

Nome	COBAS AMPLICOR HIV1 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 I (HIV-1), no plasma humano, no analisador COBAS AMPLICOR.

Este teste permite determinar a RNA do HIV-1 numa concentração de 50 a 750 000 cópias/ml, através de dois métodos de preparação de amostras, o método Standard e o método Ultra-Sensível (decisão sobre o método de preparação da amostra dependerá da população específica de pacientes do laboratório)¹.

O teste destina-se também a ser utilizado 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.

¹ Se a população do paciente não incluir pacientes sujeitos a tratamento simples 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 das amostras, como método de rotina e passar ao método Standard, apenas quando os resultados da carga viral sejam superiores a 100000 cópias/ml.

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

Pode ser utilizado 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.

O teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v 1.5, não se destina a ser utilizado como um teste de rastreio para a presença do HIV-1, nem como um teste diagnóstico visando confirmar a presença de infecção a HIV-1.

Método

Teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*

Avaliação do Desempenho Não-Clínico		
Limite de Detecção * com taxa positiva superior a 95%	Preparação Standard da amostra	400 cópias de RNA/ml [Concentração no Plasma]
	Preparação Ultra-Sensível da amostra	50 cópias de RNA/ml [Concentração no Plasma]

* determinados por análise de diluições sucessivas de um lote bem caracterizado de vírus HIV-1 cultivado em plasma humano negativo para o HIV.

O painel de diluição em série foi analisado diariamente durante 12 dias utilizando os 2 métodos de preparação da amostra com 2 lotes do teste.

Inclusividade - 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 (de Major) inclui a grande maioria dos

isolados de HIV-1, o Grupo O (de Outliers) representa um pequeno número e isolados, oriundos principalmente dos Camarões e do Gabão. O Grupo M pode ser subdividido em pelo menos 9 subtipos, designados de A a I.

O desempenho do teste em subtipos do Grupo M do HIV-1 foi avaliado por análise de 30 isolados em cultura de HIV-1 bem caracterizados, representando os subtipos A a G. Cada isolado foi cultivado *in vitro*. Cada lote de vírus foi diluído em plasma humano negativo até uma concentração de aproximadamente 12500 e 1250 partículas de vírus por ml. Cada partícula viral contém 2 genomas virais; por conseguinte, a concentração esperada de RNA do HIV era de aproximadamente 25000 cópias/ml e 2500 cópias/ml.

O teste apresentou resultados em todos os 30 isolados, os números de cópias para todos os subtipos testados revelaram uma boa concordância entre si e com as contagens de partículas virais.

Não se testaram os isolados do Grupo O. Desconhece-se o desempenho do teste em isolados do Grupo O.

Especificações Técnicas		
Especificidade Clínica		
Preparação Standard da amostra	507 amostras [267 com EDTA] [240 com ACD]	100%
Preparação Ultra-Sensível da amostra	504 amostras [307 com EDTA] [197 com ACD]	99.8%
Especificidade Analítica		
Avaliada adicionando células em cultura, vírus em cultura ou ácidos nucleicos purificados, provenientes de microrganismos e vírus, a plasma humano negativo para o HIV. Nenhum dos organismos que não o HIV, vírus ou ácidos nucleicos purificados que foram testados, se mostraram reactivos ao RNA do HIV-1		

Interferentes/ Limites

Limitações do procedimento:

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 COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, 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 destina-se a ser utilizado apenas com plasma humano colhido com os anticoagulantes EDTA ou ACD. A heparina mostrou inibir a PCR, pelo que não deve ser usada com este procedimento. O sangue total deve ser armazenado entre 2 e 25°C durante um período não superior a 6 horas, separação do soro/plasma deve ser feito nesse período, por centrifugação.

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

Armazenamento das amostras de plasma:

- temperatura ambiente – 1 dia

- 2 e 8°C – 5 dias (máx.)

- congelada (-20°C e -80°C)

As amostras de plasma podem ser congeladas e descongeladas até 3 vezes no máximo.

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 todo de colheita do sangue.

Evite a contaminação microbiana e por ribonuclease dos reagentes quando remover as alíquotas dos fracos de reagentes.

Não misture reagentes de lotes diferentes nem de frascos diferentes do mesmo lote.

Não congele os reagentes.

O fluxo do trabalho efectuado no laboratório deve prosseguir de uma forma unidireccional, começando na Área de Pré-amplificação e passando para a Área de Pós-amplificação (Amplificação/Deteção).

Na preparação da amostra e do controlo devem ser usados tubos com tampa de enroscar para evitar derramamentos e contaminação cruzada potencial das amostras e dos controlos.

Na preparação (amostras/controlos) o etanol residual pode inibir a amplificação.

Em virtude da elevada sensibilidade analítica deste teste, deverá ser tomada extrema precaução para preservar a pureza dos reagentes do dispositivo ou das misturas de amplificação. Todos os reagentes deverão ser submetidos a monitorização rigorosa relativamente à sua pureza.

O teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v 1.5, foi optimizado para o Grupo M do HIV-1. O desempenho do teste 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.

Observações

As determinações quantitativas de viremia por HIV no sangue periférico mostraram que níveis de vírus elevados se podem correlacionar com um aumento do risco de progressão clínica da doença por HIV, e que reduções dos níveis plasmáticos de vírus se podem associar a uma diminuição do risco de progressão clínica. Os níveis de vírus no sangue periférico podem ser quantificados através da determinação do antigénio p24 do HIV no soro, por cultura quantitativa do HIV plasmático ou por determinação directa do RNA viral no plasma, utilizando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos ou de amplificação de sinal.

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 COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v 1.5, usa a tecnologia de PCR para atingir uma sensibilidade e limites dinâmicos máximos na detecção quantitativa de RNA do HIV-1 em plasma anti-coagulado com EDTA ou ACD.

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.

O analisador COBAS AMPLICOR calcula os níveis de RNA do HIV-1 presentes nas amostras de teste comparando o sinal do HIV-1 com o sinal do Padrão de Quantificação em cada amostra.

As amostras devem 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 transmitirão agentes infecciosos. Por

consequente, todo o material de origem humana deverá ser considerado como potencialmente infeccioso.

Alguns dos reagentes contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com as tubagens de chumbo e cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Quando descartar soluções contendo azida sódica nos lavatórios laboratoriais, lave os canos com um grande volume de água para impedir a formação de azidas.

Os Reagentes de Preparação e de Amplificação da Amostra são embalados em frascos de 12 testes de uso único. Para um uso mais eficaz dos reagentes, as amostras e os controlos deverão ser processados em lotes múltiplos de 12.

O teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v 1.5 pode ser concluído num dia ou no decurso de dois dias (segundo diferentes instruções).

O analisador COBAS AMPLICOR foi programado para sinalizar erros e as inconsistências de resultados mais comuns. No entanto, como parte integrante do processo de laboratório de rotina para avaliação de dados, recomenda-se que as leituras dos valores de A_{660} sejam revistas a fim de garantir a integridade máxima dos resultados.

Controlo de Qualidade

Deverão ser incluídas pelos menos uma replicação de Controlo (-) AMPLICOR HIV-1 MONITOR e uma replicação de Controlo Baixo e Controlo Alto AMPLICOR HIV-1 MONITOR, em cada execução do teste.

O Controlo (-) do HIV-1 deve produzir um resultado de “RNA do HIV-1 não detectado”.

O limite atribuído ao Controlo Baixo e Controlo Alto AMPLICOR HIV-1 MONITOR, é específico para cada lote de controlo, baseado no método de preparação da amostra utilizado e é fornecido no *Cartão de dados* do Teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v 1.5, distribuído com o dispositivo.

Se um ou ambos os controlos não satisfizerem os critérios, toda a execução será considerada inválida.

Este produto pode ser utilizado apenas com o Analisador COBAS AMPLICOR.