

| | |
|-------------|---|
| Nome | AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 |
|-------------|---|

| | |
|---------------------|--|
| Mandatário | Roche Diagnostics GmbH |
| Fabricante | Roche Molecular Systems, Inc. |
| Distribuidor | Roche Sistemas de Diagnóstico, Sociedade Unipessoal Lda. |

Aplicação Diagnóstica

É um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* destinado à quantificação do RNA do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) no plasma humano.

O teste destina-se a ser utilizado:

- em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais, como indicador prognóstico da doença.

- em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais indicadores da progressão da doença, com vista ao tratamento clínico de pacientes infectados pelo HIV-1.

- para avaliação do prognóstico de um paciente ao medir o valor inicial da concentração do RNA do HIV-1, ou para avaliação da resposta viral à terapêutica antiretroviral, determinada através de alterações dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 durante o tratamento antiretroviral.

Este teste não se destina a:

- ser utilizado como um teste de rastreio para o HIV-1.

- nem como um teste diagnóstico visando confirmar a presença de infecção a HIV-1.

Método

No plasma, o RNA do HIV pode ser quantificado através de tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, como é o caso da Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction).

O teste usa a tecnologia de PCR para atingir uma sensibilidade e intervalos dinâmicos máximos na detecção quantitativa do RNA do HIV-1 em plasma anti-coagulado com EDTA ou ACD.

| Especificações Técnicas | |
|---|---|
| Especificidade Analítica¹ | |
| Nenhum dos organismos ² que não o HIV, vírus ou ácidos nucleicos purificados que foram testados, se mostraram reactivos no teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5., ao usar o método Standard. | |
| Especificidade Clínica | |
| <i>Método Standard</i> | |
| Determinada por análise de 268 dadores de sangue negativos para o anti-HIV-1. | Nenhuma destas amostras se mostrou reactiva com o teste. Assumindo uma prevalência zero da infecção a HIV-1 nos dados de sangue seronegativos, a especificidade do teste foi de 100%. |
| <i>Método Ultra-Sensível</i> | |
| Determinada por análise de 206 dadores de sangue negativos para o anti-HIV-1. | Uma das amostras mostrou-se reactiva, não se dispunha de amostras adicionais para testar de novo e como o estudo era |

¹ Avaliada adicionando células em cultura, vírus em cultura ou ácidos nucleicos purificados, provenientes dos microrganismos e vírus que a seguir se enumeram, a plasma humano negativo para o HIV e analisando subsequentemente estas amostras.

² Ver instruções de uso.

| | |
|---|--|
| | independentes, não existiam informações sobre o dados. Assumindo uma prevalência zero da infecção a HIV-1 nos dados de sangue seronegativos, a especificidade do teste foi de 99.5%. |
| Inclusividade (desempenho em subtipos do grupo M³ do HIV-1) | |
| <u>Análise de Padrões de Cultura Viral</u> | |
| Análise de 30 isolados (cultivados <i>in vitro</i>) em cultura de HIV-1 bem caracterizados, representando os subtipos A a G. Testes efectuados na Roche Diagnostic Systems e em 2 laboratórios hospitalares europeus. | Concentrações esperadas de RNA do HIV: <i>Método Standard</i> 40 000 cópias/ml <i>Método Ultra-Sensível</i> 250 cópias/ml |
| O teste apresentou resultados em todos os 30 isolados, que revelam uma boa concordância entre si e com as contagens de partículas virais. | |
| <i>Método Standard</i> Resultado médio para a totalidade dos 30 isolados foi de 64 000 cópias de RNA do HIV/ml. | |
| <i>Método Ultra-Sensível</i> Resultado médio para a totalidade dos 30 isolados foi de 157 cópias de RNA do HIV/ml. | |
| Não se testaram os isolados do grupo O. Desconhece-se o desempenho do teste em isolados do grupo O. | |
| <u>Análise de Amostras de Pacientes</u> | |
| Análise de amostras de plasma de 96 pacientes infectados com vários subtipos de HIV-1. | O teste detectou RNA do HIV-1 em 98.9% das amostras (95/96) |
| Precisão | |
| Precisão Intra-Execução e Total – avaliadas em conformidade com os métodos definidos que permitem a sua determinação através do desempenho de um estudo de vários dias e operadores. Usado 1 lote do teste, 12 testes realizados diariamente durante 10 dias por cada um dos dois operadores. Cada execução inclui 3 réplicas de cada uma das 3 amostras (vírus HIV-1 | |

³ Os isolados de HIV-1 colhidos no mundo inteiro apresentam uma diversidade genética considerável e podem ser classificados em grupos filogeneticamente relacionados com base na sequência de nucleótidos. O grupo M (Major) inclui a grande maioria dos isolados de HIV-1, e pode ser dividido pelo menos em 9 subtipos designados de A a I.

| | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|
| cultivados e diluídos em plasma humano normal desfibrinado, o qual tinha demonstrado por PCR estar isento de RNA do HIV-1). | | | |
| <u>Método Standard</u> | | | |
| Amostra | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| Replicações | 58 | 59 | 59 |
| Nº médio de cópias de HIV do RNA/ml | 2.187 | 21.445 | 166.436 |
| Intra-execução | | | |
| Desvio padrão | 535 | 6.071 | 59.307 |
| CV (%) | 24 | 28 | 38 |
| Total | | | |
| Desvio padrão | 640 | 6.731 | 68.555 |
| CV (%) | 29 | 31 | 41 |
| Usado 1 lote do teste, 2 execuções constituídas por 6 testes durante 13 dias. Cada execução inclui 2 réplicas de cada uma das 3 amostras (vírus HIV-1 cultivados e diluídos em plasma humano normal desfibrinado, o qual tinha demonstrado por PCR estar isento de RNA do HIV-1). | | | |
| <u>Método Ultra-Sensível</u> | | | |
| Amostra | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| Replicações | 52 | 52 | 52 |
| Nº médio de cópias de HIV do RNA/ml | 232 | 2.955 | 20.391 |
| Intra-execução | | | |
| Desvio padrão | 64 | 805 | 7.568 |
| CV (%) | 28 | 27 | 37 |
| Total | | | |
| Desvio padrão | 73 | 795 | 8.364 |
| CV (%) | 31 | 27 | 41 |

Limites de Quantificação

e Intervalo Linear

Método Standard de preparação da amostra:

O limite inferior de quantificação e o intervalo linear do teste foram determinados por análise de diluições sucessivas de um lote bem caracterizado de vírus HIV-1 cultivados em plasma

humano negativo para o HIV⁴. Estudos demonstraram que o teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5, é passível de quantificar o RNA do HIV-1 associado ao virião n plasma, em concentrações tão baixas como 400 cópias de RNA/ml de plasma, desde que a DO da microplaca seleccionada esteja dentro dos limites especificados para a DO (0.20 a 2.0).

O teste faculta uma resposta linear desde 400 até pelo menos 750 000 cópias de RNA do HIV-1/ml. Amostras com resultados superiores a 750 000 cópias de RNA do HIV-1/ml devem ser diluídas com plasma humano negativo para o HIV e novamente testadas.

Método Ultra-sensível de preparação da amostra:

O limite inferior de quantificação e o intervalo linear do teste foram determinados da mesma forma, anteriormente descrita. Estudos demonstraram que o teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5, é passível de quantificar o RNA do HIV-1 associado ao virião n plasma, em concentrações tão baixas como 50 cópias de RNA/ml de plasma, desde que a DO da microplaca

seleccionada esteja dentro dos limites especificados para a DO (0.20 a 2.0).

O teste faculta uma resposta linear desde 50 até pelo menos 100 000 cópias de RNA do HIV-1/ml. Amostras com resultados superiores a 100 000 cópias de RNA do HIV-1/ml devem ser diluídas com plasma humano negativo para o HIV e novamente testadas, através do Método Standard.

Interferentes/ Limites

A detecção do RNA do HIV-1 depende do número de partículas virais presentes na amostra e pode ser afectada pelo métodos de colheita da amostra e por factores inerentes ao próprio paciente (por ex., a idade, a presença de sintomas e/ou o estadio da infecção).

Embora raras, as mutações dentro da região altamente conservada do genoma viral coberta pelos iniciadores e/ou sonda do teste, podem resultar na sub-quantificação ou na não detecção do vírus. Recomenda-se que o utilizador restabeleça o nível da carga viral da linha de base para os subtipos não B.

Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para quantificar as diferenças tecnológicas.

Este teste foi validado para utilização exclusiva com plasma humano colhido apenas com os anticoagulantes EDTA ou ACD (tubos esterilizados).

O teste de outros tipos de amostra pode dar origem a resultados falsos negativos ou falsos positivos.

⁴ Estirpe fornecida pelo Laboratório de Garantia de Qualidade em Virologia (VQA – Virology Quality Assurance Laboratory) do Grupo de Ensaios Clínicos da SIDA (ACTG – AIDS Clinical Trials Group), Division of AIDS, National Institutes of Health, Bethesda, MD, E.U.A.

A concentração do RNA viral no lote de vírus foi calculada por microscopia electrónica, concentração de antígeno p24, teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5 (preparação e análise das amostras, com este teste, foi efectuada na Roche Diagnostic Systems) e análise de DNA de cadeia ramificada. Todos os métodos proporcionaram resultados comparáveis.

Amostras anti-coaguladas com heparina são inadequadas para este teste. A heparina mostrou inibir a PCR, pelo que não deve ser usada neste procedimento.

Níveis elevados de lípidos, de bilirrubina e de hemoglobina nas amostras mostraram não interferir com a quantificação do RNA do HIV-1 neste teste.

A obtenção de resultados fiáveis depende da colheita adequada da amostra e dos procedimentos de transporte, armazenamento e processamento.

Armazene o sangue total entre 2 e 25° C durante um período não superior a 6 horas.

O uso de amostras anticoaguladas com ACD produzirá resultados de teste que são aproximadamente 15% inferiores aos resultados do teste obtidos com amostras anticoaguladas com EDTA, em virtude do efeito de diluição dos 1,5 ml de anticoagulante ACD presentes no tubo de colheita do sangue.

Separe o plasma do sangue total menos de 6 horas depois da colheita.

O sangue total deve ser transportado entre 2° e 25°C, devendo ser processado nas 6 horas subsequentes à colheita. O plasma pode ser transportado entre 2° e 8°C.

As amostras de plasma podem ser armazenadas entre 2° e 8°C durante um máximo de 5 dias, ou congeladas a - 70°C.

Estudos efectuados pelo fabricante revelaram que as amostras de plasma podem ser congeladas e descongeladas até 3 vezes no máximo.

Não congele os reagentes.

Em virtude da elevada sensibilidade analítica deste teste, deverá ser tomada extrema precaução para preservar a pureza dos reagentes ou das misturas de amplificação.

A presença da enzima AmpErase na Mistura Principal do teste reduz o risco de contaminação do amplicon. A contaminação proveniente dos controlos positivos do HIV e de amostras clínicas positivas para HIV só pode ser evitada através do cumprimento de boas práticas laboratoriais e de um cuidadoso cumprimento dos procedimentos.

O teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5 foi otimizado para o grupo M do HIV-1, subtipos A-H. O seu desempenho com o grupo O do HIV-1 e com o HIV-2 é desconhecido. Este teste não deverá ser usado para o controlo clínico de doentes infectados com o grupo O do HIV-1 ou com o HIV-2.

Apenas podem ser usados os termocicladores Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600, GeneAmp PCR System 2400 ou GeneAmp PCR System 9700.

A decisão sobre quando utilizar o método Standard ou Ultra-Sensível de preparação da amostra dependerá da população específica de pacientes do laboratório. Recomenda-se que cada laboratório avalie as características da população de pacientes para estabelecer a melhor prática de laboratório para o teste inicial e quando passar para o método de processamento alternativo da amostra.

Ex.:

- Se a população de pacientes não incluir pacientes sem tratamento prévio ou caso se tenha conhecimento de que todos os pacientes se encontram sujeitos a terapia anti-retroviral, o laboratório pode optar por utilizar o método Ultra-Sensível de preparação da amostra como método de rotinas e passar ao método Standard

apenas quando os resultados da carga viral forem superiores a 100 000 cópias/ml.

- Se a população de pacientes for desconhecida no que se refere a terapia ou resultados base de carga viral, o laboratório pode optar por utilizar o método Standard de preparação da amostra produzir uma carga viral inferior a 400 cópias/ml.

As combinações de fármacos que a seguir se enumeram não interferem com a quantificação do RNA do HIV-1 com o teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5: indinavir; ritonavir; nelfinavir; saquinavir (inibidores da protease do HIV); zidovudina; didanosina; zalcitabina; stavudina; lamivudina (inibidores nucleósidos da transcriptase reversa do HIV); HBY 097; nevirapina; delavirdina (inibidores não nucleósidos da transcriptase reversa); ganciclovir e valinato de ganciclovir.

Observações

A utilização deste produto deverá ser restringida a pessoal treinado nas técnicas de PCR.

O teste AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v1.5, pode ser concluído num dia ou no decurso de dois dias (usando diferentes procedimentos).

Este teste baseia-se em 5 processos principais:

- preparação da amostra
- transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA)
- amplificação por PCR do cDNA alvo, usando iniciadores específicos complementares para o HIV-1

- hibridação dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do(s) alvo(s)
- detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda por determinação colorimétrica

A quantificação do RNA viral do HIV-1 é efectuada utilizando o Padrão de Quantificação do HIV-1.

O Padrão de Quantificação do HIV-1 é uma cópia transcrita de RNA não infecciosa que contém locais de ligação ao iniciador idênticos aos do RNA do HIV-1 alvo e uma região única de ligação que permite que o amplicon do Padrão de Quantificação se distinga do amplicon do HIV-1. O teste permite uma transcrição reversa e amplificação por PCR simultânea do HIV-1 e do Padrão de Quantificação do HIV-1.

Os níveis de RNA do HIV-1 presentes nas amostras de teste são determinados comparando o sinal do HIV-1 com o sinal do Padrão de Quantificação em cada amostra.

O Padrão de Quantificação compensa os efeitos de inibição e controla o processo de amplificação visando permitir uma quantificação rigorosa do RNA do HIV-1 presente em cada amostra.

O fluxo de trabalho no laboratório tem de ser unidireccional, iniciando-se na Área de Pré-amplificação e passando para a Área de Pós-amplificação (amplificação/detecção). Os materiais e equipamentos devem ser exclusivos de cada actividade e não devem ser transportados.

As amostras deverão ser manipuladas como se estivessem infectadas, utilizando procedimentos de laboratório seguros.

Nenhum método conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitiram agentes infecciosos. Por conseguinte, todo o material de origem humana deverá ser considerado como potencialmente infeccioso.

A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar soluções com azida sódica pela canalização do laboratório, lavar abundantemente os canos com água, de modo a evitar a acumulação de azidas.

Devem ser usados tubos com tampa de enroscar para preparação da amostra e do controlo, com o objectivo de prevenir derramamento e contaminação cruzada potencial das amostras.

Resultados:

- Superiores a 750000, estão acima do limite superior de quantificação do Teste Standard e deverão ser referidos como "Superior a 750000 cópias/ml".

Caso se desejem resultados quantitativos para estas amostras, a amostra de plasma original deverá ser diluída com plasma humano negativo para o HIV e testada novamente.

- Inferiores a 400, são inferiores ao limite mais baixo de quantificação do teste e deverão ser referidos como "RNA do HIV-1 detectado, inferior a 400 cópias/ml".

Caso se desejem resultados quantitativos para estas amostras, a amostra de plasma original deverá ser testada de novo utilizando o método Ultra-Sensível de preparação da amostra.

- Superiores a 100000, estão acima do limite superior de quantificação do Teste Ultra-Sensível e deverão ser referidos como "Superior a 100000 cópias/ml".

Caso se desejem resultados quantitativos para estas amostras, a amostra de plasma original deverá ser testada de novo utilizando o método Standard de preparação da amostra.

- Abaixo de 50, são inferiores ao limite mais baixo de quantificação do Teste Ultra-Sensível e deverão ser referidos como "RNA do HIV-1 detectado, menos de 50 cópias/ml".

Interpretação de testes com valores DO fora dos limites ou fora de sequência:

- Valores DO do HIV-1 < 0.20

Referir como "RNA do HIV-1 não detectado, menos de 400 cópias/ml". (Método Standard) ou "RNA do HIV-1 não detectado, menos de 50 cópias/ml" (Método Ultra-Sensível).

- Valores DO do HIV-1 > 0.20

Número de cópias de HIV-1 é superior ao intervalo linear do ensaio. Referir como "não determinado".

- Valores DO do HIV-1 fora da sequência.

Erro de diluição. Resultado inválido.

- Valores DO do Padrão de Quantificação < 0.30

A amostra processada inibiu a amplificação ou o RNA não foi recuperado durante o processamento da amostra.

- Valores DO do Padrão de Quantificação > 2.0

Ocorreu erro. Resultado inválido.

- Valores DO do Padrão de Quantificação fora de sequência

Ocorreu erro. Resultado inválido.

Controlo de Qualidade:

Deve ser incluída em casa execução do teste pelo menos uma réplica de Controlo (-) AMPLICOR HIV-1 MONITOR (deverá facultar valores de DO <0.20, caso contrário toda a execução é inválida) e de Controlo (+) AMPLICOR HIV-1 MONITOR (os intervalos atribuídos aos controlos baixos e altos são específicos para cada lote de controlo).

Operadores com pouca experiência devem considerar o uso de controlos adicionais.