Rx Only

cobas® HIV-1

Teste de ácidos nucleicos para uso no sistema cobas® 4800

Para uso em diagnóstico *in vitro*

cobas® HIV-1	120 Tests	P/N: 08792992190
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	10 Sets	P/N: 06979572190
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979513190 P/N: 06979521190
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235863190 P/N: 05235871190
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2	240 Tests	P/N: 06979556190
cobas® 4800 System Lysis Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979530190 P/N: 06979548190

ÍNDICE

Intenção de uso

Informação sobre os conteúdos 6

Resumo e explicação do cobas® HIV-1 para quantificação do RNA do HIV-1 em plasma e em gotas secas de plasma

Enquadramento 7

Fundamentação para testes quantitativos do HIV-1 7

Explicação do teste quantitativo 8

Princípios do procedimento 8

Materiais e reagentes para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Reagentes 10

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent 15

Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes 16

Materiais adicionais necessários 16

Materiais adicionais necessários apenas para a aplicação de gota seca de plasma PSC 17

Glossário de termos simplificados para o teste quantitativo **cobas**® HIV-1 17

Instrumentos e software necessários mas não fornecidos, para o teste quantitativo **cobas**® HIV-1 18

Tubos de amostra suportados pelo teste quantitativo **cobas**® HIV-1 18

Precauções e requisitos de manuseio para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Alertas e precauções 19

Boas práticas de laboratório 20

Manuseio de reagentes 20

Contaminação 20

Integridade 21

Descarte 21

Derrames e limpeza 21

Coleta, transporte e armazenagem de amostras 22

Amostras de plasma EDTA 22

Amostras de gotas secas de plasma PSC 22

Instruções de uso para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Preparação da amostra de gota seca de plasma PSC e procedimento pré-analítico 24

Execução do teste quantitativo **cobas**® HIV-1 29

Tipos de amostras e volume de processamento do teste quantitativo **cobas**® HIV-1 29

Dimensão da corrida para o teste quantitativo **cobas**® HIV-1 29

Fluxos de trabalho para o teste quantitativo **cobas**® HIV-1 – bateria única e mista 29

Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste quantitativo do HIV-1 32

Bateria mista de fluxo de trabalho – Testes quantitativo e qualitativo (HIV-1-qual-DBS) do HIV-1..... 35

Resultados do teste quantitativo cobas® HIV-1

Controle de qualidade e validade dos resultados do teste quantitativo **cobas®** HIV-1..... 38

Interpretação dos resultados de controle do teste quantitativo **cobas®** HIV-1..... 38

Interpretação dos resultados do teste quantitativo **cobas®** HIV-1..... 39

Lista de alarmes de resultados para o teste quantitativo **cobas®** HIV-1..... 40

Limitações processuais 41

Avaliação não clínica do desempenho do teste quantitativo cobas® HIV-1

Principais características de desempenho para amostras de plasma EDTA..... 42

Limite de detecção (LoD) para amostras de plasma EDTA 42

Faixa linear para amostras de plasma EDTA 43

Precisão - no laboratório para amostras de plasma EDTA 44

Verificação de grupo/subtipo para amostras de plasma EDTA..... 45

Verificação do limite de detecção dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N..... 45

Verificação da faixa linear dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N..... 46

Especificidade para amostras de plasma EDTA..... 46

Método de correlação para amostras de plasma EDTA..... 48

Falha global do sistema para amostras de plasma EDTA..... 49

Contaminação cruzada para amostras de plasma EDTA 49

Características principais de desempenho para amostras de gotas secas de plasma PSC..... 50

Limite de detecção (LoD)..... 50

Faixa linear utilizando o PSC..... 51

Precisão – intra-laboratório utilizando o PSC 52

Falha global do sistema utilizando o PSC..... 53

Desempenho de amostras de gotas secas de plasma PSC comparado com amostras de plasma..... 53

Resumo e explicação do cobas® HIV-1 para a detecção qualitativa de HIV-1 em gotas secas de sangue

Enquadramento..... 54

Fundamentação para testes qualitativos de HIV-1..... 54

Explicação do teste qualitativo de HIV-1..... 54

Princípios do procedimento 54

Materiais e reagentes para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Reagentes..... 56

Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes..... 61

Materiais adicionais necessários 62

Glossário de termos simplificados para o teste qualitativo **cobas**® HIV-1 63

Instrumentos e software necessário mas não fornecido para o teste qualitativo **cobas**® HIV-1 63

Tubos de amostra suportados pelo teste qualitativo **cobas**® HIV-1 64

Precauções e requisitos de manuseio para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Alertas e precauções 64

Boas práticas de laboratório 65

Manuseio de reagentes 65

Contaminação 66

Integridade 66

Descarte 66

Derrames e limpeza 66

Coleta, transporte e armazenagem de amostras 67

Gotas secas de sangue 67

Instruções de uso para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Preparação da amostra de gota seca de sangue DBS e procedimento pré-analítico 68

Execução de um teste qualitativo **cobas**® HIV-1 69

Tipo de amostra e volume de processamento do teste qualitativo **cobas**® HIV-1 69

Tamanho das corridas do teste qualitativo **cobas**® HIV-1 69

Fluxos de trabalho para o teste qualitativo **cobas**® HIV-1 69

Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) 71

Resultados do teste qualitativo cobas® HIV-1

Controle de qualidade e validade dos resultados do teste qualitativo **cobas**® HIV-1 73

Interpretação dos resultados de controle do teste qualitativo **cobas**® HIV-1 73

Interpretação de resultados do teste qualitativo **cobas**® HIV-1 74

Lista de alarmes de resultados para o teste qualitativo **cobas**® HIV-1 74

Limitações processuais 75

Avaliação não clínica do desempenho do teste qualitativo para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Principais características do desempenho de amostras de DBS 76

Limite de detecção (LoD) usando DBS 76

Repetibilidade usando DBS 77

Especificidade usando DBS 78

Correlação usando DBS 78

Falha global do sistema usando DBS 79

Informações adicionais

Principais características do ensaio para amostras de plasma EDTA 80
Características principais do ensaio para amostras de gotas secas de plasma PSC 80
Principais características do ensaio para amostras de DBS 80
Guia rápido de fluxos de trabalho 81
Símbolos 82
Suporte técnico 83
Fabricante 83
Marcas registradas e patentes 83
Direitos autorais 83
Referências 84
Revisão do documento 86

Intenção de uso

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 a partir de uma gota seca de plasma de um **cobas**® Plasma Separation Card (**PSC**) e para a detecção qualitativa do HIV-1 em gotas secas de sangue de indivíduos infectados com o HIV-1 incluindo crianças nascidas de mães infectadas com HIV-1. O teste deve ser usado com o sistema **cobas**® 4800. Este teste foi concebido para uso junto com a apresentação clínica e outros marcadores laboratoriais indicadores da progressão da doença, para o gerenciamento clínico de pacientes infectados pelo HIV-1.

Quando usado como teste quantitativo, esse teste pode ser usado como auxiliar no diagnóstico para confirmação de infecção com HIV-1 em indivíduos reativos a anticorpos e para avaliar o prognóstico do paciente medindo o nível de RNA do HIV-1 da linha de base, ou para monitorar os efeitos da terapia antirretroviral medindo as alterações no nível de RNA do HIV-1 ao longo do tratamento.

Quando usado como teste qualitativo com gotas secas de sangue, a detecção de ácidos nucleicos do HIV-1 é indicativa de infecção ativa pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas com HIV e que tenham anticorpos maternos do HIV-1. Esse teste também pode ser usado para a confirmação de infecção com HIV-1 em indivíduos reativos a antigênios ou anticorpos do HIV-1.

Informação sobre os conteúdos

O **cobas**® HIV-1 é constituído por um fluxo de trabalho quantitativo e um fluxo de trabalho qualitativo, e ambos os fluxos de trabalho compartilham o mesmo kit de amplificação/detecção e o mesmo kit de controles. No entanto, o teste quantitativo e o teste qualitativo têm diferenças fundamentais e, por isso, as descrições dos dois testes são disponibilizadas em seções independentes.

Nas primeiras seções desse documento, são dadas informações relativas ao resumo e à explicação do teste quantitativo **cobas**® HIV-1, os materiais e reagentes necessários, as precauções e os requisitos de manuseio, as instruções de uso, os resultados e a avaliação do desempenho não clínico. A essas informações seguem seções equivalentes abrangendo o teste qualitativo **cobas**® HIV-1.

Resumo e explicação do cobas® HIV-1 para quantificação do RNA do HIV-1 em plasma e em gotas secas de plasma

Enquadramento

O HIV é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Geralmente, após a seroconversão, os indivíduos infectados entram em uma fase clinicamente estável e relativamente assintomática que pode durar anos. O período assintomático é caracterizado por viremia persistente no plasma em níveis variáveis, determinados pela genética 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 virais parecem ser processos dinâmicos em que as elevadas taxas de produção de vírus e a infecção de células $CD4^+$ são compensadas por elevadas taxas de eliminação de vírus, morte das células infectadas e reposição de células $CD4^+$, resultando em níveis relativamente estáveis da viremia do plasma e de células $CD4^+$ durante aproximadamente 8 anos em uma pessoa comum vivendo com HIV.

Medições quantitativas de viremia de HIV no plasma demonstraram que níveis superiores de 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 reduções nos níveis de vírus no plasma com o uso de terapia antirretroviral (TARV) diminuem significativamente o risco de progressão clínica, incluindo a morte, do desenvolvimento de AIDS, de infecções oportunistas e da morbilidade associada ao HIV.[3] A carga viral de HIV também é indicativa do risco de transmissão de HIV e ensaios clínicos controlados e aleatórios estabeleceram que um início precoce de TARV com supressão da carga viral reduz a transmissão de HIV em 96%.[4]

Fundamentação para testes quantitativos do HIV-1

No momento está disponível um grande número de fármacos antirretrovirais, dirigidos à protease, integrase, cápsula e 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 do HIV-1. Os testes de resistência tornaram-se uma ferramenta de diagnóstico importante no gerenciamento de infecções com HIV-1 e são iniciados assim que a carga viral de um paciente se tiver elevado a um nível detectável mediante ensaios de sequenciação. Sobretudo foi demonstrado que a monitoração da carga viral reduz o risco de resistência aos fármacos e é clinicamente considerada um indicador sentinela de replicação viral ativa, prevendo a evolução viral em pacientes em terapia.[5, 6] Por isso, diversas diretrizes nacionais e internacionais recomendam que a carga viral de HIV-1 seja medida.[3, 7-9]

Durante vários anos, as diretrizes indicavam que o principal objetivo da terapia era a supressão da carga viral de HIV-1 abaixo do limite de detecção de um teste (p. ex., 50 cópias/ml). Em 2011, as diretrizes do tratamento do HIV nos EUA começaram indicando que resultados de carga viral de até 200 cópias/ml em pacientes em terapia TARV podem não ser indicativos de fracasso do tratamento.[3] As diretrizes europeias continuam recomendando o uso de 50 cópias/ml como o limiar para a determinação do fracasso do tratamento.[7] O limiar correto a usar não foi determinado em um ensaio clínico rigoroso. Pequenas diferenças entre testes de carga viral podem originar diferenças importantes na interpretação clínica de resultados de carga viral ao monitorar a resposta do tratamento,[10, 11] visto que o objetivo do tratamento é a supressão do vírus a um nível abaixo do qual a ocorrência de resistência aos fármacos é menos provável, nível esse que não se encontra totalmente definido.[12] Em julho de 2013, a OMS também começou recomendando o uso de testes de carga viral em locais com recursos limitados, determinando 1000 cópias/ml como limite para definir o fracasso virológico com

necessidade de tomada de decisões para o gerenciamento do tratamento. Atualmente, a OMS também recomenda o uso de amostras de gota seca para expandir o alcance dos testes de carga viral em locais com recursos limitados sem acesso imediato a serviços de flebotomia ou capacidades robustas de transporte de amostras de plasma EDTA.[13] Uma gota seca de plasma **PSC**, que também estabiliza o RNA do HIV em plasma seco, pode melhorar a abrangência dos testes de carga viral nesses locais, permitindo o transporte de amostras em distâncias mais longas e em condições ambientais mais rigorosas do que as do plasma EDTA.

Além da monitoração da resposta à terapia, as diretrizes recomendam o uso de uma avaliação da carga viral para determinar se um paciente cuja contagem de células CD4+ é superior a 500 células/mm^3 (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 em pacientes adequados (pacientes com uma carga viral superior a 1000 cópias/ml ou com uma resposta à carga viral insuficiente). O uso de uma avaliação de carga viral deve ser feito no período pré-natal para determinar se é necessário um parto 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 quantitativo

O **cobas**® HIV-1 pode ser usado como teste quantitativo de ácidos nucleicos executado no sistema **cobas**® 4800. O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 permite a detecção e quantificação de RNA do HIV em plasma EDTA ou a partir de uma gota seca de plasma **PSC** de pacientes infectados. São usadas duas sondas para detectar e quantificar, mas não descriminar, subtipos de grupo M, N e O. A carga viral é quantificada em comparação com um padrão de quantificação de armored RNA (RNA QS) sem HIV, que é introduzido em cada amostra durante o processamento de amostras. O RNA QS funciona como um controle interno para monitorar toda a preparação de amostras e o processo de amplificação por PCR. Além disso, o teste usa três controles externos: um positivo de título elevado, um positivo de título baixo e um controle negativo.

Princípios do procedimento

O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 baseia-se na preparação totalmente automatizada da amostra (extração e purificação do ácido nucleico) seguida de amplificação por PCR e detecção. O sistema **cobas**® 4800 é constituído pelo instrumento de preparação de amostras **cobas**® x 480 e o analisador PCR em tempo real **cobas**® z 480. O gerenciamento automático de dados é executado pelo software **cobas**® 4800, que atribui resultados de teste a todos os testes como alvo não detectado, < LLoQ (limite inferior de quantificação), > ULoQ (limite superior de quantificação) ou RNA de HIV detectado, um valor na faixa linear LLoQ ≤ x ≤ ULoQ. Os resultados podem ser revisados diretamente na tela do sistema, exportados ou impressos como um relatório.

Os ácidos nucleicos de amostras de pacientes, controles externos e moléculas RNA QS são extraídos simultaneamente. Resumidamente, os ácidos nucleicos virais são liberados mediante a adição de proteinase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos liberados ligam-se à superfície de sílica das partículas magnéticas de vidro adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR, são removidas com os passos seguintes do reagente de lavagem e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas com tampão de eluição a elevada temperatura.

A amplificação seletiva dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida mediante o uso de primers senso e anti-senso específicos do vírus-alvo que são selecionados de regiões altamente conservadas do HIV. 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 obtida mediante o uso de primers senso e anti-senso específicos da sequência-alvo que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com o genoma do HIV. É usada uma enzima DNA polimerase termoestável tanto para a transcrição reversa quanto para a amplificação por PCR. As sequências-alvo e de RNA QS são amplificadas simultaneamente usando um

perfil de amplificação por PCR universal com número de ciclos e passos de temperatura predefinidos. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no DNA recém sintetizado (amplicon).[14-16] Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados durante o primeiro passo do ciclo térmico, pela enzima AmpErase, que é incluída na mistura principal da PCR. No entanto, qualquer amplicon acabado de formar não é eliminado, visto que a enzima AmpErase fica inativa quando exposta a temperaturas superiores a 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® HIV-1 contém duas sondas de detecção específicas para as sequências-alvo de HIV-1 e uma para o RNA QS. As sondas estão identificadas com corantes sinalizadores fluorescentes específicos do alvo, que permitem a detecção simultânea de alvo de HIV-1 e de RNA QS em dois canais de detecção diferentes.[17, 18] Quando não ligados à sequência-alvo, os sinais fluorescentes das sondas intactas são suprimidos por um corante supressor. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o DNA alvo específico em cadeia simples resulta na sua clivagem pela atividade exonuclease 5' a 3' da DNA polimerase, resultando na 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 detecção e a discriminação em tempo real dos produtos da PCR são conseguidas medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores liberados, para os alvos virais e para o RNA QS.

Materiais e reagentes para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Reagentes

Todos os reagentes e controles não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na tabela Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes.

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® HIV-1 120 testes (P/N: 08792992190)	**MMX R1** (Reagente 1 de mistura principal **cobas**®) Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida de sódio	10 × 1,75 ml	N/A
	HIV-1 MMX R2 (Reagente 2 de mistura principal **cobas**® HIV-1) Tampão de tricina, acetato de potássio, 18% de dimetil sulfóxido, glicerol, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,12% de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01% de primers de 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, < 0,01% aptâmero de oligonucleotídeo, < 0,01% de DNA polimerase Z05D (de origem microbiana), < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida de sódio	10 × 0,5 ml	N/A
	RNA QS (Padrão de quantificação de RNA **cobas**®) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de regiões de sequências específicas de sondas e primer que contém construção de armored RNA não relacionado com HIV (RNA não infeccioso em bacteriófago MS2), < 0,1% de azida de sódio	10 × 1,75 ml	N/A

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit 10 conjuntos (P/N: 06979572190)	**HBV/HCV/HIV-1 L(+)C** (Controle positivo baixo do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1) < 0,001% de (armored) RNA sintético 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) RNA sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	 **ALERTA** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261 Evite respirar as poeiras/fumos/gases/ névoas/vapores/aerossóis. P272 A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280 Use luvas de proteção. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P362 + P364 Dispa a roupa contaminada e lave antes de usar novamente. P501 Elimine o conteúdo/recipiente em uma 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)
	HBV/HCV/HIV-1 H(+)C (Controle positivo alto do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1) < 0,001% de (armored) RNA sintético 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) RNA sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	
	(–) C (Controle negativo **cobas**®) Plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectável por métodos de PCR < 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 240 testes (P/N: 06979513190)	**MGP 2** (Reagente 2 **cobas**® 4800 MGP) Partículas de vidro magnéticas, tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 8 ml	N/A
	EB 2 (Tampão de eluição 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 960 testes (P/N: 06979521190)	**MGP 2** (Reagente 2 **cobas**® 4800 MGP) Partículas de vidro magnéticas, tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 16 ml	
	EB 2 (Tampão de eluição 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 testes (P/N: 05235863190)	**WB** (**cobas**® 4800 System Wash Buffer) Citrato de sódio desidratado, 0,05% de metil-N isotiazolinona HCl	10 × 55 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 testes (P/N: 05235871190)	**WB** (**cobas**® 4800 System Wash Buffer) Citrato de sódio desidratado, 0,05% de metil-N isotiazolinona HCl	10 × 200 ml	N/A
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2 240 testes (P/N: 06979556190)	**SD 2** (**cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2) Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 8 ml	N/A

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 240 testes (P/N: 06979530190)	**P 2** (Protease 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase[b]	10 × 1,0 ml	 **PERIGO** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334 Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261 Evite respirar névoas ou vapores. P280 Use luvas de proteção. P284 Use proteção respiratória. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311 Em caso de sintomas respiratórios: Contate um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 39450-01-6 Proteinase, *Tritirachium album* serine
	LYS 2 (Tampão de lise 2 **cobas**® 4800) 43% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 5% (p/v) de polidocanol[b], 2% (p/v) de ditiotreitol[b], citrato de sódio dihidratado	10 × 27 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H411 Tóxico para organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. EUH071 Corrosivo para as vias respiratórias. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/ proteção ocular/proteção facial/ proteção auditiva. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P391 Colete o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 960 testes (P/N: 06979548190)	**P 2** (Protease 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase[b]	10 × 1,0 ml	 **PERIGO** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334 Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261 Evite respirar névoas ou vapores. P280 Use luvas de proteção. P284 Use proteção respiratória. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311 Em caso de sintomas respiratórios: Contate um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 39450-01-6 Proteinase, *Tritirachium album* serine
	LYS 2 (Tampão de lise 2 **cobas**® 4800) 43% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 5% (p/v) de polidocanol[b], 2% (p/v) de ditiotreitol[b], citrato de sódio dihidratado	10 × 84 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H411 Tóxico para organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. EUH071 Corrosivo para as vias respiratórias. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/ proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P391 Colete o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol

[a] A rotulagem relativa à segurança de produtos tem como base principalmente a diretriz GHS da UE

[b] Substância perigosa

cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent

Nota: este reagente é opcional e apenas deve ser usado junto com o cobas® Plasma Separation Card (PSC) para gerar amostras de gotas secas de plasma. Veja o folheto informativo do PSC ms_09411763190.

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (P/N 08064695190)	**SPER** (**cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent) 28% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 6% (p/v) de polidocanol[b], 1% (p/v) de ditiotreitol, citrato de sódio dihidratado	15 × 40 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P301 + P330 + P331 SE INGERIDO: enxague a boca. NÃO induza o vômito. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol

[a] A rotulagem relativa à segurança de produtos tem como base principalmente a diretriz GHS da UE

[b] Substância perigosa

Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes

Reagente	Temperatura de armazenagem	Tempo de armazenagem
cobas® HIV-1	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	15-25 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Lysis Kit 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada

Não congele os reagentes.

Materiais adicionais necessários

Materiais	P/N
Placa de extração (poços profundos) do sistema **cobas**® 4800 2,0 ml	06884008001
Placa AD (micro poços) do sistema **cobas**® 4800 0,3 ml	05232724001
Aplicador de película vedante	04900383001
Ponteiras CORE, 1000 µl, rack de 96	04639642001
Reservatório de reagente de 200 ml	05232759001
Reservatório de reagente de 50 ml	05232732001
Suporte de 24 posições	04639502001
Suporte de 32 posições	04639529001
Saco de resíduos sólidos	05530873001 (pequeno) ou 04691989001 (grande)
Manga plástica Hamilton STAR	04639669001
Luvas de laboratório, sem pó	São aceitáveis quaisquer luvas de laboratório sem pó.
Misturador Vortex (tubo único)	É aceitável qualquer misturador Vortex.
Centrífuga equipada com um rotor de cestos oscilantes com um RCF mínimo de 1500	Qualquer centrífuga adequada é aceitável.

Materiais adicionais necessários apenas para a aplicação de gota seca de plasma PSC

Materiais
cobas® Plasma Separation Card (P/N 07963084190 ou P/N 09411763190)[a]
Fórceps ou pinça esterilizada ou descartável[b]
Tubo capilar de 140 µl (p. ex., tubo de plástico Vitrex) com dispensador compatível (p. ex., suporte de pipeta Vitrex)[a]
Lancetador de utilização única (p. ex., Greiner bio-one: Lanceta de segurança MiniCollect®, profundidade de penetração de 2,00 mm)[a]
Saco de amostra (plástico transparente ziplock que pode ser novamente selado) e saquetas de gel de sílica dessecante (para um total de 4 gramas) (para mais informações sobre a armazenagem e o fornecimento do **PSC**, veja o **Folheto informativo do PSC ms_09411763190**)
Saco de transporte (p. ex., Wicoseal 180 × 60 × 240 mm)
Pipeta (p. ex., pipeta Multistepper)
Termomisturador (p. ex., Eppendorf Thermomixer® modelo R 5355 ou C ou equivalente) com termobloco para 24 tubos cryo
Tubos, 5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno (p. ex., Greiner Bio-one Cryo.s™) com tampas

[a] Veja o **Folheto informativo do PSC ms_09411763190** para mais informações sobre a coleta de amostras **PSC**.

[b] Para evitar contaminação cruzada, use somente um par de pinças para cada paciente! É recomendado o uso de pinças de metal esterilizadas em autoclave após utilização única.

Para mais informações sobre materiais vendidos em separado, contate o representante local da Roche.

Glossário de termos simplificados para o teste quantitativo cobas® HIV-1

São usados os seguintes termos simplificados no contexto das instruções de uso, para referir alguns dos materiais e reagentes listados nesta seção.

Termo simplificado	**Material/Reagente**
H(+)C	Controle positivo alto do **cobas®** HBV/HCV/HIV-1
Controle positivo alto	Controle positivo alto do **cobas®** HBV/HCV/HIV-1
L(+)C	Controle positivo baixo do **cobas®** HBV/HCV/HIV-1
Controle positivo baixo	Controle positivo baixo do **cobas®** HBV/HCV/HIV-1
LYS 2	Tampão de lise 2 **cobas®** 4800
Placa de micro poços	Placa AD (micro poços) do sistema **cobas®** 4800 0,3 ml
MGP 2	Reagente 2 **cobas®** 4800 MGP
MMX R1	Reagente 1 de mistura principal **cobas®**
MMX R2	Reagente 2 de mistura principal **cobas®** HIV-1
Controle negativo	Controle negativo **cobas®**
P 2	Protease 2 **cobas®** 4800
PSC	**cobas®** Plasma Separation Card
QS	Padrão de quantificação de RNA **cobas®**
SD 2	**cobas®** 4800 System Specimen Diluent 2
SPER	**cobas®** Specimen Pre-Extraction Reagent
WB	**cobas®** 4800 System Wash Buffer

Instrumentos e software necessários mas não fornecidos, para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Instrumentos e software necessários, não fornecidos
Sistema **cobas**® 4800 Instrumento **cobas**® x 480 Analisador **cobas**® z 480 Unidade de controle
Software de Aplicação (Core) do sistema **cobas**® 4800, versão 2.2.0 ou superior
Sistema **cobas**® 4800 **cobas**® HIV-1 AP v1.2.0 ou superior

Nota: contate o representante local da Roche para obter uma lista detalhada de pedidos de racks de amostras, racks de ponteiras, racks de reagentes e suportes de placas aceitos nos instrumentos.

Tubos de amostra suportados pelo teste quantitativo cobas® HIV-1

O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 aceita tubos primários e secundários normalmente usados.

São suportados os seguintes tubos de amostra:

Tubos primários para o tipo de amostra plasma

Diâmetro nominal (mm)	Volume de entrada de amostra – sangue total processado (centrifugado)		Aditivo do tubo
	400 µl de volume de processamento	200 µl de volume de processamento	Plasma EDTA
11-14	1800 µl ou mais	1000 µl ou mais	Com ou sem gel
14,5-16	Mais de 4000 µl	Mais de 4000 µl	Com ou sem gel

Para informações sobre pedidos de tubos de amostra específicos e os volumes de entrada de amostra mínimos para tubos primários específicos, contate o representante local da Roche.

Tubos secundários para o tipo de amostra plasma

Diâmetro nominal (mm)	Volume de entrada de amostra	
	400 µl de volume de processamento	200 µl de volume de processamento
11-16	1000 µl ou mais (tubos secundários específicos têm um volume de entrada mínimo inferior a 1000 µl)	750 µl ou mais (tubos secundários específicos têm um volume de entrada mínimo inferior a 750 µl)

Para informações sobre pedidos de tubos de amostra específicos e os volumes de entrada de amostra mínimos para tubos secundários específicos, contate o representante local da Roche.

Tubos secundários para o tipo de amostra PSC

Diâmetro nominal (mm)	Volume de entrada de SPER (400 µl de volume de processamento)
12,5	800 µl

Para informações sobre pedidos de tubos de amostra específicos, contate o representante local da Roche.

Os tubos de amostra para o tipo amostra **PSC** apenas podem ser carregados com o suporte de amostras de 32 posições.

Precauções e requisitos de manuseio para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Alertas e precauções

Tal como com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para o desempenho adequado deste ensaio. Devido à elevada sensibilidade analítica deste teste, deve-se tomar cuidado para manter reagentes, amostras e misturas de amplificação isentas de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 não foi avaliado para uso como teste de rastreio da presença de HIV-1 em sangue ou em produtos sanguíneos.
- Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas como se fossem infecciosas, utilizando boas práticas laboratoriais, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no Documento M29-A4 do CLSI.[19, 20] Somente pessoal experiente no manuseio de materiais com risco biológico e no uso do **cobas**® HIV-1 e no sistema **cobas**® 4800 devem executar esse procedimento.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com precauções universais.
- O **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit contém plasma derivado de sangue humano. O material de origem foi submetido a um teste aprovado de anticorpos e foi considerado não-reativo para a presença de anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg e anticorpos do HBc. Os testes mediante métodos PCR não detectaram qualquer RNA de HIV-1, RNA de HIV-2, RNA de HCV e ADN de HBV. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- Para alertas e precauções adicionais, consulte o **Folheto informativo do PSC ms_09411763190**.
- Evite a exposição de MGP a fontes de campos magnéticos.
- **Não congele sangue total ou quaisquer amostras armazenadas em tubos primários.**
- O **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent é sensível à luz e é enviado em frascos com proteção contra a luz.
- Para garantir o desempenho ideal do teste, use somente consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Estão disponíveis Fichas de Dados de Segurança (FDS) que podem ser pedidas ao representante local da Roche.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga os procedimentos e diretrizes fornecidos rigorosamente. Qualquer desvio destes procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se a contaminação por arraste de amostras não for controlada de forma adequada durante o manuseio e processamento da amostra.
- Para mais alertas, precauções e procedimentos para reduzir o risco de contaminação do instrumento **cobas**® x 480 ou do analisador **cobas**® z 480, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800. Se existir uma suspeita de contaminação, limpe e execute a manutenção semanal, conforme descrito na seção adequada da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Nota: ***para instruções específicas, veja "Coleta, transporte e armazenagem de amostras".***

Boas práticas de laboratório

- Não execute a pipetagem com a boca.
- Não coma, beba nem fume em áreas de trabalho no laboratório.
- Lave as mãos muito bem após manusear amostras e reagentes do kit e após retirar as luvas de laboratório.
- Use proteção ocular, jalecos de laboratório e luvas de laboratório descartáveis ao manusear quaisquer reagentes. Evite o contato destes materiais com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contato, lave imediatamente com água em abundância. Se não for feito um tratamento, poderão ocorrer queimaduras. Se ocorrer derrame, dilua com água antes de limpar com um pano seco.
- 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 deionizada ou destilada (diluir alvejante doméstico a 1:10). Seguidamente, esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Mantenha uma temperatura consistente no laboratório que esteja em conformidade com as especificações ambientais do sistema, conforme indicado na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Manuseio de reagentes

- Para evitar a contaminação por arraste de amostras ou controles, manuseie todos os reagentes, controles e amostras conforme as boas práticas de laboratório.
- Antes de usar, inspecione visualmente cada frasco de reagente para garantir que não existem sinais de vazamento. Se existir qualquer indício de vazamento, não use esse material para testes.
- O tampão de lise 2 **cobas**® 4800 e o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent contêm tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contato de reagentes com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente a zona afetada com água abundante, caso contrário poderão ocorrer queimaduras.
- O **cobas**® HIV-1, o **cobas**® 4800 Sample Preparation Kit 2 e o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 contêm azida de sódio como conservante. Evite o contato de reagentes com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente a zona afetada com água abundante, caso contrário poderão ocorrer queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Não permita que o tampão de lise 2 **cobas**® 4800 ou o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent, que contêm tiocianato de guanidina, entrem em contato com solução de hipoclorito de sódio (alvejante). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.

Contaminação

- Para evitar contaminação, devem ser usadas luvas de laboratório que devem ser trocadas entre o manuseio de amostras e de reagentes do **cobas**® HIV-1. Evite contaminar as luvas de laboratório manuseando amostras e controles. Use luvas de laboratório, jalecos de laboratório e proteção ocular ao manusear amostras e reagentes do kit.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes.
- Poderão ocorrer resultados falsos-positivos se a contaminação por arraste de amostras não for prevenida durante o manuseio da amostra.

Integridade

- Não use kits fora das respectivas datas de expiração.
- Não junte reagentes.
- Não use artigos descartáveis depois das respectivas datas de expiração.
- Todos os artigos descartáveis são de utilização única. Não reutilizar.
- Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Descarte

- O **cobas**® HIV-1, o **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2 e o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 contêm azida de sódio (veja "**Alertas e precauções**"). A azida de sódio pode reagir com tubulações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao descartar soluções contendo azida de sódio em pias do laboratório, lave os canos com um grande volume de água fria para prevenir a formação de azidas.
- Descarte reagentes não usados e resíduos em conformidade com a legislação local, estadual, federal e nacional.

Nota: ***para o descarte de resíduos líquidos, consulte a Assistência ao usuário do sistema cobas® 4800.***

Derrames e limpeza

- O tampão de lise 2 **cobas**® 4800 e o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent contêm tiocianato de guanidina. Se for derramado líquido que contenha tiocianato de guanidina, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Não permita que entre em contato com desinfetantes que contenham hipoclorito de sódio, como alvejante. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Se for derramado material de origem humana, desinfete imediatamente com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou deionizada (alvejante doméstico diluído a 1:10) ou siga os procedimentos adequados do local.
- Se forem derramadas amostras de gotas secas de plasma **PSC** em **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (que contém tiocianato de guanidina), não permita que entre em contato com desinfetantes que contenham hipoclorito de sódio, como alvejante. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico. PRIMEIRO, limpe a área afetada com detergente laboratorial e água e depois com hipoclorito de sódio a 0,5%.
- Se o derrame ocorrer no instrumento **cobas**® x 480, siga as instruções de limpeza apresentadas na Assistência ao usuário adequado do sistema **cobas**® 4800.
- Não use solução de hipoclorito de sódio (alvejante) para limpar o instrumento **cobas**® x 480 ou o analisador **cobas**® z 480. Limpe o instrumento **cobas**® x 480 ou o analisador **cobas**® z 480 de acordo com os procedimentos descritos na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Coleta, transporte e armazenagem de amostras

Nota: ***manuseie todas as amostras como se elas possam transmitir agentes infecciosos.***

Armazene todas as amostras às temperaturas especificadas.
A estabilidade da amostra é afetada por temperaturas elevadas.
Se usar amostras congeladas em tubos secundários, coloque as amostras à temperatura ambiente (entre 15 e 30 °C) até ficarem completamente descongeladas e, em seguida, misture brevemente (p. ex., com agitação forte durante 3 a 5 segundos) e centrifugue para coletar todo o volume de amostra no fundo do tubo.

Nota: ***após a centrifugação, se houver a chance de existirem células novamente suspensas no plasma, considere a possibilidade de executar uma nova centrifugação antes de processar no instrumento.***

Amostras de plasma EDTA

- O sangue deve ser coletado 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.

Nota: ***para a preparação de plasma, o usuário deve seguir as orientações fornecidas pelo fabricante do tubo.***

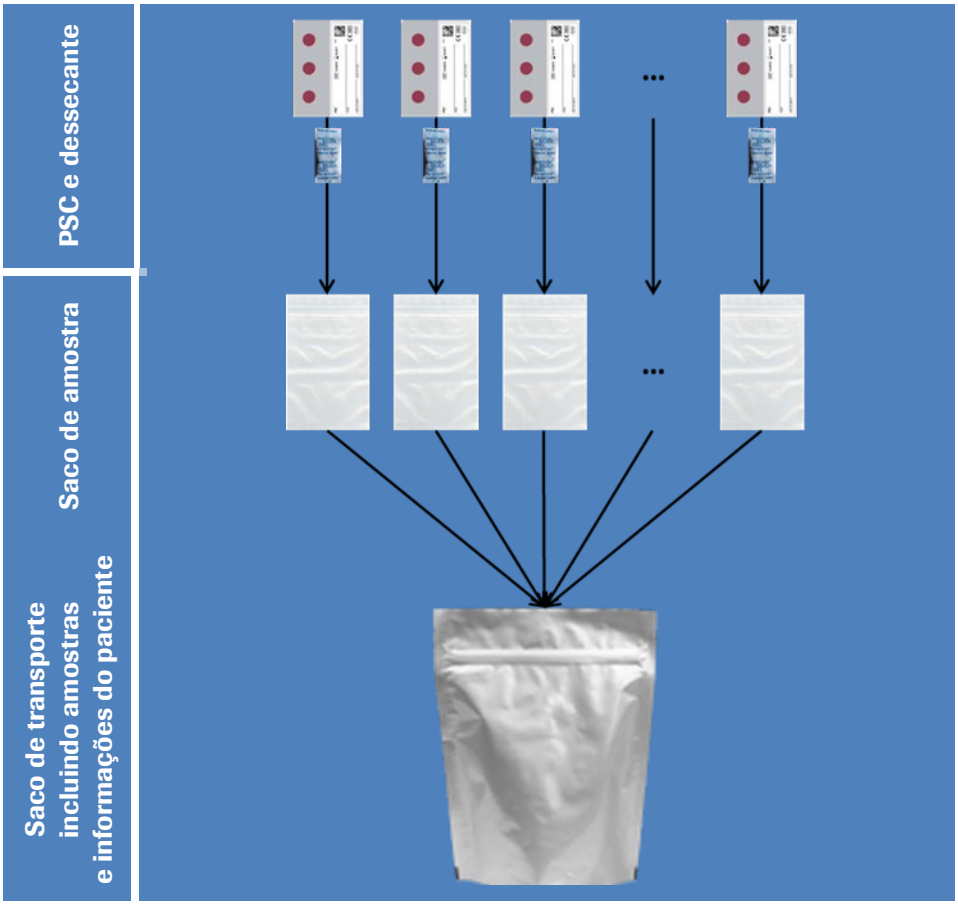
- Sangue total coletado em tubos de preparação de plasma para métodos de teste de diagnóstico molecular BD Vacutainer® PPT™, ou em tubos esterilizados que utilizem EDTA como anticoagulante, pode ser armazenado e/ou transportado até 24 horas a temperaturas entre 2 °C e 25 °C antes da preparação do plasma e testes subsequentes.
- As amostras de plasma podem ser armazenadas em tubos secundários até 24 horas entre 2 °C e 30 °C, até 72 horas entre 2 °C e 8 °C ou até 6 semanas a ≤ -18 °C. As amostras de plasma separadas em tubos secundários mantêm a estabilidade após até três ciclos de congelamento/descongelamento quando congeladas a ≤ -18 °C.
- Se as amostras tiverem de ser enviadas, 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

- Execute a coleta de amostras de gotas secas de plasma **PSC** usando procedimentos clínicos adequados (consulte o **Folheto informativo do PSC ms_09411763190**).
- Verifique a data de expiração do **PSC** e continue somente se o **PSC** ainda não tiver expirado.
- Certifique-se de que o saco no qual o **PSC** está selado está totalmente fechado e intocado.
- Rotule o **PSC** com o nome do paciente e a data de nascimento, bem como a data e hora da coleta da amostra.
- Execute uma punção do dedo e aplique 140 µl de sangue total em cada círculo da membrana do **PSC** delineado pela camada de aplicação de gota usando um tubo capilar adequado e um dispensador. 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 permita que as membranas entrem em contato 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 da amostra.
- Depois de secar, armazene o **PSC** em um saco de amostra individual com 4 gramas de dessecante, e sele o saco. Os sacos de amostras coletadas devem ser embalados em um saco de transporte junto com a respectiva ficha de informações do paciente. Recomenda-se embalar um máximo de 25 **PSC** por saco de transporte (veja Figura 1 para uma visão geral).

Figura 1: Visão geral do conceito de embalagem para transporte de PSC



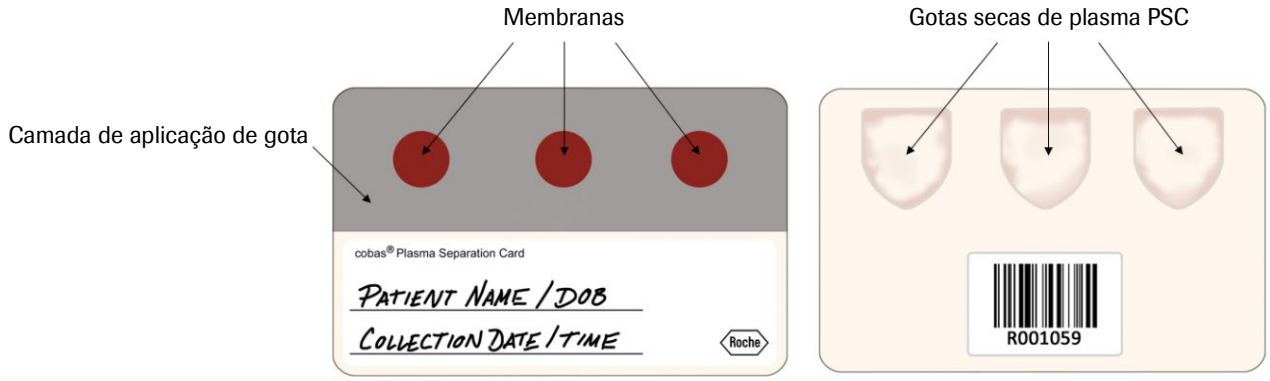
- Se as amostras tiverem de ser enviadas, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos. Os **PSC** podem ser transportados durante um período de 28 dias antes de serem analisados, a uma temperatura entre 18 e 45 °C e com uma umidade de 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 uso para o teste quantitativo cobas® HIV-1

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

- Verifique a integridade do saco de transporte antes de 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 está totalmente fechado e contém um **PSC** com 4 gramas de dessecante.
  - A data de coleta da amostra estiver disponível e se a coleta de amostra tiver ocorrido nos 28 dias anteriores, e antes da data de expiração do **PSC**.
  - O **PSC** não tiver expirado.
  - A gota seca de plasma **PSC** apresentar um aspecto homogêneo no lado da frente e estiver totalmente coberta com plasma quando observada a partir do lado de trás (veja Figura 2).

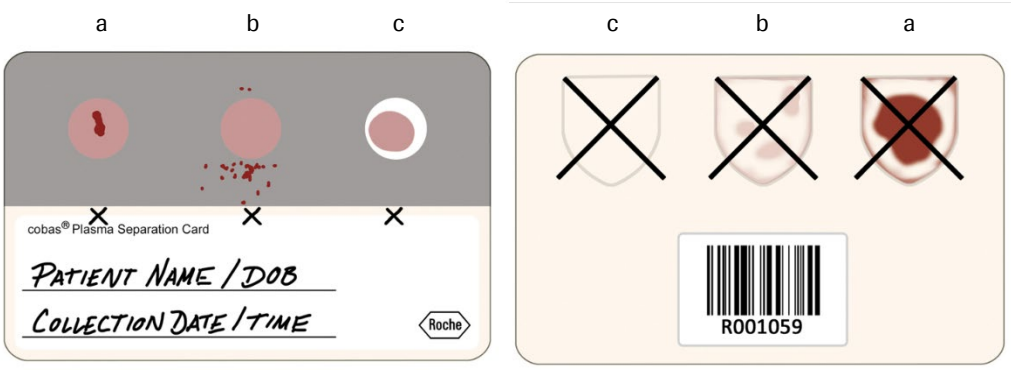
Figura 2: Gotas secas de plasma PSC a processar (esquerda: lado da frente; direita: lado de trás)



  - As gotas secas de plasma **PSC** devem ser marcadas e rejeitadas se:
    - forem visíveis derrames de sangue (Figura 3b) ou a membrana não estiver totalmente coberta de sangue (Figura 3c) e, consequentemente, a gota **PSC** apresentar a parte da frente não homogênea e/ou a parte de trás não totalmente coberta de plasma (visível através do transportador).
    - a membrana estiver danificada (Figura 3a) e, consequentemente, a gota **PSC** apresentar a parte da frente não homogênea e o lado de trás vermelho-escuro/marrom (visível através do transportador).

Nota: ***as três gotas servem para os testes e repetições dos testes. Um PSC pode conter uma gota imprópria mas ainda assim providenciar uma boa amostra para testes. Assinale adequadamente as gotas impróprias, para que sejam reconhecíveis. Evite marcá-las na camada de aplicação de gota. Compare sempre as três gotas entre si para avaliar a respectiva qualidade.***

Figura 3: Critérios de rejeição de círculos PSC (esquerda: lado da frente; direita: lado de trás). Círculos com derrames (b), membrana não coberta (c) ou membranas visivelmente danificadas (a) não devem ser processados. Os círculos deverão ser assinalados claramente quando rejeitados.



- 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 4) e coloque-os em uma rack. Transfira os tubos para uma câmara de fluxo laminar junto com os sacos de amostras contendo os **PSC**. Para uma rotulagem com código de barras correta, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Figura 4: Rotulagem do tubo com o código de barras 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 5).

Figura 5: Remoção da camada de aplicação de gota

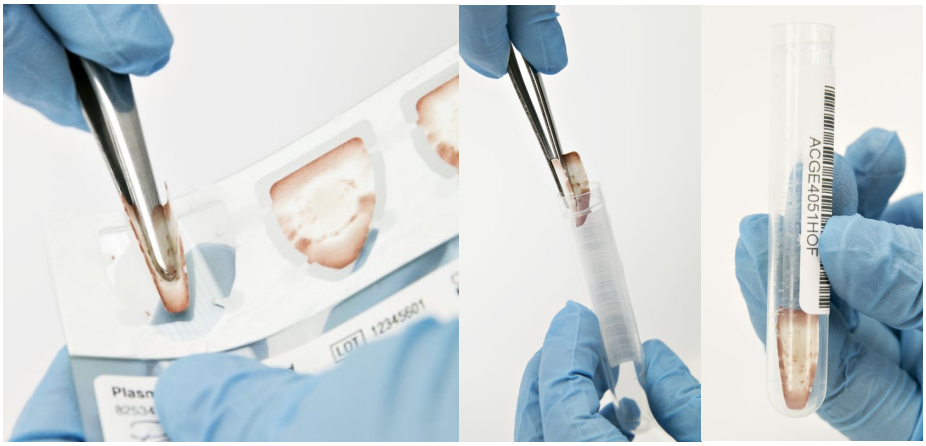
- Dobre ligeiramente o **PSC** e, utilizando fórceps ou uma pinça esterilizados, retire uma gota seca de plasma, puxando para cima. Dobre a gota seca de plasma removida no **PSC** para facilitar sua inserção no tubo (Figura 6). Use um par de fórceps ou uma pinça por paciente.

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

Figura 6: Remoção da gota seca de plasma do PSC e dobragem

- Transfira uma gota seca de plasma **PSC** pré-dobrada para o tubo correspondente de modo que a ponteira inferior da gota seca de plasma **PSC** chegue ao fundo do tubo e fique fixada à parede do tubo para evitar erros de pipetagem (Figura 7). Ajuste a posição da gota seca de plasma **PSC** com uma ponteira da pipeta esterilizada, se necessário. Certifique-se de que o tubo e o **PSC** da gota seca de plasma **PSC** transferida têm o mesmo código de barras.

Figura 7: Transferência da gota seca de plasma PSC para o tubo



- Coloque o **PSC** com as restantes gotas secas de plasma novamente no respectivo saco de amostra original contendo 4 gramas de dessecante fresco, para repetição do teste, se necessário (Figura 8). 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).

Nota: ***garanta que nunca reutiliza o dessecante do saco de amostra original, usando sempre um dessecante fresco.***

Figura 8: PSC no saco de amostra para eventual repetição do teste

- Deixe o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER) equilibrar à temperatura ambiente antes de usar. Pipete 800 µl de SPER nos tubos contendo as gotas secas de plasma PSC (Figura 9) e coloque as tampas nos tubos. Garanta que os tubos têm as tampas devidamente colocadas para evitar a evaporação.

Nota: ***garanta que apenas usa reagente SPER e nunca outro tipo de reagente de pré-extração (p. ex., SPEX). Para um desempenho correto do ensaio, é importante pipetar a quantidade exata de 800 µl de SPER (ou seja, nem mais nem menos que 800 µl).***

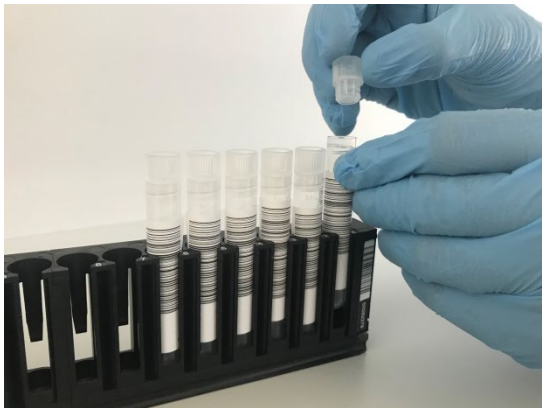
Figura 9: Adição de 800 µl de SPER

- Coloque tubos com tampas em um termomisturador pré-aquecido (p.ex., Eppendorf Thermomixer®, modelo R 5355 ou C ou equivalente) com termobloco para 24 tubos cryo e incube durante 10 minutos a 56 °C e 1000 rpm para extrair o vírus do plasma seco (Figura 10). Inicie a incubação imediatamente após a adição de SPER.

Figura 10: Incubação

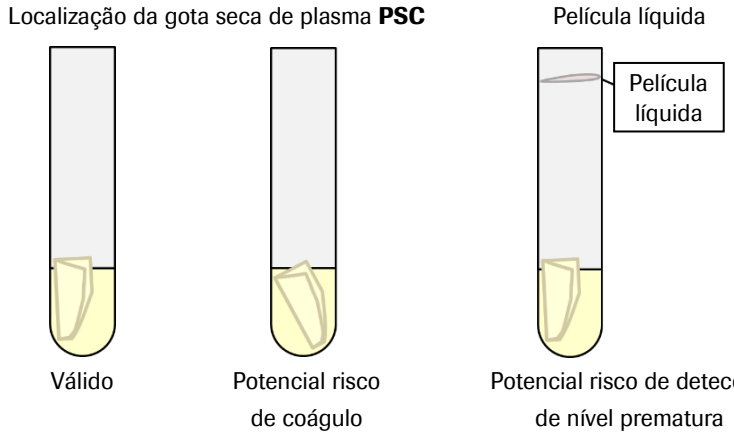
- Transfira os tubos para uma rack de amostra e retire as tampas dos tubos, uma a uma, para minimizar a contaminação cruzada (Figura 11). Troque de luvas depois de remover as tampas.

Figura 11: 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 12) para evitar coágulos de amostra. Ajuste a posição da gota seca de plasma **PSC** com uma ponteira da pipeta esterilizada, se necessário.
- Elimine qualquer potencial película líquida localizada acima do nível do líquido usando uma ponteira da pipeta esterilizada (para evitar detecção de nível prematura).
- Carregue os tubos no sistema **cobas**® 4800 usando apenas o suporte de amostras de 32 posições.

Figura 12: Preparação de gota seca de plasma PSC antes do fluxo de trabalho analítico



Nota: certifique-se de que remove qualquer eventual película líquida criada durante o processo.

Execução do teste quantitativo cobas® HIV-1

Tipos de amostras e volume de processamento do teste quantitativo cobas® HIV-1

O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 suporta três tipos de amostras: plasma, plasma diluído e **PSC**. O volume de processamento de cada um destes tipos de amostras é o seguinte:

Tipos de amostras suportados e volume de processamento

Tipo de amostra	Volume de processamento [µl]
Plasma	400
Plasma diluído[a]	200
PSC	400

[a] Quando o tipo de amostra "plasma diluído" (amostra) é selecionado durante a criação do pedido de trabalho, o software avisa o usuário para carregar o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 como um reagente adicional durante a fase de carregamento de reagentes.

Dimensão da corrida para o teste quantitativo cobas® HIV-1

Os reagentes genéricos de preparação de amostras (**cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2, **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 e **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit) estão disponíveis em dois tamanhos de kit, cada um suficiente para 10 corridas de até 24 ou até 96 amostras, incluindo os controles e as amostras a executar. O **cobas**® HIV-1 está disponível em apenas um tamanho de kit, suficiente para testar até 120 (10 × 12) amostras, incluindo controles e amostras. Para cada bateria de testes, tem de ser usado um controle positivo baixo de HBV/HCV/HIV-1, um controle positivo alto de HBV/HCV/HIV-1 e um controle negativo. Para uma única corrida de teste, o número máximo permitido de amostras é 93 amostras e 3 controles.

Nota: ***para uma utilização ideal dos reagentes, os reagentes genéricos de preparação de amostras podem ser usados em uma corrida contendo um total de 1 a 21 amostras (kit de 10 × 24 testes) ou um total de 1 a 93 amostras (kit de 10 × 96 testes). No entanto, não podem ser combinados tamanhos diferentes do cobas® 4800 System Wash Buffer Kit, cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 e cobas® 4800 System Lysis Kit 2. Por exemplo, se for registrado um frasco de reagente de tampão de lavagem para 96 testes no início da corrida, também devem ser usados reagentes para 96 testes dos outros kits de reagentes de preparação de amostras.***

Fluxos de trabalho para o teste quantitativo cobas® HIV-1 – bateria única e mista

O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 é executado usando o fluxo de trabalho completo no software **cobas**® 4800. Ele consiste na preparação da amostra no instrumento **cobas**® x 480, seguida de amplificação/detecção no analisador **cobas**® z 480.

Para iniciar um teste quantitativo **cobas**® HIV-1, deve ser selecionado o tipo do teste de HIV-1.

O teste quantitativo do HIV-1 pode ser executado sozinho como uma bateria individual ou em modo de bateria mista com testes que compartilham o mesmo processo de preparação automatizada de amostras e perfil de PCR para amplificação e detecção. No passo da seleção de testes, o software apresentará testes que são compatíveis com o teste quantitativo do HIV-1 para o modo de bateria mista.

Poderá encontrar visões gerais dos fluxos de trabalho de testes quantitativos do HIV-1 nos locais indicados a seguir:

- A bateria individual de testes quantitativos do HIV-1 é exibida em Figura 13.
- A bateria mista de testes quantitativos do HIV-1 com teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) é exibida em Figura 14.
- A visão geral de corridas de bateria mista, incluindo o teste quantitativo do HIV-1 com qualquer teste aplicável, está disponível na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Figura 13: Visão geral da bateria individual de testes quantitativos do HIV-1 – reagentes e fluxo de trabalho

Reagentes	
Preparação genérica de amostras • **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2 o **MGP 2** o **EB 2** • **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 o **P 2** o **LYS 2** • **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit o **WB** Para plasma diluído: • **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 o **SD 2** Para Plasma Separation Card (**PSC**): • **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent o **SPER** Amplificação/detecção • **cobas**® HIV-1 o **MMx R1** o **HIV-1 MMx R2** o **RNA QS** Controles • **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit o **H(+)C** o **L(+)C** o **(–)C**	
Fluxo de trabalho	
1	Iniciar o sistema
2	Executar a manutenção do instrumento
3	Retirar amostras e reagentes da armazenagem
4	Iniciar corrida e selecionar HIV-1
5	Efetuar a leitura dos cartões de parâmetros
6	Carregar amostras
7	Criar pedido de trabalho: • Com LIS: confirmar pedido de trabalho • Sem LIS: criar pedido de trabalho
8	Carregar consumíveis
9	Carregar reagentes de preparação da amostra
10	Carregar controles e reagentes de AMP/DET
11	Iniciar corrida de preparação da amostra
12	Descarregar placa de micro poços

13	Selar placa de micro poços
14	Carregar placa de micro poços selada no analisador
15	Retirar amostras, reagentes usados e placa de poços profundos
16	Revisar resultados • Opcional: se conectado a um LIS, enviar resultados para o LIS
17	Descarregar analisador

Figura 14: Visão geral da bateria mista do teste quantitativo do HIV-1 com o teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) – reagentes e fluxo de trabalho

Reagentes	
Preparação genérica de amostras • **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2 o **MGP 2** o **EB 2** • **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 o **P 2** o **LYS 2** • **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit o **WB** <u>Para plasma diluído</u>: • **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 o **SD 2** <u>Para Plasma Separation Card (**PSC**) e gota seca de sangue (DBS)</u>: • **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent o **SPER** Amplificação/detecção • **cobas**® HIV-1 o **MMx R1** o **HIV-1 MMx R2** o **RNA QS** Controles • **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit o **H(+)C** *Necessário apenas para o teste quantitativo do HIV-1* o **L(+)C** o **(-)C**	
Fluxo de trabalho	
1	Iniciar o sistema
2	Executar a manutenção do instrumento
3	Retirar amostras e reagentes da armazenagem
4	Iniciar corrida e selecionar HIV-1 e HIV-1-qual-DBS
5	Efetuar a leitura dos cartões de parâmetros do HIV-1 *São usados os mesmos kits para o HIV-1 e para o HIV-1-qual-DBS.*
6	Carregar amostras
7	Criar pedido de trabalho: • Com LIS: confirmar pedido de trabalho • Sem LIS: criar pedido de trabalho
8	Carregar consumíveis
9	Carregar reagentes de preparação da amostra

10	Carregar controles e reagentes de AMP/DET *Para o HIV-1:* • *São necessários o QS e o L(+)C do kit de amplificação/detecção e o H(+)C e (-)C do kit de controles.* *Para o HIV-1-qual-DBS:* • *O assistente do software avisa para carregar o QS, que é usado como o controle interno (IC).* • *O assistente do software também avisa para carregar os L(+)C e (–)C do kit de controles. O H(+)C não é necessário para o HIV-1-qual-DBS.*
11	Iniciar corrida de preparação da amostra
12	Descarregar placa de micro poços
13	Selar placa de micro poços
14	Carregar placa de micro poços selada no analisador
15	Retirar amostras, reagentes usados e placa de poços profundos
16	Revisar resultados • Opcional: se conectado a um LIS, enviar resultados para o LIS *Nos resultados do HIV-1-qual-DBS, o QS é referido como o IC e o L(+)C é referido como o controle positivo.*
17	Descarregar analisador

Os fluxos de trabalho da bateria individual do teste quantitativo do HIV-1 e da bateria mista do teste quantitativo do HIV-1 com o teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) são descritos, respectivamente, nas duas seções que se seguem.

Para uma descrição detalhada do fluxo de trabalho da bateria individual do teste qualitativo do HIV-1, consulte a seção Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste qualitativo HIV-1 (HIV-1-qual-DBS).

Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste quantitativo do HIV-1

1. Efetue a inicialização do sistema e os procedimentos de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
2. Efetue ações de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
3. Colete todos os reagentes e consumíveis necessários. Todos os reagentes, exceto os MMX R2 e MMX R1, devem estar à temperatura ambiente antes de serem carregados no instrumento **cobas**® x 480. Os reagentes MMX R2 e MMX R1 podem ser retirados diretamente da armazenagem entre os 2 e 8 °C, porque na altura que forem usados no processo a bordo do instrumento **cobas**® x 480 já estarão à temperatura ambiente.

Nota: ***todos os reagentes e reservatórios de reagentes têm códigos de barras e foram concebidos para serem usados uma única vez. O software cobas® 4800 detecta o uso dos reagentes e dos reservatórios de reagentes e rejeita os reagentes ou reservatórios de reagentes utilizados anteriormente.***

4. Inicie uma nova corrida e selecione o tipo de teste HIV-1.
5. Siga o guia do assistente do software e efetue a leitura dos códigos de barras nos cartões de parâmetros de coeficientes de calibração e dos intervalos de controle.

Nota: ***efetue a leitura dos cartões de parâmetros dos reagentes não expirados. O software não verifica as datas dos prazos de expiração dos reagentes nos cartões de parâmetros. Verifique a data de expiração impressa no cartão de parâmetros ou nos kits de reagente antes de efetuar a leitura da ID do código de barras correspondente.***

6. Carregue as amostras. Os tubos de amostra primários ou secundários podem ser carregados e o volume mínimo de amostra depende do tipo e tamanho do tubo. Para mais detalhes, consulte a seção "Tubos de amostra suportados".

   As amostras de plasma e de plasma diluído podem ser carregadas com o suporte de amostras de 24 posições ou de 32 posições. As amostras de **PSC** apenas podem ser carregadas com o suporte de amostras de 32 posições.

7. Crie o pedido de trabalho. Existem três maneiras de criar um pedido de trabalho:

   - Usando o editor de amostras antes de carregar a rack de amostras no instrumento **cobas**® x 480 (botão "Editor" à direita do menu principal). Os pedidos de trabalho podem ser salvos, editados e recarregados, se necessário. O tipo de amostra deve ser selecionado entre plasma, plasma diluído ou **PSC**. Depois de selecionado o tipo de amostra, o resultado pretendido é automaticamente definido como HIV-1.
   - Seguindo o assistente do software para a nova corrida e carregando as amostras no instrumento **cobas**® x 480 quando o sistema solicitar. Os códigos de barras das amostras são lidos automaticamente e o tipo de amostra e os resultados desejados devem ser definidos para cada amostra. Ao selecionar o tipo de amostra, selecione plasma, plasma diluído ou **PSC**, conforme se aplicar. Depois de selecionado o tipo de amostra, o resultado pretendido é automaticamente definido como HIV-1.
   - Usando o sistema LIS de sua instituição.

Nota: ***selecione o tipo de amostra correto. O software não verifica se a seleção do tipo de amostra corresponde à amostra carregada. Por exemplo, se for carregada uma amostra de PSC, certifique-se de que seleciona o tipo de amostra PSC (e não plasma ou plasma diluído).***

   Para mais detalhes, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800. Carregue amostras e defina/selecione o pedido de trabalho ou use o LIS, conforme adequado.

8. Carregue os consumíveis conforme as instruções do assistente do software. Não coloque nem retire ponteiras individuais de uma rack de ponteiras parcialmente usada, uma vez que o software registra o número de ponteiras que sobra. Se não houver ponteiras suficientes para executar a corrida, o software alerta o usuário.

9. Carregue os reagentes de preparação da amostra nos reservatórios de reagentes com códigos de barras. Os reservatórios de reagentes estão disponíveis em dois tamanhos: 200 ml e 50 ml. Siga as indicações do assistente do software para selecionar o tamanho correto do reservatório de reagente. Os códigos de barras dos reservatórios de reagentes devem estar virados para a direita do suporte. Use o método "ler-ler-verter--colocar" para carregar os reagentes de preparação da amostra:

   - Faça a leitura do código de barras do frasco de reagente
   - Faça a leitura do código de barras do reservatório de reagente
   - Verta o reagente no reservatório (o frasco de MGP deve ser sujeito a agitação forte antes de ser dispensado)
   - Coloque o reservatório de reagente cheio no suporte de reagentes na posição indicada

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo que os reagentes estão a bordo do equipamento. Assim que a leitura do LYS 2 ou do WB for executada, tem 1 hora para concluir o processo de carregamento e clicar no botão "Start". Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia "Workplace". O sistema não permite o início da corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

Nota: ***para garantir uma transferência precisa de MGP, proceda à agitação forte do frasco de MGP <u>imediatamente antes</u> de dispensar o reagente no reservatório de reagente.***

10. Carregue os frascos de reagentes de amplificação/detecção [MMX R2, MMX R1 e RNA QS], os fracos de controles [L(+)C, H(+)C e (–) C] e os frascos de reagentes genéricos [P 2 e SD 2 conforme necessário] diretamente no suporte de reagentes.

Nota: ***para evitar contaminação e corridas canceladas desnecessariamente, é necessário mover os frascos de reagente rapidamente para baixo para evitar a formação de bolhas/películas líquidas. Os controles deverão ser abertos começando pelos mais próximos do usuário (da posição 24 para a 1). Mude de luvas de laboratório após manusear controles positivos.***

11. Inicie a corrida de preparação da amostra.
12. Depois de uma corrida de preparação da amostra bem-sucedida, os botões "Sample Preparation results" e "Unload" ficam disponíveis. Se desejar, pressione o botão "Sample Preparation results" para revisar os resultados e depois selecione "Unload" para descarregar os suportes de placas. Alternativamente, selecione "Unload" para descarregar o suporte de placas sem revisar os resultados. Para mais detalhes, veja a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
13. Depois de descarregar a placa de micro poços, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para selar e transferir a placa para o analisador **cobas**® z 480.
14. Carregue a placa de micro poços no analisador e inicie a corrida de amplificação e detecção conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo após a adição das amostras preparadas à mistura principal ativada. A amplificação e detecção deverão ser iniciadas o mais cedo possível, mas nunca após 40 minutos depois do final da corrida no instrumento cobas® x 480. Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia "Workplace". O sistema cancela a corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

15. Retire as amostras, os reagentes usados e a placa de poços profundos, conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
16. Após concluída a corrida de amplificação e detecção, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para revisar e aceitar resultados. Se estiver trabalhando com o LIS, envie os resultados para o LIS.
17. Siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para descarregar a placa de micro poços do analisador **cobas**® z 480.

Bateria mista de fluxo de trabalho – Testes quantitativo e qualitativo (HIV-1-qual-DBS) do HIV-1

1. Efetue a inicialização do sistema e os procedimentos de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
2. Efetue ações de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
3. Colete todos os reagentes e consumíveis necessários. Todos os reagentes, exceto os MMX R2 e MMX R1, devem estar à temperatura ambiente antes de serem carregados no instrumento **cobas**® x 480. Os reagentes MMX R2 e MMX R1 podem ser retirados diretamente da armazenagem entre os 2 e 8 °C, porque na altura que forem usados no processo a bordo do instrumento **cobas**® x 480 já estarão à temperatura ambiente.

Nota: ***todos os reagentes e reservatórios de reagentes têm códigos de barras e foram concebidos para serem usados uma única vez. O software cobas® 4800 detecta o uso dos reagentes e dos reservatórios de reagentes e rejeita os reagentes ou reservatórios de reagentes utilizados anteriormente.***

4. Inicie uma nova corrida e selecione os tipos de teste HIV-1 e HIV-1-qual-DBS.

   O tipo de teste HIV-1 representa o teste quantitativo do HIV-1 e o tipo de teste HIV-1-qual-DBS representa o teste qualitativo do HIV-1.

   Os tipos de teste HIV-1, HIV-1-qual-DBS, CMV, HCV e HCV GT podem ser uma bateria mista. Até quatro testes podem ser uma bateria mista em uma única corrida.

   Nesta seção, é descrita uma corrida de bateria mista incluindo apenas HIV-1 e HIV-1-qual-DBS. Para fluxos de trabalho de bateria mista genérica, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

5. Ambos o HIV-1 e o HIV-1-qual-DBS usam o kit de amplificação/detecção e o kit de controles HBV/HCV/HIV-1. Em uma corrida de bateria mista envolvendo o HIV-1 e o HIV-1-qual-DBS, apenas pode ser usado um kit de amplificação/detecção e um kit de controles. Para o HIV-1 são necessárias faixas de controle e os parâmetros do coeficiente de calibração. Siga o guia do assistente do software e efetue a leitura dos códigos de barras nos cartões de parâmetros de coeficientes de calibração e dos intervalos de controle.

   Se forem usados vários kits do kit de amplificação/detecção ou do kit de controles em uma bateria mista incluindo o HIV-1 e o HIV-1-qual-DBS, certifique-se de que é executada a leitura do cartão de parâmetros do coeficiente de calibração e do cartão de intervalos de controle para os reagentes que serão usados para o HIV-1. Não é necessário executar a leitura dos cartões do(s) kit(s) usado(s) para o HIV-1-qual-DBS.

Nota: ***efetue a leitura dos cartões de parâmetros dos reagentes não expirados. O software não verifica as datas dos prazos de expiração dos reagentes nos cartões de parâmetros. Verifique a data de expiração impressa no cartão de parâmetros ou nos kits de reagente antes de efetuar a leitura da ID do código de barras correspondente.***

6. Carregue as amostras. Os tubos de amostra primários ou secundários podem ser carregados e o volume mínimo de amostra depende do tipo e tamanho do tubo. Para mais detalhes, consulte a seção “Tubos de amostra suportados”.

   As amostras de plasma e de plasma diluído podem ser carregadas com o suporte de amostras de 24 posições ou de 32 posições. As amostras **PSC** e de DBS apenas podem ser carregadas com o suporte de amostras de 32 posições.

7. Crie o pedido de trabalho. Existem três maneiras de criar um pedido de trabalho:

   - Usando o editor de amostras antes de carregar a rack de amostras no instrumento **cobas**® x 480 (botão "Editor" à direita do menu principal). Os pedidos de trabalho podem ser salvos, editados e recarregados, se necessário. O tipo de amostra deve ser selecionado como plasma, plasma diluído, **PSC** ou DBS, conforme aplicável. O resultado desejado é então definido automaticamente como HIV-1 para plasma, plasma diluído ou **PSC**, e como HIV-1-qual-DBS para DBS.
   - Seguindo o assistente do software para a nova corrida e carregando as amostras no instrumento **cobas**® x 480 quando o sistema solicitar. Os códigos de barras das amostras são lidos automaticamente e o tipo de amostra e os resultados desejados devem ser definidos para cada amostra. Quando selecionar o tipo de amostra, selecione plasma, plasma diluído, **PSC** ou DBS, conforme aplicável. Depois de o tipo de amostra ser selecionado, o resultado desejado é então definido automaticamente como HIV-1 para plasma, plasma diluído ou **PSC**, e como HIV-1-qual-DBS para DBS.
   - Usando o sistema LIS de sua instituição.

Nota: ***selecione o tipo de amostra correto. O software não verifica se a seleção do tipo de amostra corresponde à amostra carregada. Por exemplo, se for carregada uma amostra de PSC, certifique-se de que seleciona o tipo de amostra PSC (e não plasma, plasma diluído ou DBS).***

   Para mais detalhes, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800. Carregue amostras e defina/selecione o pedido de trabalho ou use o LIS, conforme adequado.

8. Carregue os consumíveis conforme as instruções do assistente do software. Não coloque nem retire ponteiras individuais de uma rack de ponteiras parcialmente usada, uma vez que o software registra o número de ponteiras que sobra. Se não houver ponteiras suficientes para executar a corrida, o software alerta o usuário.
9. Carregue os reagentes de preparação da amostra nos reservatórios de reagentes com códigos de barras. Os reservatórios de reagentes estão disponíveis em dois tamanhos: 200 ml e 50 ml. Siga as indicações do assistente do software para selecionar o tamanho correto do reservatório de reagente. Os códigos de barras dos reservatórios de reagentes devem estar virados para a direita do suporte. Use o método "ler-ler-verter--colocar" para carregar os reagentes de preparação da amostra:
   - Faça a leitura do código de barras do frasco de reagente
   - Faça a leitura do código de barras do reservatório de reagente
   - Verta o reagente no reservatório (o frasco de MGP deve ser sujeito a agitação forte antes de ser dispensado)
   - Coloque o reservatório de reagente cheio no suporte de reagentes na posição indicada

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo que os reagentes estão a bordo do equipamento. Assim que a leitura do LYS 2 ou do WB for executada, tem 1 hora para concluir o processo de carregamento e clicar no botão "Start". Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia "Workplace". O sistema não permite o início da corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

Nota: ***para garantir uma transferência precisa de MGP, proceda à agitação forte do frasco de MGP <u>imediatamente antes</u> de dispensar o reagente no reservatório de reagente.***

10. Carregue os frascos de reagentes de amplificação/detecção [MMX R2, MMX R1 e RNA QS], os frascos de controles [L(+)C, H(+)C e (-)C para o HIV-1, e L(+)C e (-)C para o HIV-1-qual-DBS] e os frascos de reagentes genéricos [P 2 e SD 2 conforme necessário] diretamente no suporte de reagentes.

    Tanto o HIV-1 quanto o HIV-1-qual-DBS precisam de seu próprio conjunto de frascos de reagentes de amplificação/detecção e de frascos de controles, e cada conjunto pode ser proveniente do mesmo kit ou de kits diferentes.

    Para o HIV-1-qual-DBS, o software avisa o usuário para carregar o QS. Este QS é usado como Controle Interno (IC) e é designado como IC nos resultados.

    Até mesmo para o HIV-1-qual-DBS, o software avisa o usuário para carregar L(+)C. Este L(+)C é usado como controle positivo e é designado como controle positivo nos resultados. O H(+)C não é necessário para o HIV-1-qual-DBS.

Nota: ***para evitar contaminação e corridas canceladas desnecessariamente, é necessário mover os frascos de reagente rapidamente para baixo para evitar a formação de bolhas/películas líquidas. Os controles deverão ser abertos começando pelos mais próximos do usuário (da posição 24 para a 1). Mude de luvas de laboratório após manusear controles positivos.***

11. Inicie a corrida de preparação da amostra.
12. Depois de uma corrida de preparação da amostra bem-sucedida, os botões “Sample Preparation results” e “Unload” ficam disponíveis. Se desejar, pressione o botão “Sample Preparation results” para revisar os resultados e depois selecione “Unload” para descarregar os suportes de placas. Alternativamente, selecione “Unload” para descarregar o suporte de placas sem revisar os resultados. Veja a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
13. Depois de descarregar a placa de micro poços, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para selar e transferir a placa para o analisador **cobas**® z 480.
14. Carregue a placa de micro poços no analisador e inicie a corrida de amplificação e detecção conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo após a adição das amostras preparadas à mistura principal ativada. A amplificação e detecção deverão ser iniciadas o mais cedo possível, mas nunca após 40 minutos depois do final da corrida no instrumento cobas® x 480. Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia “Workplace”. O sistema cancela a corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

15. Retire as amostras, os reagentes usados e a placa de poços profundos, conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
16. Após concluída a corrida de amplificação e detecção, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para revisar e aceitar resultados. Se estiver trabalhando com o LIS, envie os resultados para o LIS.
17. Siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para descarregar a placa de micro poços do analisador **cobas**® z 480.

Resultados do teste quantitativo cobas® HIV-1

O sistema **cobas**® 4800 determina automaticamente a concentração de RNA de HIV-1 para as amostras e os controles. A concentração de RNA 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 teste **cobas**® HIV-1 é 0,6 cp/UI.

Controle de qualidade e validade dos resultados do teste quantitativo cobas® HIV-1

- Com cada bateria são processados um controle negativo (–) C e dois controles positivos, um controle positivo baixo de HBV/HCV/HIV-1 L(+)C e um controle positivo alto de HBV/HCV/HIV-1 H(+)C.
- Verifique a validade da bateria no software **cobas**® 4800 e/ou no relatório.
- A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software **cobas**® 4800, com base nas falhas dos controles negativo e positivo.

Interpretação dos resultados de controle do teste quantitativo cobas® HIV-1

Tabela 1: Interpretação dos resultados de controles negativo e positivo

Controle negativo	Resultado	Interpretação
(–) C	Target Not Detected	O controle é válido. RNA de HIV-1 não detectado.
	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controle negativo não é negativo.
Controle positivo	**Resultado**	**Interpretação**
HBV/HCV/HIV-1 L(+)C	Título	O controle é válido. O título calculado está dentro da faixa de controle.
	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado de título calculado do controle positivo baixo não está dentro da faixa atribuída.
HBV/HCV/HIV-1 H(+)C	Título	O controle é válido. O título calculado está dentro da faixa de controle.
	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controle positivo alto não está dentro da faixa atribuída.

Interpretação dos resultados do teste quantitativo cobas® HIV-1

Nota: a validação de todos os ensaios e baterias é determinada pelo software cobas® 4800.

Nota: uma bateria válida pode incluir resultados de amostra válidos e inválidos.

Para uma bateria válida, os resultados de amostra são interpretados conforme exibido em Tabela 2.

Tabela 2: Resultados alvo para a interpretação de resultados individuais

HIV-1	Relatório e interpretação de resultados
Target Not Detected	RNA de HIV não detectado. Reportar resultados como “HIV não detectado”.
< Titer Min	O título calculado está abaixo do limite inferior de quantificação (LLoQ) do ensaio. Reportar resultados como “HIV detectado, inferior a (título mín.)”. Título mín. = 2,00E+01 cp/ml e 3,33E+01 UI/ml (400 µl de plasma) Título mín. = 6,00E+01 cp/ml e 1,00E+02 UI/ml (200 µl de plasma diluído) Título mín. = 5,99E+02 cp/ml e 9,98E+02 UI/ml (amostras de **PSC**)
Título	O título calculado está dentro da faixa linear do ensaio – superior ou igual ao título mín. e inferior ou igual ao título máx. Reportar resultados como “(Título) de HIV-1 detectado”.
> Titer Max[a]	O título calculado está acima do limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio. Reportar resultados como “HIV detectado, superior a (título máx.)”. Título máx. = 1,00E+07 cp/ml e 1,67E+07 UI/ml (400 µl de plasma, 200 µl de plasma diluído e amostras de **PSC**)
Invalid	O alvo é inválido, O controle interno é inválido ou negativo; ou Um controle externo é inválido

[a] Resultado de amostra > Titer Max refere-se às amostras positivas de HIV-1 detectadas com títulos acima do limite superior de quantificação (ULoQ). Se se desejar um resultado quantitativo, a amostra original deverá ser diluída com plasma-EDTA negativo para o HIV-1, e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado reportado pelo fator de diluição.

Lista de alarmes de resultados para o teste quantitativo cobas® HIV-1

A seguinte tabela exibe todos os alarmes que são relevantes para a interpretação de resultados.

Tabela 3: Lista de alarmes

Código do alarme	Descrição	Ação recomendada
R4800	O alvo é inválido devido a falha de cálculo.	O alvo é inválido devido a falha de cálculo. 1. Execute a amostra novamente. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4801	O padrão de quantificação é inválido.	O padrão de quantificação é inválido para uma amostra. 1. Execute a amostra novamente. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4802	Um controle externo é inválido.	Um controle externo é inválido.[a] 1. Repita a corrida com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4803	O padrão de quantificação é inválido.	O padrão de quantificação é inválido para um controle externo. 1. Repita a corrida com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4804	O controle externo está fora da faixa.	O controle externo está fora da faixa.[b] 1. Repita a corrida com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
X3	Erro: Foi detectado um coágulo. A amostra não foi processada.	Certifique-se de que as amostras foram manuseadas de acordo com a descrição do fluxo de trabalho. 1. Verifique se a amostra tem coágulos. 2. Execute a amostra novamente.
X4	Erro: ocorreu um erro de pipetagem. A amostra não foi processada.	Um volume de amostra insuficiente ou um erro mecânico durante a pipetagem é o motivo mais provável. 1. Certifique-se de que há volume de amostra suficiente. 2. Verifique se a placa de ejeção de ponteiras está colocada corretamente. 3. Execute a amostra novamente.

[a] Este é um alarme de amostra que ocorre quando um controle externo da corrida é definido como inválido.

[b] Este alarme inclui todos os cenários em que o controle externo é inválido (título ou determinação do alvo).

Nota: para todos os alarmes do sistema, consulte a Assistência ao usuário do sistema cobas® 4800.

Limitações processuais

1. O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 foi avaliado apenas para uso em combinação com o **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, o **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2, o **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2, o **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit e o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2.
2. Resultados confiáveis dependem da coleta, do transporte, da armazenagem e do processamento adequados das amostras. Siga os procedimentos deste documento de instruções de utilização (também designado como folheto informativo) e da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
3. O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 foi validado apenas para uso com plasma EDTA ou com gotas secas de plasma do **cobas**® Plasma Separation Card (**PSC**). Testar outros tipos de amostra pode originar resultados imprecisos.
4. A quantificação do RNA do HIV-1 depende do número de partículas virais presentes nas amostras e pode ser afetada pelos métodos de coleta de amostra, por fatores inerentes ao próprio paciente (p. ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou a fase da infecção.
5. 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 detecção da presença do vírus.
6. O valor preditivo de um ensaio depende da prevalência da doença em uma determinada população.
7. A adição de enzima AmpErase à mistura principal **cobas**® HIV-1 permite a amplificação seletiva do ácido nucleico alvo; no entanto, para evitar a contaminação dos reagentes e das misturas de amplificação, é necessário observar boas práticas de laboratório e cumprir cuidadosamente os procedimentos especificados neste documento de instruções de uso.
8. O uso deste produto deve estar limitado a pessoal treinado em técnicas de PCR e no uso do sistema **cobas**® 4800.
9. Apenas o instrumento **cobas**® x 480 e o analisador **cobas**® z 480 foram validados para uso com este produto. Nenhum outro equipamento de preparação da amostra ou sistema de PCR pode ser usado com este produto.
10. Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os usuários realizem estudos de correlação de métodos em seus laboratórios, para qualificar diferenças tecnológicas. Os usuários devem seguir suas próprias políticas/procedimentos específicos.
11. A contaminação cruzada pode causar resultados falsos-positivos. Um estudo não clínico determinou que a taxa de contaminação cruzada de amostra para amostra do **cobas**® HIV-1 foi de 0,0%. Não foi observada contaminação cruzada de corrida para corrida.
12. O teste quantitativo **cobas**® HIV-1 não foi concebido para ser usado como teste de rastreio da presença de HIV-1 em sangue ou em produtos sanguíneos.

Avaliação não clínica do desempenho do teste quantitativo cobas® HIV-1

Principais características de desempenho para amostras de plasma EDTA

Limite de detecção (LoD) para amostras de plasma EDTA

O limite de detecção do **cobas**® HIV-1 foi determinado mediante a análise de diluições em série do padrão internacional da OMS para o RNA de HIV-1 relativo a ensaios com tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (2.º padrão internacional da OMS) do grupo M, subtipo B, obtido a partir de NIBSC, em plasma EDTA negativo para o HIV, utilizando volumes de processamento de amostras de 400 µl e 200 µl. Painéis de seis níveis de concentração mais um negativo foram testados em três lotes de reagentes **cobas**® HIV-1, várias corridas, dias, operadores e instrumentos.

Os resultados do plasma EDTA dos dois volumes de processamento são exibidos em Tabela 4 e Tabela 5. O estudo demonstra que o **cobas**® HIV-1 detectou RNA de HIV-1 com uma concentração de 14,2 cp/ml (23,7 UI/ml) conforme determinado por PROBIT com uma taxa de positividade ≥ 95% relativamente ao volume de processamento de amostras de 400 µl e com uma concentração de 43,9 cp/ml (73,4 UI/ml) relativamente ao volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 4: Limite de detecção em plasma EDTA (400 µl)

Concentração de título de entrada (RNA de HIV-1 cp/ml)	Concentração de título de entrada (RNA de HIV-1 UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade
60,0	100,0	252	252	100,0%
30,0	50,0	251	251	100,0%
20,0	33,3	252	247	98,0%
10,0	16,7	252	227	90,1%
5,0	8,3	252	160	63,5%
2,0	3,3	252	86	34,1%
0,0	0,0	71	0	0,0%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%		14,2 cp/ml; faixa de confiança de 95%: 12,5-16,6 cp/ml 23,7 UI/ml; faixa de confiança de 95%: 20,8-27,7 UI/ml		

Tabela 5: Limite de detecção em plasma EDTA (200 µl)

Concentração de título de entrada (RNA de HIV-1 cp/ml)	Concentração de título de entrada (RNA de HIV-1 UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade
100,0	166,7	251	251	100,0%
60,0	100,0	251	249	99,2%
30,0	50,0	251	227	90,4%
15,0	25,0	250	172	68,8%
7,0	11,7	250	110	44,0%
3,5	5,8	250	83	33,2%
0,0	0,0	68	0	0,0%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%		43,9 cp/ml; faixa de confiança de 95%: 37,7-52,7 cp/ml 73,4 UI/ml; faixa de confiança de 95%: 62,9-88,1 UI/ml		

Faixa linear para amostras de plasma EDTA

Foi determinada a linearidade do **cobas**® HIV-1 por análise de uma série de diluições, usando um painel de 12 membros (volume de processamento de amostras de 400 µl) e um painel de 11 membros (volume de processamento de amostras de 200 µl) abrangendo a faixa linear de ensaio do grupo M predominante, subtipo B do HIV-1. Os membros do painel foram preparados a partir de amostra de sobrenadante de cultura de células com RNA de HIV-1 positivo de título elevado.

Com o volume de processamento de 400 µl, o **cobas**® HIV-1 foi linear de 20,0 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (33,3 UI/ml a 1,67E+07 UI/ml) e exibiu um desvio máximo de ±0,07 $\log_{10}$, calculado com o método de regressão linear mais adequado (veja Figura 15). Ao longo da faixa linear, a exatidão do teste estava dentro de ±0,18 $\log_{10}$.

Com o volume de processamento de 200 µl, o **cobas**® HIV-1 foi linear de 60,0 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (100,0 UI/ml a 1,67E+07 UI/ml) e exibiu um desvio máximo de ±0,08 $\log_{10}$, calculado com o método de regressão linear mais adequado (veja Figura 16). Ao longo da faixa linear, a exatidão do teste estava dentro de ±0,19 $\log_{10}$.

Figura 15: Determinação da faixa linear em plasma EDTA (400 µl)

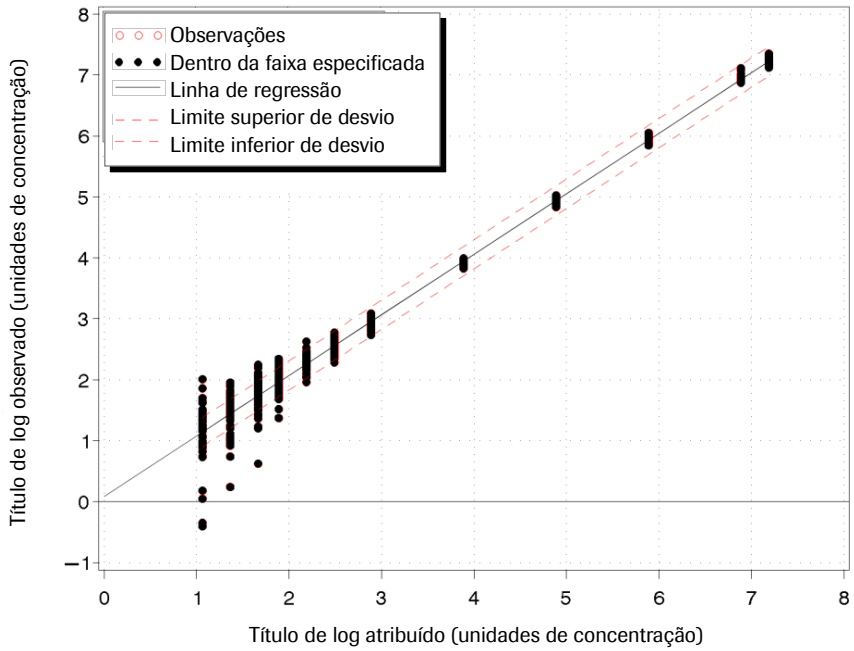
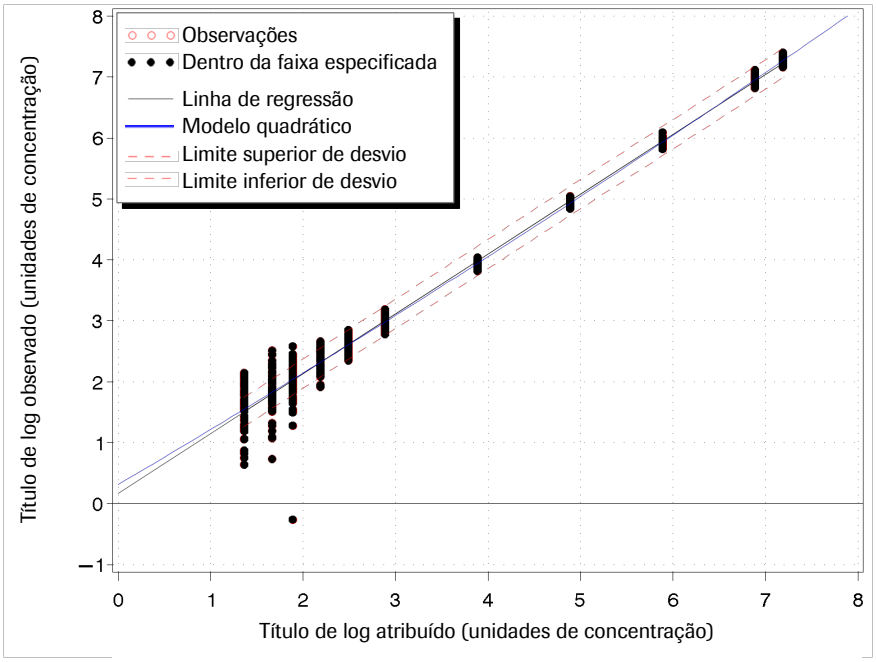


Figura 16: Determinação da faixa linear em plasma EDTA (200 µl)



Precisão - no laboratório para amostras de plasma EDTA

A precisão do **cobas**® HIV-1 foi determinada por 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 sete níveis de diluição (volume de processamento de amostras de 400 µl) e cinco níveis de diluição (volume de processamento de amostras de 200 µl) em 16 réplicas para cada nível e volume de processamento com três lotes de reagentes do **cobas**® HIV-1 usando três instrumentos e quatro operadores ao longo de 15 dias. Os resultados são exibidos na Tabela 6 e na Tabela 7.

O **cobas**® HIV-1 demonstrou uma excelente precisão em três lotes de reagentes testados em um intervalo de concentração entre 1,0E+02 cp/ml e 2,00E+07 cp/ml com volume de processamento de amostras de 400 µl e entre 1,00E+04 cp/ml e 2,00E+07 cp/ml com volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 6: Precisão em laboratório do cobas® HIV-1 (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de amostras de 400 µl)[a]

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 junto
2,0E+07	1,54E+07	Cultura celular	0,05	0,05	0,04	0,05
1,0E+06	7,70E+05	Cultura celular	0,05	0,05	0,05	0,05
1,0E+05	7,70E+04	Cultura celular	0,05	0,05	0,05	0,05
1,0E+04	7,70E+03	Cultura celular	0,04	0,06	0,07	0,06
1,0E+03	7,70E+02	Cultura celular	0,09	0,10	0,07	0,09
4,0E+02	3,08E+02	Cultura celular	0,08	0,10	0,09	0,09
1,0E+02	7,70E+01	Cultura celular	0,18	0,24	0,15	0,19

[a] Os dados de título 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 7: Precisão em laboratório do cobas® HIV-1 (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de amostras de 200 µl)[a]

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 junto
2,0E+07	1,54E+07	Vírus em cultura	0,04	0,04	0,04	0,04
1,0E+07	7,70E+06	Vírus em cultura	0,04	0,04	0,04	0,04
1,0E+06	7,70E+05	Vírus em cultura	0,03	0,04	0,05	0,04
1,0E+05	7,70E+04	Vírus em cultura	0,04	0,05	0,03	0,04
1,0E+04	7,70E+03	Vírus em cultura	0,05	0,04	0,04	0,04

[a] Os dados de título 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 grupo/subtipo para amostras de plasma EDTA

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 executada com o **cobas**® HIV-1.

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

Foram diluídas amostras de HIV-1 de cultura do HIV-1 M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O e HIV-1N em plasma EDTA plasma a concentrações de LoD do grupo/subtipo predominante (HIV-1 grupo M subtipo B) com base em análises LoD a uma taxa de positividade de 95% (20,0 cp/ml). A análise da taxa de positividade foi realizada com 42 réplicas para cada grupo/subtipo. Estes resultados demonstram que o **cobas**® HIV-1 detectou HIV para HIV-1M (A, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O e HIV-1N à concentração de 20 cp/ml, com uma faixa de confiança superior unilateral de 95% superior à taxa de positividade esperada de 95%.

Tabela 8: Verificação do limite de detecção (LoD) dos subtipos do grupo M, do grupo O e do grupo N do HIV-1 em plasma EDTA a 400 µl

Grupo	Subtipo	Concentração testada: 20,0 cp/ml		
		Número de réplicas positivas	Número de réplicas válidas	Taxa de positividade em % (IC superior unilateral de 95%)
M	A	39	42	92,86% (98,02%)
C		42	42	100% (100%)
D		41	42	97,62% (99,88%)
F		39	42	92,86% (98,02%)
G		38	42	90,48% (96,68%)
H		41	42	97,62% (99,88%)
CRF01_AE		40	42	95,24% (99,15%)
CRF02_AG		41	42	97,62% (99,88%)
O		39	42	92,86% (98,02%)
N		41	42	97,62% (99,88%)

Verificação da faixa linear dos subtipos do grupo M, e do grupo O e do grupo N

As séries de diluição usadas na verificação do estudo de linearidade de subtipos do **cobas**® HIV-1 consistem em sete membros de painel abrangendo a faixa linear. Os membros do painel foram preparados a partir de amostras de sobrenadante de cultura de células com RNA de HIV-1 positivo de título elevado, do respectivo grupo/subtipo. A faixa linear testada do **cobas**® HIV-1 estendeu-se desde o LLoQ (20,0 cp/ml para um volume de processamento de amostras de 400 µl) até ao ULoQ (1,0E+07 cp/ml) e incluiu, pelo menos, dois pontos de decisão clínica. Foram testadas 12 réplicas por nível em plasma EDTA.

A faixa linear do **cobas**® HIV-1 foi verificada 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 inferior a 0,12 $\log_{10}$.

Especificidade para amostras de plasma EDTA

A especificidade do **cobas**® HIV-1 foi determinada mediante a análise de amostras de plasma EDTA negativas para o HIV de dadores individuais. Foram testadas 614 amostras individuais de plasma EDTA com três lotes de reagentes **cobas**® HIV-1. Todas as amostras tiveram resultado negativo relativo a RNA de HIV-1. No painel de teste, a especificidade do **cobas**® HIV-1 foi de 100,0% [o limite inferior de confiança de 95% unilateral (Clopper Pearson) era 99,5%].

Especificidade analítica

A especificidade analítica do **cobas**® HIV-1 foi avaliada mediante a diluição de um painel de agentes patogênicos com RNA de HIV positivo e com plasma EDTA com RNA de HIV negativo (Tabela 9). Os agentes patogênicos foram adicionados a plasma EDTA negativo e testados com e sem RNA 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 agentes patogênicos sem alvo de HIV-1 e resultados positivos em todas as amostras de agentes patogênicos com alvo de HIV-1. Além disso, o título médio de $\log_{10}$ de cada uma das amostras de HIV-1 positivo contendo organismos com potencial de reatividade cruzada estava dentro de ±0,32 $\log_{10}$ do título médio de $\log_{10}$ do respectivo controle positivo.

Tabela 9: Agentes patogênicos testados a reatividade cruzada

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

Especificidade analítica – substâncias interferentes

Níveis elevados de triglicéridos (27,9 a 29,0 g/l), de bilirrubina conjugada (0,18 a 0,22 g/l), de bilirrubina não conjugada (0,19 a 0,2 g/l), de albumina (57,8 a 60,6 g/l), de hemoglobina (1,8 a 2,3 g/l) e de DNA humano (2 mg/l) nas amostras foram testados na presença e ausência de RNA de HIV. Foi demonstrado que as substâncias testadas não interferem com o desempenho do teste **cobas**® HIV-1. Além disso, foi testada a presença de marcadores para as doenças autoimunes lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR) e anticorpos antinucleares (ANA).

Adicionalmente, os compostos de fármacos listados na Tabela 10 foram testados com três vezes a C_{max} com e sem RNA de HIV.

Ficou demonstrado que todas substâncias potencialmente interferentes não interferem 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. Além disso, o título médio de $\log_{10}$ de cada uma das amostras de HIV-1 positivo contendo substâncias potencialmente interferentes estava a ±0,20 $\log_{10}$ dentro do título médio de $\log_{10}$ do respectivo controle positivo.

Tabela 10: Compostos de fármacos testados à potencial interferência com a quantificação de RNA de HIV pelo cobas® HIV-1

Classe do fármaco	Nome genérico do fármaco	
Moduladores de imunidade	Peginterferon α-2a	Ribavirina
	Peginterferon α-2b	
Inibidor de fusão de HIV	Maraviroc	
Inibidores da integrase de HIV	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos de HIV	Efavirenz	Nevirapina
	Etravirina	Rilpivirina
Inibidores de protease de HIV	Atazanavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
	Lopinavir	Tipranavir
Inibidores de protease de HCV	Boceprevir	Telaprevir
	Simeprevir	
Inibidores de transcriptase reversa ou de DNA polimerase	Abacavir	Ganciclovir
	Aciclovir	Lamivudina
	Adefovir dipivoxil	Sofosbuvir
	Cidofovir	Telbivudina
	Emtricitabina	Tenofovir
	Entecavir	Valganciclovir
	Foscarnet	Zidovudina
Compostos para o tratamento de infecções oportunistas	Azitromicina	Pirazinamida
	Claritromicina	Rifabutina
	Etambutol	Rifampicina
	Fluconazol	Sulfametoxazol
	Isoniazida	Trimetoprima

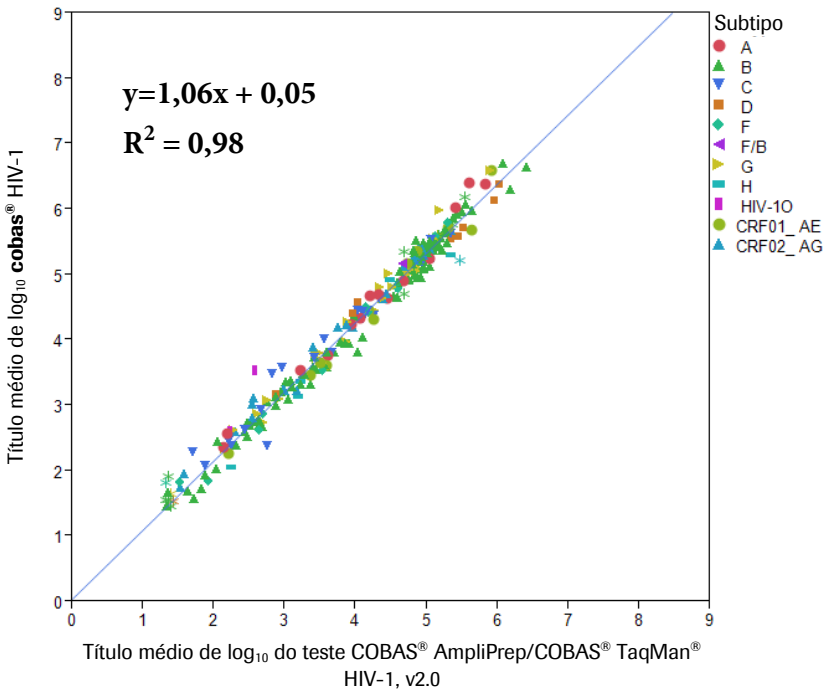
Método de correlação para amostras de plasma EDTA

Avaliação do desempenho do cobas® HIV-1 em comparação 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 mediante a análise de 243 amostras de plasma EDTA de pacientes infectados com HIV-1. As amostras constituídas por HIV-1 M (A-D, F-H, F/B, CRF01_AE, CRF02_AG) e HIV-1 O foram testadas em duplicado em uma localização externa. A regressão de Deming foi executada considerando os títulos transformados em log.

Os resultados da regressão de Deming são exibidos na Figura 17. O símbolo * nas figuras indica determinação individual. A cor representa o subtipo.

Figura 17: Análise de regressão do cobas® HIV-1 versus teste TaqMan® HIV-1, v2.0, amostras de plasma EDTA



Falha global do sistema para amostras de plasma EDTA

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 × LoD.

Os resultados desse 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 0,0%. A faixa de confiança bilateral exato de 95% foi de 0,0% para o limite inferior e de 3,6% para o limite superior [0%: 3,6%].

Contaminação cruzada para amostras de plasma EDTA

A taxa de contaminação cruzada para o **cobas**® HIV-1 foi determinada testando 230 réplicas de amostras de plasma EDTA negativo para o HIV e 235 réplicas de uma amostra de HIV-1 de título elevado a 1,9E+07 cp/ml. No total, foram executadas cinco corridas com amostras positivas e negativas em uma configuração de “tabuleiro de xadrez”.

Todas as 230 réplicas das amostras negativas eram negativas, resultando em uma taxa de contaminação cruzada de 0,0%, com uma faixa de confiança unilateral superior a 95% de 1,3%.

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

Limite de detecção (LoD)

O limite de detecção do **cobas**® HIV-1 em combinação com o **PSC** foi determinado mediante 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, várias corridas, dias, operadores e instrumentos. 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 3.º 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**, dadores negativos e séries de diluições com atribuições de títulos de plasma individuais (CBM) são exibidos na Tabela 11. O estudo demonstra que o **cobas**® HIV-1, em combinação com o **PSC**, detectou RNA do HIV-1 a uma concentração de 598,6 cp/ml (997,7 UI/ml) com uma taxa de positividade de 95% por análise Probit.

Tabela 11: Limite de detecção em combinação com o PSC

Concentração de título de plasma atribuído (RNA de HIV-1 cp/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade
2356,6	63	63	100,0%
1970,4	63	63	100,0%
2262,4	63	63	100,0%
1177,4	63	63	100,0%
984,5	63	62	98,4%
1130,3	63	63	100,0%
783,8	63	60	95,2%
655,3	63	63	100,0%
752,4	62	61	98,4%
391,9	63	58	92,1%
327,7	63	54	85,7%
376,2	62	41	66,1%
195,9	63	33	52,4%
163,8	63	32	50,8%
188,1	63	25	39,7%
0	144	1	0,7%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%	598,6 cp/ml; faixa de confiança de 95%: 526,4-707,0 cp/ml 997,7 UI/ml; faixa de confiança de 95%: 877,3-1178,3 UI/ml		

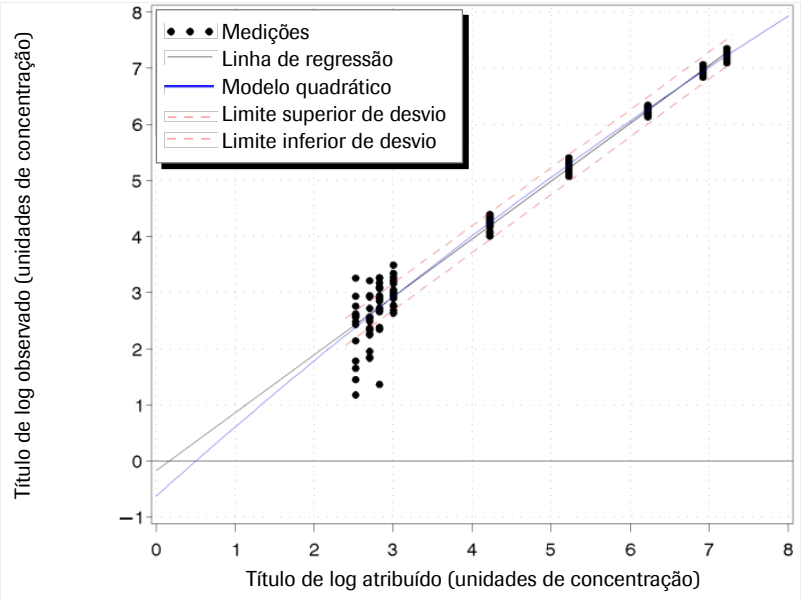
Faixa linear utilizando o PSC

O estudo da linearidade do **cobas**® HIV-1 em combinação com o **PSC** foi executado com uma série de diluições constituída por um painel de 9 membros que abrangem a faixa linear do HIV-1, grupo M, subtipo B predominante. Os membros do painel foram preparados a partir de uma amostra de sobrenadante de cultura de células com RNA de HIV-1 positivo de título elevado. A avaliação foi executada de acordo com a diretiva EP06-A do CLSI.[21] Foram analisados 2 lotes de **PSC** e 2 lotes de reagentes em 2 sistemas **cobas**® 4800, por 1 operador e um total de 20 réplicas por membro do painel e por lote de reagente/**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 3.º 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 599 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml (998 UI/ml a 1,67E+07 UI/ml) e exibe um desvio absoluto em relação ao método de regressão não linear mais ajustado de menos de ±0,07 $\log_{10}$ com o **PSC** (veja a Figura 18). Ao longo da faixa linear, a exatidão do teste estava dentro do desvio de ±0,04 $\log_{10}$ do ajuste da regressão linear.

Figura 18: Determinação da faixa linear utilizando o PSC



Precisão – intra-laboratório utilizando o PSC

A precisão do **cobas**® HIV-1 em combinação com o **PSC** foi determinada mediante a análise de diluições em série de uma amostra de HIV-1 positiva alta (amostra de sobrenadante de cultura de células com RNA de HIV-1 positivo de título elevado) em sangue total negativo para HIV. Foram testados cinco níveis de diluição em 48 réplicas para cada nível com dois lotes de **PSC** e dois lotes de reagentes de teste **cobas**® HIV-1, utilizando dois instrumentos e dois operadores ao longo de 12 dias. Cada amostra passou por todo o fluxo de trabalho do **PSC** e o procedimento do teste **cobas**® HIV-1 nos sistemas **cobas**® 4800. A precisão aqui reportada representa todos os aspectos do procedimento de teste. Os resultados são exibidos na Tabela 12.

O **cobas**® HIV-1 em combinação com o **PSC** demostrou alta precisão em dois lotes de **PSC** e reagentes testados em uma faixa de concentração de 1,50E+03 cp/ml a 1,00E+07 cp/ml.

Tabela 12: Precisão intra-laboratório do cobas® HIV-1 em combinação com o PSC

Concentração nominal (cp/ml)	Título de log_{10} médio observado	Material de origem	PSC		
			Lote 1	Lote 2	Todos os lotes
			DP	DP	DP junto
1,0E+07	6,98	Cultura celular	0,08	0,07	0,08
1,0E+06	5,92	Cultura celular	0,09	0,09	0,09
1,0E+05	4,88	Cultura celular	0,09	0,11	0,10
1,0E+04	3,97	Cultura celular	0,17	0,14	0,16
1,5E+03	3,19	Cultura celular	0,26	0,19	0,23

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 ao qual foi adicionado HIV-1 de grupo M subtipo B. Estas amostras foram testadas com uma concentração alvo de aproximadamente 3 × LoD.

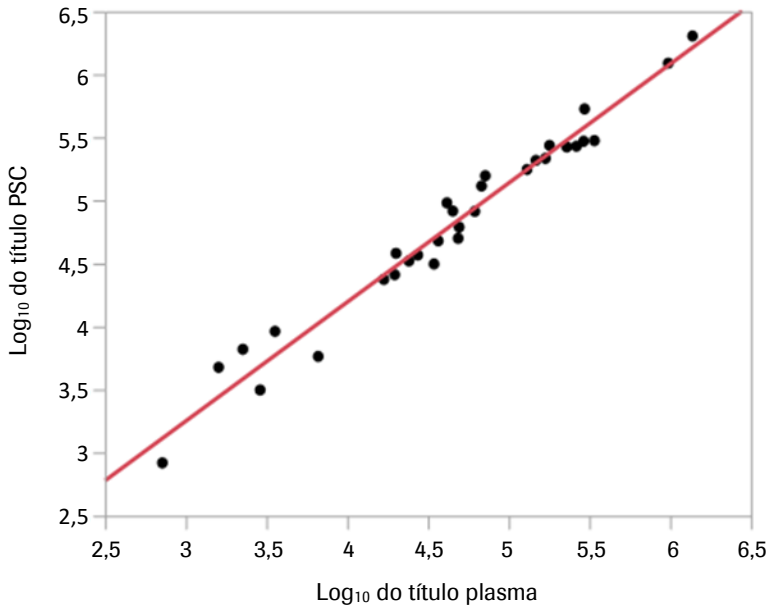
Os resultados desse estudo determinaram que todas as réplicas eram válidas e positivas para o alvo de HIV-1, originando uma taxa de falha do sistema global de 0,0%. A faixa de confiança bilateral exato de 95% foi de 0,0% para o limite inferior e de 3,6% para o limite superior [0%: 3,6%].

Desempenho de amostras de gotas secas de plasma PSC comparado com amostras de plasma

O desempenho de amostras de gotas secas de plasma **PSC** foi comparado com amostras de plasma EDTA centrifugadas, mediante análise de 31 amostras de pacientes infectados com HIV-1. As amostras foram testadas com uma réplica cada (gota seca de plasma **PSC** e plasma EDTA). Os títulos abaixo da faixa de quantificação foram excluídos da análise.
A regressão de Deming foi executada considerando os títulos transformados em log.

Os resultados da regressão de Deming são exibidos na Figura 19 e na Tabela 13.

Figura 19: Regressão de Deming



Resumo do ajuste	
R^2	0,97
R^2 Adj	0,97
Raiz do erro médio quadrático	0,14
Média da resposta	4,81
Observações (ou soma dos pesos)	31,00

Tabela 13: 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	Intercepção	R^2
PSC vs plasma líquido	31	0,15	[0,10; 0,21]	0,94	0,42	0,97

Resumo e explicação do cobas® HIV-1 para a detecção qualitativa de HIV-1 em gotas secas de sangue

Enquadramento

O HIV é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) com mais de 35 milhões de pessoas infectadas[22] em todo o mundo. Geralmente, após a seroconversão, os indivíduos infectados entram em uma fase clinicamente estável e relativamente assintomática que pode durar anos. Sem tratamento antirretroviral, geralmente os indivíduos evoluem para AIDS, que se caracteriza pela diminuição de células CD4+ no sistema imunológico, pela suscetibilidade a infecções oportunistas e eventual morte.[22]

Fundamentação para testes qualitativos de HIV-1

Historicamente, os testes de HIV têm se baseado na resposta de anticorpos que os pacientes produzem contra o vírus. Embora estes anticorpos sejam ineficazes no combate ao vírus, eles são encontrados em quase todos os pacientes infectados cronicamente.

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos podem diagnosticar a infecção por HIV durante os primeiros 18 meses de vida do bebê, enquanto o seu sangue ainda contém anticorpos maternos que complicam a interpretação de testes sorológicos. A detecção de HIV-1 em gotas secas de sangue pode comprovar uma infecção atual, usando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação de polimerase em cadeia (PCR).

Explicação do teste qualitativo de HIV-1

O **cobas**® HIV-1 pode ser usado como um teste qualitativo de ácidos nucleicos executado no **cobas**® 4800. O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 permite a detecção de ácidos nucleicos do HIV-1 em DBS de pacientes infectados. São usadas duas sondas para detectar, mas não descriminar, subtipos do grupo M, N e O.

O RNA QS fornecido com este kit funciona como um controle interno para monitorar toda a preparação de amostras e o processo de amplificação por PCR no contexto da aplicação da DBS qualitativa. Adicionalmente, o teste usa dois controles externos: o controle positivo de título baixo e um controle negativo (o controle positivo alto não é necessário para o teste qualitativo **cobas**® HIV-1).

Princípios do procedimento

O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 se baseia na preparação totalmente automatizada da amostra (extração e purificação do ácido nucleico) seguida de amplificação por PCR e detecção. O sistema **cobas**® 4800 é constituído pelo instrumento de preparação de amostras **cobas**® x 480 e o analisador PCR em tempo real **cobas**® z 480. O gerenciamento automático de dados é executado pelo software **cobas**® 4800, que atribui resultados de teste a todos os testes, na forma de detectado, não detectado ou inválido. Os resultados podem ser revisados diretamente na tela do sistema, exportados ou impressos como um relatório.

São extraídos simultaneamente os ácidos nucleicos de amostras de paciente, de controles externos e de moléculas de RNA QS (que servem de controle no processo de preparação da amostra e amplificação/detecção). Resumidamente, os ácidos nucleicos virais são liberados mediante a adição de proteinase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos liberados ligam-se à superfície de sílica das partículas magnéticas de vidro adicionadas. As substâncias não ligadas

e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR, são removidas com os passos seguintes do reagente de lavagem, e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas com tampão de eluição a elevada temperatura.

A amplificação seletiva dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida mediante o uso de primers senso e anti-senso específicos do vírus-alvo que são selecionados de regiões altamente conservadas do HIV. O gene gag do HIV-1 e a região LTR do HIV-1 (alvo duplo) são amplificados pelo **cobas**® HIV-1. A amplificação seletiva do RNA QS (que é usado e referido como controle interno da DBS) é conseguida mediante o uso de primers senso e anti-senso específicos da sequência, que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com o genoma do HIV. É usada uma enzima DNA polimerase termoestável tanto para a transcrição reversa quanto para a amplificação por PCR. As sequências-alvo e de RNA QS são amplificadas simultaneamente usando um perfil de amplificação por PCR universal com número de ciclos e passos de temperatura predefinidos. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no DNA recém sintetizado (amplicon).[14-16] Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados durante o primeiro passo do ciclo térmico, pela enzima AmpErase, que é incluída na mistura principal da PCR. No entanto, qualquer amplicon acabado de formar não é eliminado, visto que a enzima AmpErase fica inativa quando exposta a temperaturas superiores a 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® HIV-1 contém duas sondas de detecção específicas para as sequências-alvo de HIV-1 e uma para o RNA QS. As sondas estão identificadas com corantes sinalizadores fluorescentes específicos do alvo, que permitem a detecção simultânea de alvo de HIV-1 e de RNA QS em dois canais de detecção diferentes.[17, 18] Quando não ligados à sequência-alvo, os sinais fluorescentes das sondas intactas são suprimidos por um corante supressor. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o DNA alvo específico em cadeia simples resulta na sua clivagem pela atividade exonuclease 5' a 3' da DNA polimerase, resultando na 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 detecção e a discriminação em tempo real dos produtos da PCR são conseguidas medindo a fluorescência dos corantes sinalizadores liberados, para os alvos virais e para o RNA QS.

Materiais e reagentes para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Reagentes

Todos os reagentes e controles não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na tabela Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes.

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® HIV-1 120 testes (P/N: 08792992190)	**MMX R1** (Reagente 1 de mistura principal **cobas**®) Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida de sódio	10 × 1,75 ml	N/A
	HIV-1 MMX R2 (Reagente 2 de mistura principal **cobas**® HIV-1) Tampão de tricina, acetato de potássio, 18% de dimetil sulfóxido, glicerol, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,12% de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01% de primers de 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, < 0,01% aptâmero de oligonucleotídeo, < 0,01% de DNA polimerase Z05D (de origem microbiana), < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida de sódio	10 × 0,5 ml	N/A
	RNA QS usado como controle interno (IC) (Padrão de quantificação de RNA **cobas**®) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de regiões de sequências específicas de sondas e primer que contém construção de armored RNA não relacionado com HIV (RNA não infeccioso em bacteriófago MS2), < 0,1% de azida de sódio	10 × 1,75 ml	N/A

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit 10 conjuntos (P/N: 06979572190)	**HBV/HCV/HIV-1 L(+)C usado como controle positivo** (Controle positivo baixo do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1) < 0,001% de (armored) RNA sintético 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) RNA sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	 **ALERTA** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. P261 Evite respirar as poeiras/fumos/gases/ névoas/vapores/aerossóis. P272 A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P280 Use luvas de proteção. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P362 + P364 Dispa a roupa contaminada e lave antes de usar novamente. P501 Elimine o conteúdo/recipiente em uma 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)
	HBV/HCV/HIV-1 H(+)C não usado para DBS (Controle positivo alto do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1) < 0,001% de (armored) RNA sintético 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) RNA sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	
	(–) C (Controle negativo **cobas**®) Plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HIV-1/2, anticorpos do HCV, HBsAg, anticorpos do HBc; RNA do HIV-1, RNA do HIV-2, RNA do HCV e ADN do HBV não detectável por métodos de PCR < 0,1% de conservante ProClin® 300[b]	10 × 0,75 ml	

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 240 testes (P/N: 06979513190)	**MGP 2** (Reagente 2 **cobas**® 4800 MGP) Partículas de vidro magnéticas, tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 8 ml	N/A
	EB 2 (Tampão de eluição 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 960 testes (P/N: 06979521190)	**MGP 2** (Reagente 2 **cobas**® 4800 MGP) Partículas de vidro magnéticas, tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 16 ml	
	EB 2 (Tampão de eluição 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 testes (P/N: 05235863190)	**WB** (**cobas**® 4800 System Wash Buffer) Citrato de sódio desidratado, 0,05% de metil-N isotiazolinona HCl	10 × 55 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 testes (P/N: 05235871190)	**WB** (**cobas**® 4800 System Wash Buffer) Citrato de sódio desidratado, 0,05% de metil-N isotiazolinona HCl	10 × 200 ml	N/A
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2 240 testes (P/N: 06979556190)	**SD 2** (**cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2) Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida de sódio	10 × 8 ml	N/A

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 240 testes (P/N: 06979530190)	**P 2** (Protease 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase[b]	10 × 1,0 ml	 **PERIGO** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334 Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261 Evite respirar névoas ou vapores. P280 Use luvas de proteção. P284 Use proteção respiratória. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311 Em caso de sintomas respiratórios: Contate um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 39450-01-6 Proteinase, *Tritirachium album* serine
	LYS 2 (Tampão de lise 2 **cobas**® 4800) 43% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 5% (p/v) de polidocanol[b], 2% (p/v) de ditiotreitol[b], citrato de sódio dihidratado	10 × 27 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H411 Tóxico para organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. EUH071 Corrosivo para as vias respiratórias. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P391 Colete o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 960 testes (P/N: 06979548190)	**P 2** (Protease 2 **cobas**® 4800) Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase[b]	10 × 1,0 ml	 **PERIGO** H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H334 Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. P261 Evite respirar névoas ou vapores. P280 Use luvas de proteção. P284 Use proteção respiratória. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P342 + P311 Em caso de sintomas respiratórios: Contate um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 39450-01-6 Proteinase, *Tritirachium album* serine
	LYS 2 (Tampão de lise 2 **cobas**® 4800) 43% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 5% (p/v) de polidocanol[b], 2% (p/v) de ditiotreitol[b], citrato de sódio dihidratado	10 × 84 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H411 Tóxico para organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. EUH071 Corrosivo para as vias respiratórias. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P391 Colete o produto derramado. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol

Kit	Ingredientes de reagentes e componentes	Quantidade por kit	Símbolo e alerta de segurança[a]
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent (P/N 08064695190)	**SPER** (**cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent) 28% (p/p) de tiocianato de guanidina[b], 6% (p/v) de polidocanol[b], 1% (p/v) de ditiotreitol, citrato de sódio dihidratado	15 × 40 ml	 **PERIGO** H302 Nocivo se ingerido. H314 Provoca queimaduras graves na pele e lesões oculares graves. H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032 Em contato com ácidos liberta gás muito tóxico. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P301 + P330 + P331 SE INGERIDO: enxague a boca. NÃO induza o vômito. P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): dispa toda a roupa contaminada imediatamente. Enxague a pele com água. P304 + P340 + P310 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la em uma posição confortável para a respiração. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. P305 + P351 + P338 + P310 SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxague com água cuidadosamente durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se possível. Continue enxaguando. Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÕES ANTIVENENO/médico. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol

[a] A rotulagem relativa à segurança de produtos tem como base principalmente a diretriz GHS da UE

[b] Substância perigosa

Requisitos de manuseio e armazenagem de reagentes

Reagente	Temperatura de armazenagem	Tempo de armazenagem
cobas® HIV-1	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	15-25 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® 4800 System Lysis Kit 2	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada
cobas® Specimen Pre-Extraction Reagent	2-8 °C	Estável até à data de expiração indicada

Não congele os reagentes.

Materiais adicionais necessários

Materiais	P/N
Placa de extração (poços profundos) do sistema **cobas**® 4800 2,0 ml	06884008001
Placa AD (micro poços) do sistema **cobas**® 4800 0,3 ml	05232724001
Aplicador de película vedante	04900383001
Ponteiras CORE, 1000 µl, rack de 96	04639642001
Reservatório de reagente de 200 ml	05232759001
Reservatório de reagente de 50 ml	05232732001
Suporte de 24 posições	04639502001
Suporte de 32 posições	04639529001
Saco de resíduos sólidos	05530873001 (pequeno) ou 04691989001 (grande)
Manga plástica Hamilton STAR	04639669001
Luvas de laboratório, sem pó	São aceitáveis quaisquer luvas de laboratório sem pó.
Misturador Vortex (tubo único)	É aceitável qualquer misturador Vortex.
Centrífuga equipada com um rotor de cestos oscilantes com um RCF mínimo de 1500	Qualquer centrífuga adequada é aceitável.
Fórceps, ou pinça, esterilizado ou descartável[a]	Todos os tipos de pinças são aceitáveis.
Cartão de gotas secas de sangue	Papel de filtro Whatman 903®, cartão de coleta de amostra Munktell TFN ou equivalente (diâmetro da gota 12 a 13 mm)
Saco de amostra (plástico transparente ziplock que pode ser novamente selado) e saquetas de gel de sílica dessecante (para um total de ≥ 0,5 gramas)	N/A
Pipeta (p. ex., pipeta Multistepper)	N/A
Termomisturador	p. ex., Eppendorf Thermomixer® modelo R 5355 ou C ou equivalente com termobloco para 24 tubos cryo
Tubos, 5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno com tampas	p. ex., Greiner Bio-one Cryo.s™

[a] Para evitar a contaminação cruzada, use somente um par de fórceps para cada paciente! Recomenda-se o uso de fórceps de metal que sejam autoclavadas após cada utilização individual ou pinças de utilização única.

Para mais informações sobre materiais vendidos em separado, contate o representante local da Roche.

Glossário de termos simplificados para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Os seguintes termos simplificados são usados no contexto das instruções de uso, para referir alguns dos materiais e reagentes listados nesta seção.

Termo simplificado	**Material/Reagente**
(-)C	Controle negativo **cobas**®
Kit de amplificação/detecção	**cobas**® HIV-1
Kit de controles	**cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit
DBS	Gota seca de sangue
Placa de poços profundos	Placa de extração (poços profundos) do sistema **cobas**® 4800 2,0 ml
EB 2	Tampão de eluição 2 **cobas**® 4800
Kit de controle HBV/HCV/HIV-1	**cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit
H(+)C	Controle positivo alto do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1
Controle positivo alto	Controle positivo alto do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1
L(+)C	Controle positivo baixo do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1
Controle positivo baixo	Controle positivo baixo do **cobas**® HBV/HCV/HIV-1
LYS 2	Tampão de lise 2 **cobas**® 4800
Placa de micro poços	Placa AD (micro poços) do sistema **cobas**® 4800 0,3 ml
MGP 2	Reagente 2 **cobas**® 4800 MGP
MMX R1	Reagente 1 de mistura principal **cobas**®
MMX R2	Reagente 2 de mistura principal **cobas**® HIV-1
Controle negativo	Controle negativo **cobas**®
P 2	Protease 2 **cobas**® 4800
PSC	**cobas**® Plasma Separation Card
QS (designado como IC)	Padrão de quantificação de RNA **cobas**®
SD 2	**cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2
SPER	**cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent
WB	**cobas**® 4800 System Wash Buffer

Instrumentos e software necessário mas não fornecido para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Instrumentos e software necessários, não fornecidos
Sistema **cobas**® 4800 Instrumento **cobas**® x 480 Analisador **cobas**® z 480 Unidade de controle
Software de Aplicação (Core) do sistema **cobas**® 4800, versão 2.2.0 ou superior
Sistema **cobas**® 4800 **cobas**® HIV-1-qual-DBS AP v1.0.0 ou superior

Nota: contate o representante local da Roche para obter uma lista detalhada de pedidos de racks de amostras, racks de ponteiras, racks de reagentes e suportes de placas aceitos nos instrumentos.

Tubos de amostra suportados pelo teste qualitativo cobas® HIV-1

São suportados os seguintes tubos de amostra:

Tubos secundários para o tipo de amostra DBS

Diâmetro nominal (mm)	Volume de entrada de SPER (400 µl de volume de processamento)
12,5	700 µl

Para informações sobre pedidos de tubos de amostra específicos, contate o representante local da Roche.

Os tubos de amostra para o tipo amostra DBS apenas podem ser carregados com o suporte de amostras de 32 posições.

Precauções e requisitos de manuseio para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Alertas e precauções

Tal como com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para o desempenho adequado deste ensaio. Devido à elevada sensibilidade analítica deste teste, deve-se tomar cuidado para manter reagentes, amostras e misturas de amplificação isentas de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas como se estivessem infectadas, usando boas práticas laboratoriais, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no Documento M29-A4 do CLSI.[19, 20] Este procedimento apenas deve ser executado por pessoal com experiência no manuseio de material com risco biológico e na utilização do **cobas**® HIV-1-qual-DBS e do sistema **cobas**® 4800.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com precauções universais.
- O **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit contém plasma derivado de sangue humano. O material de origem foi submetido a um teste aprovado de anticorpos e foi considerado não-reativo para a presença de anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg e anticorpos do HBc. Os testes mediante métodos PCR não detectaram qualquer RNA de HIV-1, RNA de HIV-2, RNA de HCV e ADN de HBV. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- Evite a exposição de MGP a fontes de campos magnéticos.
- **Não congele sangue total ou quaisquer amostras armazenadas em tubos primários.**
- O **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent é sensível à luz e é enviado em frascos com proteção contra a luz.
- Para garantir o desempenho ideal do teste, use somente consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Estão disponíveis Fichas de Dados de Segurança (FDS) que podem ser pedidas ao representante local da Roche.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga os procedimentos e diretrizes fornecidos rigorosamente. Qualquer desvio destes procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se a contaminação por arraste de amostras não for controlada de forma adequada durante o manuseio e processamento da amostra.

- Para mais alertas, precauções e procedimentos para reduzir o risco de contaminação do instrumento **cobas**® x 480 ou do analisador **cobas**® z 480, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800. Se existir uma suspeita de contaminação, limpe e execute a manutenção semanal, conforme descrito na seção adequada da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Nota: ***para instruções específicas, veja "Coleta, transporte e armazenagem de amostras".***

Boas práticas de laboratório

- Não execute a pipetagem com a boca.
- Não coma, beba nem fume em áreas de trabalho no laboratório.
- Lave as mãos muito bem após manusear amostras e reagentes do kit e após retirar as luvas de laboratório.
- Use proteção ocular, jalecos de laboratório e luvas de laboratório descartáveis ao manusear quaisquer reagentes. Evite o contato destes materiais com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contato, lave imediatamente com água em abundância. Se não for feito um tratamento, poderão ocorrer queimaduras. Se ocorrer derrame, dilua com água antes de limpar com um pano seco.
- 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 deionizada ou destilada (diluir alvejante doméstico a 1:10). Seguidamente, esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Mantenha uma temperatura consistente no laboratório que esteja em conformidade com as especificações ambientais do sistema, conforme indicado na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Manuseio de reagentes

- Para evitar a contaminação por arraste de amostras ou controles, manuseie todos os reagentes, controles e amostras conforme as boas práticas de laboratório.
- Antes de usar, inspecione visualmente cada frasco de reagente para garantir que não existem sinais de vazamento. Se existir qualquer indício de vazamento, não use esse material para testes.
- O tampão de lise 2 **cobas**® 4800 e o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent contêm tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contato de reagentes com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente a zona afetada com água abundante, caso contrário poderão ocorrer queimaduras.
- O **cobas**® HIV-1, o **cobas**® 4800 Sample Preparation Kit 2 e o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 contêm azida de sódio como conservante. Evite o contato de reagentes com a pele, os olhos ou membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente a zona afetada com água abundante, caso contrário poderão ocorrer queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Não permita que o tampão de lise 2 **cobas**® 4800 ou o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent, que contêm tiocianato de guanidina, entrem em contato com solução de hipoclorito de sódio (alvejante). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.

Contaminação

- Para evitar contaminação, devem ser usadas luvas de laboratório que devem ser trocadas entre o manuseio de amostras e de reagentes do **cobas**® HIV-1. Evite contaminar as luvas de laboratório manuseando amostras e controles. Use luvas de laboratório, jalecos de laboratório e proteção ocular ao manusear amostras e reagentes do kit.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes.
- Poderão ocorrer resultados falsos-positivos se a contaminação por arraste de amostras não for prevenida durante o manuseio da amostra.

Integridade

- Não use kits fora das respectivas datas de expiração.
- Não junte reagentes.
- Não use artigos descartáveis depois das respectivas datas de expiração.
- Todos os artigos descartáveis são de utilização única. Não reutilizar.
- Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Descarte

- O **cobas**® HIV-1, o **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2 e o **cobas**® 4800 System Specimen Diluent 2 contêm azida de sódio (veja "**Alertas e precauções**"). A azida de sódio pode reagir com tubulações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao descartar soluções contendo azida de sódio em pias do laboratório, lave os canos com um grande volume de água fria para prevenir a formação de azidas.
- Descarte reagentes não usados e resíduos em conformidade com a legislação local, estadual, federal e nacional.

Nota: ***para o descarte de resíduos líquidos, consulte a Assistência ao usuário do sistema cobas® 4800.***

Derrames e limpeza

- O tampão de lise 2 **cobas**® 4800 e o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent contêm tiocianato de guanidina. Se for derramado líquido que contenha tiocianato de guanidina, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Não permita que entre em contato com desinfetantes que contenham hipoclorito de sódio, como alvejante. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Se for derramado material de origem humana, desinfete imediatamente com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou deionizada (alvejante doméstico diluído a 1:10) ou siga os procedimentos adequados do local.
- Se forem derramadas amostras de gotas secas de sangue em **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (que contém tiocianato de guanidina), não permita que entre em contato com desinfetantes que contenham hipoclorito de sódio, como alvejante. Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico. PRIMEIRO, limpe a área afetada com detergente laboratorial e água e depois com hipoclorito de sódio a 0,5%.
- Se o derrame ocorrer no instrumento **cobas**® x 480, siga as instruções de limpeza apresentadas na Assistência ao usuário adequado do sistema **cobas**® 4800.

- Não use solução de hipoclorito de sódio (alvejante) para limpar o instrumento **cobas**® x 480 ou o analisador **cobas**® z 480. Limpe o instrumento **cobas**® x 480 ou o analisador **cobas**® z 480 de acordo com os procedimentos descritos na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Coleta, transporte e armazenagem de amostras

Nota: manuseie todas as amostras como se elas possam transmitir agentes infecciosos.

Armazene todas as amostras às temperaturas especificadas.

A estabilidade da amostra é afetada por temperaturas elevadas.

Gotas secas de sangue

- Verifique a data de expiração do cartão de DBS e continue somente se o cartão ainda não tiver expirado.
- Colete amostras de DBS usando procedimentos clínicos adequados.
- Recomenda-se a aplicação de um mínimo de 70 µl de sangue capilar dentro do círculo delineado no cartão de DBS.
- Certifique-se de que AMBOS os lados do papel estão saturados e o círculo delineado está totalmente cheio.
- Coloque o cartão de DBS em uma rack de secagem (um cartão por nível) ou em uma superfície plana e deixe o cartão de DBS secar à temperatura ambiente (entre 18 e 25 °C) durante pelo menos 4 horas (até ao máximo de uma noite), protegendo o cartão da luz direta do sol.
- Para mais detalhes, consulte o folheto informativo dos papéis de filtro usados.
- Recomenda-se que prepare pelo menos 3 discos de papel por amostra de paciente.
- Guarde as DBS em sacos individuais que possam ser novamente selados com uma saqueta dessecante em cada saco e proteja da luz solar.
- A DBS pode ser transportada ou armazenada entre 15 e 30 °C durante até 3 meses.
- Se as amostras tiverem de ser enviadas, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

Instruções de uso para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Preparação da amostra de gota seca de sangue DBS e procedimento pré-analítico

- Abra o saco de transporte e, para cada saco de amostra, prossiga apenas se:
  - O formulário de pedido do laboratório estiver totalmente preenchido.
  - Os códigos de barras do formulário de pedido do laboratório e do cartão de DBS corresponderem.
  - O saco de amostra estiver totalmente fechado e contiver um cartão de DBS com uma saqueta dessecante.
  - A data de coleta da amostra estiver disponível e a coleta de amostra tiver ocorrido antes da data de expiração do cartão de DBS.
- Deixe o **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER) equilibrar à temperatura ambiente antes de usar.

Nota: ***garanta que apenas usa reagente SPER e nunca outro tipo de reagente de pré-extração (p. ex., SPEX).***

- Remova uma DBS do cartão de DBS.
- Transfira a gota para um tubo (5 ml, rosca interna, 12,5 mm de diâmetro, polipropileno [ou seja, tubo Cryo.s™]) usando um novo conjunto de pinça ou fórceps esterilizado descartável para cada paciente.
- Certifique-se de que a DBS está no fundo do tubo, como exibido na Figura 20.
- Pipete 700 µl de SPER para o tubo que contém a DBS e coloque uma tampa no tubo.

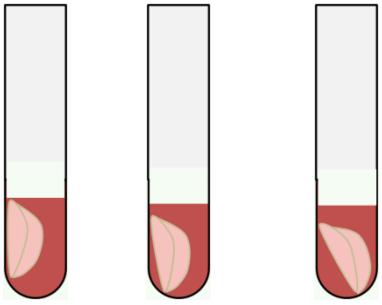
Nota: ***para um desempenho correto do ensaio, é importante pipetar a quantidade exata de 700 µl de SPER (ou seja, nem mais nem menos que 700 µl).***

- Certifique-se de que a DBS está completamente coberta de SPER.
- Coloque os tubos com tampas em um termomisturador pré-aquecido (p. ex., Eppendorf Thermomixer® modelo R 5355 ou C ou equivalente) com termobloco para 24 tubos cryo e proceda a incubação durante 10 minutos a 56 °C e 1000 rpm para extrair o vírus do sangue total seco.
- Retire as tampas dos tubos e certifique-se de que a DBS está fixa à parede do tubo (Figura 21) para evitar coágulos de amostra.
- Elimine qualquer potencial película líquida localizada acima do nível do líquido (Figura 22) usando uma ponteira da pipeta esterilizada (para evitar detecção de nível prematura).
- Carregue os tubos nos sistemas **cobas**® 4800.

Figura 20: DBS no tubo

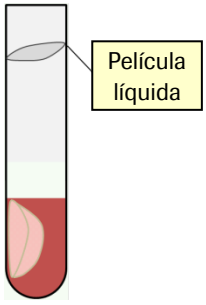
Válido

Figura 21: Localização da DBS



Válido | Válido | Potencial risco de coágulo

Figura 22: Película líquida



Potencial risco de detecção de nível prematura

Execução de um teste qualitativo cobas® HIV-1

Tipo de amostra e volume de processamento do teste qualitativo cobas® HIV-1

O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 suporta apenas um único tipo de amostra: DBS. O volume de processamento é como o seguinte:

Tipo de amostra suportado e volume de processamento

Tipo de amostra	Volume de processamento [µl]
DBS	400

Tamanho das corridas do teste qualitativo cobas® HIV-1

Os reagentes genéricos de preparação de amostras (**cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2, **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 e **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit) estão disponíveis em dois tamanhos de kit, cada um suficiente para 10 corridas de até 24 ou até 96 amostras, incluindo os controles e as amostras a executar. O **cobas**® HIV-1 está disponível em apenas um tamanho de kit, suficiente para testar até 120 (10 × 12) amostras, incluindo controles e amostras. Para cada bateria de testes, tem de ser usado um controle positivo baixo HBV/HCV/HIV-1 e um controle negativo (um controle positivo alto HBV/HCV/HIV-1 não é necessário para a DBS). Para uma única corrida de teste, o número máximo permitido de amostras é 94 amostras e 2 controles.

Nota: ***para uma utilização ideal dos reagentes, os reagentes genéricos de preparação de amostras podem ser usados em uma corrida contendo um total de 1 a 22 amostras (kit de 10 × 24 testes) ou um total de 1 a 94 amostras (kit de 10 × 96 testes). No entanto, não podem ser combinados tamanhos diferentes do cobas® 4800 System Wash Buffer Kit, cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 e cobas® 4800 System Lysis Kit 2. Por exemplo, se for registrado um frasco de reagente de tampão de lavagem para 96 testes no início da corrida, também devem ser usados reagentes para 96 testes dos outros kits de reagentes de preparação de amostras.***

Fluxos de trabalho para o teste qualitativo cobas® HIV-1

O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 é executado usando o fluxo de trabalho completo no software **cobas**® 4800. Ele consiste na preparação da amostra no instrumento **cobas**® x 480, seguida de amplificação/detecção no analisador **cobas**® z 480.

Para iniciar um teste qualitativo **cobas**® HIV-1, o tipo do teste HIV-1-qual-DBS tem de ser selecionado.

O teste qualitativo do HIV-1 pode ser executado sozinho como uma bateria individual ou em modo de bateria mista com testes que compartilham o mesmo processo de preparação automatizada de amostras e perfil de PCR para amplificação

e detecção. No passo de seleção de testes, o software apresentará testes compatíveis com o teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) para o modo de bateria mista.

As visões gerais dos fluxos de trabalho de testes qualitativos do HIV-1 podem ser encontradas do seguinte modo:

- A bateria individual de testes qualitativos do HIV-1 é exibida na Figura 23.
- A bateria mista de testes qualitativos do HIV-1 com teste quantitativo do HIV-1 é exibida na Figura 14.
- A visão geral de corridas de bateria mista, incluindo o teste qualitativo do HIV-1 com qualquer teste aplicável, está disponível na Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Figura 23: Visão geral da bateria individual do teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) – reagentes e fluxo de trabalho

Reagentes	
Preparação genérica de amostras • **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2 o **MGP 2** o **EB 2** • **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 o **P 2** o **LYS 2** • **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit o **WB** <u>Para gotas secas de sangue (DBS)</u>: • **cobas**® Specimen Pre-Extraction Reagent o **SPER** Amplificação/detecção • **cobas**® HIV-1 o **MMx R1** o **HIV-1 MMx R2** o **RNA QS** *Designado como IC* Controles • **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit o **L(+)C** *Designado como Controle Positivo* o **(–)C**	
Fluxo de trabalho	
1	Iniciar o sistema
2	Executar a manutenção do instrumento
3	Retirar amostras e reagentes da armazenagem
4	Iniciar corrida e selecionar HIV-1-qual-DBS
5	Carregar amostras
6	Criar pedido de trabalho: • Com LIS: confirmar pedido de trabalho • Sem LIS: criar pedido de trabalho
7	Carregar consumíveis
8	Carregar reagentes de preparação da amostra
9	Carregar controles e reagentes de AMP/DET • *O assistente do software avisa para carregar o QS, que é usado como o controle interno (IC).* • *O assistente do software também avisa para carregar os L(+)C e (–)C do kit de controles. O H(+)C não é necessário para o HIV-1-qual-DBS.*
10	Iniciar corrida de preparação da amostra

11	Descarregar placa de micro poços
12	Selar placa de micro poços
13	Carregar placa de micro poços selada no analisador
14	Retirar amostras, reagentes usados e placa de poços profundos
15	Revisar resultados • Opcional: se conectado a um LIS, enviar resultados para o LIS *Nos resultados, o QS é reportado como o IC e o L(+)C é reportado como o controle positivo.*
16	Descarregar analisador

O fluxo de trabalho da bateria individual do teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) é descrito na seção seguinte.

O fluxo de trabalho da bateria mista do teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) com o teste quantitativo do HIV-1 é descrito detalhadamente na seção Fluxo de trabalho de bateria mista – Testes quantitativo e qualitativo (HIV-1-qual-DBS) do HIV-1.

Para uma descrição completa do fluxo de trabalho da bateria individual do teste quantitativo do HIV-1, consulte a seção Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste quantitativo do HIV-1.

Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS)

1. Efetue a inicialização do sistema e os procedimentos de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
2. Efetue ações de manutenção, seguindo as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
3. Colete todos os reagentes e consumíveis necessários. Todos os reagentes, exceto os MMX R2 e MMX R1, devem estar à temperatura ambiente antes de serem carregados no instrumento **cobas**® x 480. Os reagentes MMX R2 e MMX R1 podem ser retirados diretamente da armazenagem entre os 2 e 8 °C, porque na altura que forem usados no processo a bordo do instrumento **cobas**® x 480 já estarão à temperatura ambiente.

Nota: ***todos os reagentes e reservatórios de reagentes têm códigos de barras e foram concebidos para serem usados uma única vez. O software cobas® 4800 detecta o uso dos reagentes e dos reservatórios de reagentes e rejeita os reagentes ou reservatórios de reagentes utilizados anteriormente.***

4. Inicie uma nova corrida e selecione o tipo de teste HIV-1-qual-DBS.
5. Carregue as amostras de DBS. Para detalhes dos tubos de amostra, consulte a seção de tubos de amostra suportados.

   As amostras de DBS podem ser carregadas apenas com o suporte de amostras de 32 posições.
6. Crie o pedido de trabalho. Existem três maneiras de criar um pedido de trabalho:

- Usando o editor de amostras antes de carregar a rack de amostras no instrumento **cobas**® x 480 (botão “Editor” à direita do menu principal). Os pedidos de trabalho podem ser salvos, editados e recarregados, se necessário. O tipo de amostra e o resultado desejado são definidos automaticamente como DBS e HIV-1-qual-DBS, respectivamente.
- Seguindo o assistente do software para a nova corrida e carregando as amostras no instrumento **cobas**® x 480 quando o sistema solicitar. Os códigos de barras das amostras são lidos automaticamente e o tipo de amostra e o resultado desejado são definidos automaticamente como DBS e HIV-1-qual-DBS, respectivamente.
- Usando o sistema LIS de sua instituição.

Para mais detalhes, consulte a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800. Carregue amostras e defina/selecione o pedido de trabalho ou use o LIS, conforme adequado.

7. Carregue os consumíveis conforme as instruções do assistente do software. Não coloque nem retire ponteiras individuais de uma rack de ponteiras parcialmente usada, uma vez que o software registra o número de ponteiras que sobra. Se não houver ponteiras suficientes para executar a corrida, o software alerta o usuário.
8. Carregue os reagentes de preparação da amostra nos reservatórios de reagentes com códigos de barras. Os reservatórios de reagentes estão disponíveis em dois tamanhos: 200 ml e 50 ml. Siga as indicações do assistente do software para selecionar o tamanho correto do reservatório de reagente. Os códigos de barras dos reservatórios de reagentes devem estar virados para a direita do suporte. Use o método "ler-ler-verter-colocar" para carregar os reagentes de preparação da amostra:
   - Faça a leitura do código de barras do frasco de reagente
   - Faça a leitura do código de barras do reservatório de reagente
   - Verta o reagente no reservatório (o frasco de MGP deve ser sujeito a agitação forte antes de ser dispensado)
   - Coloque o reservatório de reagente cheio no suporte de reagentes na posição indicada

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo que os reagentes estão a bordo do equipamento. Assim que a leitura do LYS 2 ou do WB for executada, tem 1 hora para concluir o processo de carregamento e clicar no botão "Start". Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia "Workplace". O sistema não permite o início da corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

Nota: ***para garantir uma transferência precisa de MGP, proceda à agitação forte do frasco de MGP <u>imediatamente antes</u> de dispensar o reagente no reservatório de reagente.***

9. Carregue os frascos de reagentes de amplificação/detecção [MMX R2, MMX R1 e RNA QS], os frascos de controle [L(+)C e (–) C] e os frascos de reagentes genéricos [P 2] diretamente no suporte de reagentes.

   O software solicita ao usuário para carregar QS. Este QS é usado como Controle Interno (IC) e é designado como IC nos resultados.

   O software também solicita ao usuário para carregar L(+)C. Este L(+)C é usado como controle positivo e é reportado como controle positivo nos resultados. O H(+)C não é necessário para o HIV-1-qual-DBS.

Nota: ***para evitar contaminação e corridas canceladas desnecessariamente, é necessário mover os frascos de reagente rapidamente para baixo para evitar a formação de bolhas/películas líquidas. Os controles deverão ser abertos começando pelos mais próximos do usuário (da posição 24 para a 1). Mude de luvas de laboratório após manusear controles positivos.***

10. Inicie a corrida de preparação da amostra.
11. Depois de uma corrida de preparação da amostra bem-sucedida, os botões "Sample Preparation results" e "Unload" ficam disponíveis. Se desejar, pressione o botão "Sample Preparation results" para revisar os resultados e depois selecione "Unload" para descarregar os suportes de placas. Alternativamente, selecione "Unload" para descarregar o suporte de placas sem revisar os resultados. Veja a Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
12. Depois de descarregar a placa de micro poços, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para selar e transferir a placa para o analisador **cobas**® z 480.

13. Carregue a placa de micro poços no analisador e inicie a corrida de amplificação e detecção conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.

Nota: ***o sistema cobas® 4800 dispõe de um relógio interno para monitorar o intervalo de tempo após a adição das amostras preparadas à mistura principal ativada. A amplificação e detecção deverão ser iniciadas o mais cedo possível, mas nunca após 40 minutos depois do final da corrida no instrumento cobas® x 480. Um temporizador de contagem decrescente é exibido na guia "Workplace". O sistema cancela a corrida, se tiver expirado o tempo a bordo do equipamento.***

14. Retire as amostras, os reagentes usados e a placa de poços profundos, conforme as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
15. Após concluída a corrida de amplificação e detecção, siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para revisar e aceitar resultados. Se estiver trabalhando com o LIS, envie os resultados para o LIS.
16. Siga as instruções da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800 para descarregar a placa de micro poços do analisador **cobas**® z 480.

Resultados do teste qualitativo cobas® HIV-1

O sistema **cobas**® 4800 detecta HIV-1 em amostras e controles e fornece um resultado qualitativo, exibindo um resultado de detectado ou não detectado para ácidos nucleicos totais do HIV-1.

O controle positivo baixo e o QS carregados durante o fluxo de trabalho do HIV-1-qual-DBS são usados e reportados como controle positivo e IC, respectivamente.

No caso de ser necessário identificar o número de lote do kit do controle positivo ou do IC, os números correspondentes podem ser encontrados nas etiquetas Controle positivo baixo e Padrão de quantificação de RNA, respectivamente.

Controle de qualidade e validade dos resultados do teste qualitativo cobas® HIV-1

- Um controle negativo [(–) C] e um controle positivo [HBV/HCV/HIV-1 L(+)C] são processados com cada bateria.
- Verifique a validade da bateria no software **cobas**® 4800 e/ou no relatório.
- A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software **cobas**® 4800, com base nas falhas dos controles negativo e positivo.

Interpretação dos resultados de controle do teste qualitativo cobas® HIV-1

Tabela 14: Interpretação dos resultados de controles negativo e positivo

Controle	Resultado	Interpretação
(–) C	Valid	O controle é válido. HIV-1 não detectado.
	Invalid	O controle negativo é inválido.
HBV/HCV/HIV-1 L(+)C reportado como controle positivo	Valid	O controle é válido.
	Invalid	O controle positivo é inválido.

Interpretação de resultados do teste qualitativo cobas® HIV-1

Nota: a validação de todos os ensaios e baterias é determinada pelo software cobas® 4800.

Nota: uma bateria válida pode incluir resultados de amostra válidos e inválidos.

Para uma bateria válida, os resultados de amostra são interpretados conforme exibido em Tabela 15.

Tabela 15: Resultados alvo para a interpretação de resultados individuais

HIV-1-qual-DBS	Relatório e interpretação de resultados
Detectado	HIV-1 detectado. Valor Ct
Não detectado	HIV-1 não detectado.
Inválido	O alvo é inválido, O alvo é inválido ou negativo e o IC é inválido ou negativo; ou Um controle externo é inválido

Nota: os valores de Ct da amostra, se disponíveis, são reportados no relatório do resultado e também são exportados para o LIS.

Lista de alarmes de resultados para o teste qualitativo cobas® HIV-1

A seguinte tabela exibe todos os alarmes que são relevantes para a interpretação de resultados.

Tabela 16: Lista de alarmes

Código do alarme	Descrição	Ação recomendada
R20	O controle positivo é inválido	Os valores do controle positivo são inválidos. 1. Repita a corrida com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R21	O controle negativo é inválido	Os valores do controle negativo são inválidos. Para evitar contaminação por arraste, use Boas Práticas de Laboratório. 1. Repita a corrida com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4807	O alvo da amostra é inválido	O alvo é inválido devido a falha de cálculo. 1. Execute a amostra novamente. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
R4808	O controle interno da amostra é inválido ou negativo e o alvo da amostra é inválido ou negativo	Os valores do controle interno, de um alvo da amostra inválido ou negativo, são inválidos. 1. Execute a amostra novamente com reagentes frescos. 2. Se o problema persistir, contate o serviço de assistência da Roche.
X3	Erro: foi detectado um coágulo. A amostra não foi processada.	Certifique-se de que as amostras foram manuseadas de acordo com a descrição do fluxo de trabalho. 1. Verifique se a amostra tem coágulos. 2. Execute a amostra novamente.

Código do alarme	Descrição	Ação recomendada
X4	Erro: ocorreu um erro de pipetagem. A amostra não foi processada.	Um volume de amostra insuficiente ou um erro mecânico durante a pipetagem é o motivo mais provável. 1. Certifique-se de que há volume de amostra suficiente. 2. Verifique se a placa de ejeção de ponteiras está colocada corretamente. 3. Execute a amostra novamente.

Nota: para todos os alarmes do sistema, consulte a Assistência ao usuário do sistema cobas® 4800.

Limitações processuais

1. O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, o **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2, o **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 e o **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit.
2. Resultados confiáveis dependem da coleta, do transporte, da armazenagem e do processamento adequados das amostras. Siga os procedimentos deste documento de instruções de utilização (também designado como folheto informativo) e da Assistência ao usuário do sistema **cobas**® 4800.
3. O teste qualitativo **cobas**® HIV-1 foi validado apenas para utilização com DBS. Testar outros tipos de amostra pode originar resultados imprecisos.
4. Embora raras, as mutações dentro das regiões altamente conservadas de um genoma viral abrangidas pelo **cobas**® HIV-1 podem afetar a ligação de primers e/ou sonda, resultando na não detecção da presença do vírus.
5. O valor preditivo de um ensaio depende da prevalência da doença em uma determinada população.
6. A adição de enzima AmpErase à mistura principal **cobas**® HIV-1 permite a amplificação seletiva do ácido nucleico alvo; no entanto, para evitar a contaminação dos reagentes e das misturas de amplificação, é necessário observar boas práticas de laboratório e cumprir cuidadosamente os procedimentos especificados neste documento de instruções de uso.
7. O uso deste produto deve estar limitado a pessoal treinado em técnicas de PCR e no uso do sistema **cobas**® 4800.
8. Apenas o instrumento **cobas**® x 480 e o analisador **cobas**® z 480 foram validados para uso com este produto. Nenhum outro equipamento de preparação da amostra ou sistema de PCR pode ser usado com este produto.
9. Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os usuários realizem estudos de correlação de métodos em seus laboratórios, para qualificar diferenças tecnológicas. Os usuários devem seguir suas próprias políticas/procedimentos específicos.
10. A contaminação cruzada pode causar resultados falsos-positivos. Um estudo não clínico determinou que a taxa de contaminação cruzada de amostra para amostra do **cobas**® HIV-1 foi de 0,0%, com uma faixa de confiança de 95% unilateral superior de 1,3% (Clopper Pearson). Não foi observada contaminação cruzada de corrida para corrida.

Avaliação não clínica do desempenho do teste qualitativo para o teste qualitativo cobas® HIV-1

Principais características do desempenho de amostras de DBS

Limite de detecção (LoD) usando DBS

O limite de detecção do **cobas**® HIV-1 foi determinado mediante a análise de diluições em série do padrão internacional da OMS para o RNA de HIV-1 relativo a ensaios com tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (3º padrão internacional da OMS) do grupo M, subtipo B, obtido a partir de NIBSC, em sangue total negativo para o HIV, aplicado em cartões de gotas secas de sangue. Usando 3 lotes de reagentes **cobas**® HIV-1, 2 tipos diferentes de cartões de DBS, em várias corridas, em vários dias e com diferentes operadores e instrumentos, foram testados painéis de 5 níveis de concentração e ainda um negativo.

Os resultados combinados para as gotas secas de sangue são exibidos na Tabela 17. O estudo demonstra que o **cobas**® HIV-1 detectou RNA do HIV-1 com uma taxa de positividade de ≥ 95%, conforme determinado por PROBIT, a uma concentração de 325,1 cp/ml (541,8 UI/ml) em gotas secas de sangue.

Tabela 17: Limite de detecção usando gotas secas de sangue

Concentração de título de entrada (RNA de HIV-1 cp/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade
969	63	63	100,0%
	63	63	100,0%
	62	62	100,0%
484,5	63	63	100,0%
	62	59	95,2%
	63	63	100,0%
323	63	61	96,8%
	63	61	96,8%
	63	59	93,7%
161,5	63	50	79,4%
	61	44	72,1%
	63	45	71,4%
80,75	63	28	44,4%
	63	32	50,8%
	63	26	41,3%
0	48	0	0,0%
	48	0	0,0%
	48	0	0,0%
LoD por PROBIT com taxa de positividade de 95%	325,1 cp/ml; faixa de confiança de 95%: 284,1–385,8 cp/ml 541,8 UI/ml; faixa de confiança de 95%: 473,5-643,0 UI/ml		

Repetibilidade usando DBS

A repetibilidade do **cobas**® HIV-1 foi determinada mediante a análise de diluições em série do Padrão Secundário do HIV-1 da Roche em sangue total negativo para o HIV aplicado em cartões de gotas secas de sangue. Foram testados 3 níveis de diluição em 2 réplicas dentro da corrida para cada nível, em 2 tipos de cartões de gotas secas de sangue e 2 lotes de reagentes **cobas**® HIV-1, usando 2 instrumentos e 2 operadores ao longo de 12 dias. Os resultados são exibidos na Tabela 18.

O **cobas**® HIV-1 demonstrou alta repetibilidade para 2 tipos de cartões de gotas secas de sangue e 2 lotes de reagentes testados em 3 níveis de concentração.

Tabela 18: Repetibilidade do cobas® HIV-1 usando DBS

Concentração	Lote	Réplicas reativas/válidas	Taxa de positividade [%]	Limite inferior da faixa de confiança de 95%	Limite superior da faixa de confiança de 95%
~3 × LoD	1	24/24	100,0%	85,8%	100,0%
	2	24/24	100,0%	85,8%	100,0%
~1 × LoD	1	21/24	87,5%	67,6%	97,3%
	2	21/24	87,5%	67,6%	97,3%
~0,6 × LoD	1	17/24	70,8%	48,9%	87,4%
	2	21/24	87,5%	67,6%	97,3%

Especificidade usando DBS

A especificidade do **cobas**® HIV-1 foi determinada mediante a análise de amostras de gotas secas de sangue negativas para o HIV de dadores individuais. Foi testado um total de 620 amostras individuais de DBS com 2 lotes de reagentes **cobas**® HIV-1 e 2 tipos de cartões de DBS. Todas as amostras testadas foram determinadas como não reativas para o RNA do HIV-1. Com base nestes resultados, a especificidade do **cobas**® HIV-1 usando DBS foi de 100,0% [o limite inferior de confiança de 95% unilateral (Clopper Pearson) era 99,5%].

Correlação usando DBS

O desempenho do **cobas**® HIV-1 foi comparado com o desempenho do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0, por análise de amostras clínicas precoces de DBS de crianças, em um laboratório externo. Foi obtida uma porcentagem total de concordância de 100% entre os dois testes para amostras de DBS positivas para o HIV-1 e negativas para o HIV-1, demonstrando que o desempenho do **cobas**® HIV-1 e o do teste qualitativo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 são equivalentes (Tabela 19).

Tabela 19: Resumo dos resultados da correlação de amostras de DBS para o HIV-1

Correlação **Amostras de DBS para HIV-1**		**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test, v2.0**	
		Reativo	Não reativo
cobas® HIV-1	Reativo	99	0
	Não reativo	0	129
Porcentagem total de concordância		100% (IC de 95%: 98–100%)	

Estes resultados em uma sensibilidade clínica de 100% (com uma faixa de confiança de 95% bilateral entre 96 e 100%) e especificidade de 100% (com uma faixa de confiança de 95% bilateral entre 97 e 100%).

Falha global do sistema usando DBS

A taxa de falha do sistema global do **cobas**® HIV-1 usando DBS foi determinada testando 100 réplicas de sangue total ao qual foi adicionado HIV-1 grupo M subtipo B. Estas amostras foram testadas a uma concentração alvo de aproximadamente 3 × o LoD.

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

Informações adicionais

Principais características do ensaio para amostras de plasma EDTA

Tipo de amostra	Plasma EDTA
Volume de processamento de amostras	400 µl ou 200 µl
Sensibilidade analítica	14,2 cp/ml (400 µl)
	43,9 cp/ml (200 µl)
Faixa linear	400 µl: 20,0 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml
	200 µl: 60,0 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml
Especificidade	100% (faixa de confiança unilateral de 95%: 99,5%)
Genótipos detectados	HIV-1M (A-D, F-H, CRF01_AE, CRF02_AG), HIV-1O, HIV-1N

Características principais do ensaio para amostras de gotas secas de plasma 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	400 µl
Sensibilidade analítica	598,6 cp/ml
Faixa linear	599 cp/ml - 1,0E+07 cp/ml

Principais características do ensaio para amostras de DBS

Tipo de amostra	Gotas secas de sangue
Quantidade de amostra mínima necessária	70 µl de sangue total
Volume de processamento de amostras	400 µl
Sensibilidade analítica	325,1 cp/ml
Especificidade	100% (faixa de confiança unilateral de 95%: 99,5%)

Guia rápido de fluxos de trabalho

	Bateria individual		**Bateria mista**
	Quantitativo do HIV-1 – Plasma – Plasma diluído – PSC	**Qualitativo do HIV-1** – DBS	**Quantitativo do HIV-1** **Qualitativo do HIV-1**
1	Iniciar o sistema		
2	Executar a manutenção do instrumento		
3	Retirar amostras e reagentes da armazenagem		
4	Iniciar corrida e selecionar tipo de teste:		
	HIV-1	**HIV-1-qual-DBS**	**HIV-1** **HIV-1-qual-DBS**
5	Efetuar a leitura dos cartões de parâmetros (AVC) – Coeficientes de calibração de MMx – Faixas de controle	Não são necessários cartões de parâmetros	Efetuar a leitura dos cartões de parâmetros (AVC) – Coeficientes de calibração de MMx – Faixas de controle
6	Carregar amostras		
7	Criar pedido de trabalho		
8	Carregar consumíveis		
9	Carregar reagentes de preparação da amostra		
10	Carregar controles e reagentes de AMP/DET:		
	– MMx1 e 2 + QS – L(+)C, H(+)C e (-)C – Reagentes genéricos	– MMx1 e 2 + QS – L(+)C e (-)C – Reagentes genéricos	– MMx1 e 2 + QS – L(+)C, H(+)C e (-)C – Reagentes genéricos
11	Iniciar corrida de preparação da amostra		
12	Descarregar placa de micro poços		
13	Selar placa de micro poços		
14	Carregar placa de micro poços selada no analisador		
15	Retirar amostras, reagentes usados e placa de poços profundos		
16	Revisar resultados		
17	Descarregar analisador		

Para o teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS), o QS é reportado como o IC, o L(+)C como o controle positivo (PC), e o H(+)C não é necessário.

- Detalhes sobre fluxos de trabalho no modo de bateria individual
  - Fluxo de trabalho de teste quantitativo do HIV-1 (veja a seção Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste quantitativo do HIV-1)
  - Fluxo de trabalho de teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS) (veja a seção Fluxo de trabalho de bateria individual – Teste qualitativo do HIV-1 (HIV-1-qual-DBS))
- Detalhes sobre fluxos de trabalho de bateria mista do HIV-1 (veja a seção Fluxo de trabalho de bateria mista – Teste quantitativo e teste qualitativo (HIV-1-qual-DBS) do HIV-1)

Símbolos

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

Tabela 20: Símbolos usados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

Age/DOB — Idade ou data de nascimento	Dispositivo não adequado para testes executados próximo dos pacientes	QS IU/PCR — UI QS por reação PCR, use as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
SW — Software auxiliar	Dispositivo não adequado para autotestes	
Assigned Range [copies/mL] — Faixa atribuída (cópias/ml)	Distribuidor *(Nota: o país/região aplicável poderá estar exibido abaixo do símbolo)*	SN — Número de série
Assigned Range [IU/mL] — Faixa atribuída (UI/ml)	Não reutilizar	Site — Local
EC REP — Representante autorizado na Comunidade Europeia	Mulher	Procedure Standard — Procedimento padrão
BARCODE — Código de barras da Ficha de dados	Apenas para avaliação do desempenho IVD	STERILE EO — Esterilizado com óxido de etileno
LOT — Número da bateria	GTIN — Global Trade Item Number	Guardar em lugar escuro
Riscos biológicos	Importador	Limite de temperatura
REF — Número de catálogo	IVD — Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*	TDF — Arquivo de definição de teste
CE — Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*	LLR — Limite inferior da faixa atribuída	Este lado para cima
	Homem	Procedure UltraSensitive — Procedimento ultrassensível
Collect Date — Data da coleta	Fabricante	UDI — Identificador Único de Dispositivo
Consulte as instruções de uso	CONTROL − — Controle negativo	ULR — Limite superior da faixa atribuída
Σ — Conteúdo suficiente para <*n*> testes	NON STERILE — Não esterilizado	Urine Fill Line — Linha de enchimento da urina
CONTENT — Conteúdo do kit	Nome do paciente	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 — Controle	Número do paciente	
Data do fabricação	Abrir aqui	Usar até
Dispositivo para testes executados próximo dos pacientes	CONTROL + — Controle positivo	
Dispositivo para autotestes	QS copies / PCR — Cópias QS por reação PCR, use as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.	

Suporte técnico

Para obter suporte técnico (assistência), contate sua filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante

Tabela 21: Fabricante

Fabricado nos Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Fabricado nos EUA

Marcas registradas e patentes

Veja https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents

Direitos autorais

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.

CE 0123 IVD

Referências

1. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. Ann Intern Med. 1997;126(12):946-954.
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(21):2349-2350.
3. Guidelines for the use of antiviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (DHHS);2015.
4. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. N Engl J Med. 2011;365(6):493-505.
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(6):843-850.
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(1):23-31.
7. European AIDS Clinical Society 2013 Guidelines. http://www.eacsociety.org/Guidelines.aspx.
8. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection – Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. June 2013.
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;312:410-425.
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-S89.
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(2):399-402.
12. Deeks SG. Durable HIV treatment benefit despite low-level viremia: reassessing definitions of success or failure. JAMA. 2011;286:224-226.
13. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection- Recommendations for a public health approach. World Health Organization HIV/AIDS Programme, Geneva. 2016.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125-128.
15. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. Nature. 1995;373:487-493.
16. 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;80:869-878.
17. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY). 1992;10:413-417.
18. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6:986-994.

19. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP06-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach. CLSI Document EP06-A:Wayne, PA; CLSI, 2003.

22. UNAIDS. Global AIDS Update. Geneva;2016.

Revisão do documento

Informações sobre a revisão do documento	
Doc Rev. 5.0 02/2024	Atualizadas as informações sobre perigos dos kits Lysis Kit 2. Seção **Marcas registradas e patentes** atualizada, incluindo o link. Marca **cobas**® atualizada. Em caso de dúvidas, contate seu representante local da Roche.