor

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Str. 116
 68305 Mannheim
 Germany



Bibliografia

1. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997;126:946-54. PMID: 9182471.
2. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA.* 2007;297:2349-50. PMID: 17551128.
3. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/guidelines/documents/AdultandAdolescentGL.pdf>. Accessed December 3, 2020.
4. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 2011;365:493-505. PMID: 21767103.
5. Phillips AN, Pillay D, Garnett G, et al. Effect on transmission of HIV-1 resistance of timing of implementation of viral load monitoring to determine switches from first to second-line antiretroviral regimens in resource-limited settings. *AIDS.* 2011;25:843-50. PMID: 21192233.
6. Sigaloff KC, Hamers RL, Wallis CL, et al. Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two arguments for viral load monitoring in Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;58:23-31. PMID: 21694603.
7. European AIDS Clinical Society. European AIDS Clinical Society 2017 Guidelines. https://www.eacsociety.org/files/guidelines_9.0-english.pdf. Accessed December 3, 2020.
8. World Health Organization. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection – Recommendations for a Public Health Approach. <https://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/>. Accessed December 3, 2020.
9. Günthard HF, Aberg JA, Eron JJ, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA.* 2014;312:410-25. PMID: 25038359.
10. Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T. Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. *J Clin Virol.* 2011;52 Suppl 1:S83-9. PMID: 21995930.
11. Paba P, Fabeni L, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: a comparative study. *J Virol Methods.* 2011;173:399-402. PMID: 21419171.
12. Deeks SG. Durable HIV treatment benefit despite low-level viremia: reassessing definitions of success or failure. *JAMA.* 2001;286:224-6. PMID: 11448286.
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. PMID: 2227421.

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. PMID: 7845459.
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. PMID: 7697717.
16. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
17. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>. Accessed December 2, 2020.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. https://clsi.org/media/1459/m29a4_sample.pdf. Accessed December 2, 2020.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP06-A. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. https://clsi.org/media/1437/ep06a_sample.pdf. Accessed October 3, 2020.
21. Vubil A, Zicai AF, Siteo N, et al. Accurate HIV viral load measurement in primary health care settings using the **cobas**® plasma separation card. *PLoS One*. 2020;15:e0232122. PMID: 32374748.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 1.0 12/2020	Primeira publicação.
Doc Rev. 2.0 07/2021	Foram adicionadas informações específicas do cobas ® 5800. Adicionado endereço do importador. Removidos endereços de distribuidores. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.