

Nome	COBAS AmpliPrep/COBAS 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, através do instrumento COBAS AmpliPrep para processamento das amostras e do analisador COBAS AMPLICOR para amplificação e detecção.

Este teste permite determinar quantitativamente o RNA do HIV-1 numa concentração de 50 a 1000000 cópias/ml, através da utilização de dois métodos de preparação da amostra, o método Standard e Ultra-Sensível.

Este 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.

O teste 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 AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5, não se destina a ser utilizado com o um teste de rastreio do sangue ou de produtos derivados do sangue para a presença do HIV-1, nem como 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 COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5, usa a tecnologia de PCR para atingir uma sensibilidade e limites dinâmicos máximos na detecção quantitativa do RNA do HIV-em plasma anti-coagulado com EDTA.

Especificações Técnicas

Especificidade Analítica

Foi avaliada adicionando células em cultura, vírus em cultura, ou ácidos nucleicos purificados, provenientes dos organismos e vírus enumerados¹, a plasma negativo humano para HIV-1. Os resultados indicam que o teste não apresentou uma reacção cruzada com uma variedade de vírus e bactérias que poderiam estar presentes em amostras e que estes microrganismos não interferem com a amplificação do Padrão de Quantificação do HIV-1.

¹ Ver instruções de uso.

Especificidade Clínica			
Foi determinada através da avaliação de 504 amostras (Método Ultra-Sensível) e 546 (Método Standard) de HIV 1 / 2 seronegativo, com plasma anti-coagulado com EDTA. Nenhuma das amostras testadas proporcionou resultados positivos para o RNA do HIV-1.			
Limite de Detecção, reprodutibilidade e o intervalo linear do teste COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR v. 1.5 foram determinados por análise de diluições de vírus HIV-1 (subtipo B, grupo M) cultivado em plasma humano negativo para anticorpos do HIV-1/2 e RNA do HIV-1. Um painel de diluição composto por 20 membros foi preparado a partir do lote de vírus cultivado para o estudo de intervalo linear . <i>Método Ultra-Sensível</i> [RNA VIRAL] testado = 35 a 125 000 cópias/ml <i>Método Standard</i> [RNA VIRAL] testado = 400 a 1 200 000 cópias/ml Sete membros do painel foram utilizados para o estudo de reprodutibilidade .			
Limite de Detecção			
Painel de detecção de limite inferior composto por 6 membros foi preparado diluindo as 150 cópias/ml (Método Ultra-Sensível) e 1500 cópias/ml (Método Standard) dos membros do painel descritos em plasma negativo humano do HIV-1 anti-coagulado com EDTA. Pelo menos 80 resultados válidos foram gerados para cada concentração do vírus. O teste pode detectar RNA do HIV-1 associado a virion em plasma em concentrações tão baixas como 50 cópias de RNA do HIV-1/ml (Método Ultra-Sensível) e 400 cópias de RNA do HIV-1/ml (Método Standard) com uma taxa de positividade superior a 95%.			
<i>Método Ultra-Sensível</i>		<i>Método Standard</i>	
Taxa de Positividade	Cópias de RNA do HIV-1/ml	Taxa de Positividade	Cópias de RNA do HIV-1/ml
100%	70	100%	400

Reprodutibilidade			
Estudo para avaliar a reprodutibilidade dos métodos, avaliação dos métodos manuais correspondentes de preparação de amostras. Reprodutibilidade foi avaliada em três lotes de reagentes em 2 locais (local dentro da Roche Molecular Systems, Inc. e local exterior), com 2 operadores. Cada operador realizou uma execução do teste por dia (5 dias) em cada um dos 3 lotes de reagente. Foram avaliados 4 instrumentos. Cada membro do painel composto por 7 membros que tinha sido preparada em plasma de EDTA, foi testado em triplicado para avaliar a variabilidade de intra-execução			
<i>Método Ultra-Sensível</i> de Preparação de Amostras		<i>Método Standard</i> de Preparação de Amostras	
200 Cópias/ml ≤ [RNA do HIV-1] ≤ 50 000 Cópias/ml		1500 Cópias/ml ≤ [RNA do HIV-1] ≤ 680 000 Cópias/ml	
Percentagem atribuível de variabilidade			
[RNA do HIV-1] cópias/ml	Intra-execuções	[RNA do HIV-1] cópias/ml	Intra-execuções
200	72%	1 500	80%
500	67%	2 480	68%
1 500	63%	10 000	62%
4 280	48%	50 000	57%
10 000	55%	125 000	79%
50 000	57%	680 000	65%
Variabilidade Total = 100%		Variabilidade Total = 100%	
Intervalo Linear			
Determinado através da avaliação de um painel composto por 20 membros.			
<i>Método Ultra-Sensível</i>		Usados membros do painel com concentrações virais de RNA entre 35 e 125 000 cópias/ml Teste facultativa resposta linear desde 50 até pelo menos 100 000 cópias de RNA do HIV-1/ml	
<i>Método Standard</i>		Usados membros do painel com concentrações virais de RNA entre 400 e	

	1 200 000 cópias/ml
	Teste facultativo resposta linear desde 400 até pelo menos 1 000 000 cópias de RNA do HIV-1/ml
Inclusividade² (desempenho em Subtipos do Grupo M)	
O desempenho foi avaliado por análise de 31 isolados em culturas de HIV-1 bem caracterizados. Cada isolado foi cultivado <i>in vivo</i> . As concentrações dos lotes de vírus foram calculadas por contagem de partículas em microscopia electrónica. Cada lote de vírus foi diluído em plasma humano negativo até uma concentração de: <ul style="list-style-type: none"> - 5000, 50 000 e 500 000 cópias/ml para Método Standard - 1000, 5000 e 50 000 cópias/ml para o Método Ultra-Sensível 	
O teste apresentou resultados comparáveis em todos os 31 isolados, os números de cópias para todos os subtipos testados revelaram uma boa concordância entre si, e com as contagens esperadas de partículas virais. Resultados comparáveis foram encontrados entre os métodos Standard e Ultra-Sensível de preparação de amostras.	
Um único isolado do Grupo O foi testado e não foi detectado, desconhece-se o desempenho do teste em isolados do Grupo O.	

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

² 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.

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 destina-se a ser usado com plasma humano colhido apenas com o anticoagulante EDTA³. A utilização de outro tipo de amostras pode dar origem a resultados falsos negativos ou falsos positivos.

Níveis elevados de albumina (≥ 6 gm/dl) podem resultar no processamento incompleto da amostra devido a uma concentração reduzida de esférulas e/ou a um volume reduzido de amostra no tubo de saída.

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

As combinações de fármacos testados ao Nível Máximo de Plasma (C_{max}) e a 3 vezes

³ Armazenar o sangue total entre 2° e 25° C durante um período não superior a 6 horas. Separe o plasma do sangue total durante as 6 horas subsequentes à colheita, por centrifugação a 800-1600 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente. Transfira o plasma para um tubo de propileno esterilizado.

O plasma pode ser transportado entre 2° e 8° C ou congelado a - 80° C.

o C_{max} têm mostrado não interferir com a quantificação do RNA do HIV-1 com o teste COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5:

Sulfato de abacavir; Acyclovir; Amprenavir; Didanosina, ddl; Efavirenz; Galnciclovir; Sulfato de indinavir; interferon alfa-2a; interferon alfa-2b; Lamivudina, 3TC; Lopinavir/Ritonavir; Nelfinavir mesilato; Nevirapina; Ritonavir; Saquinavir; Stavudina, d4T; Tenofovir DF; Valacyclovir HCl; Valganciclovir HCl; Zalcitabina, ddC e Zidovudina.

O Teste COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5 foi otimizado para o Grupo M do HIV-1, subtipos A-H. 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.

As amostras de plasma podem ser armazenadas à temperatura ambiente durante 1 dia, entre 2° e 8° C durante um máximo de 5 dias, ou congeladas a - 80°C.

As amostras de plasma podem ser congeladas e descongeladas até um número máximo de 3 vezes sem perda de RNA do HIV-1.

A heparina mostrou inibir a PCR, pelo que não deve ser usada com este procedimento.

A presença de AmpErase na Mistura Principal do AMPLICOR HIV-1 MONITOR, v.1.5, reduz o risco de contaminação do amplicon. A contaminação proveniente dos controlos positivos e de amostras clínicas positivas, só pode ser evitada através do cumprimento de boas práticas laboratoriais e de um cuidadoso cumprimento dos

procedimentos especificados no Manual de Procedimento.

Evitar contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes quando remover as alíquotas dos fracos dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pipetas e pontas de pipeta com barreira para aerossóis, isentas de RNase, esterilizadas e descartáveis.

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.

Não congele os reagentes ou os controlos.

Elimine qualquer reagente que pareça suspeito.

Amostras de plasma e todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente, antes de serem usados.

Observações

O teste baseia-se em 5 processos principais:

- Preparação da amostra para isolar o RNA do HIV-1
- transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA)
- amplificação por PCR do cDNA alvo, usando iniciadores específicos complementares para o HIV
- hibridação dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do(s) alvo(s)
- detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda por determinação colorimétrica

Este produto pode ser utilizado apenas com o instrumento COBAS AmpliPrep e o analisador COBAS AMPLICOR.

A Mistura Principal foi desenvolvida para assegurar a quantificação comparável dos subtipos do HIV-1 do grupo M.

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 de Padrão de Quantificação (compensa os efeitos de inibição e controla os processos de amplificação e preparação visando permitir uma quantificação rigorosa do RNA do HIV-1 presente em casa amostra) em casa amostra e controlo.

A concentração do RNA do HIV-1 é expressa em cópias/ml.

O teste COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 pode ser utilizado com o Método Standard (processa 70 µl de plasma) e com o Método Ultra-Sensível (processa 500 µl de plasma).

Pode concluir o teste num único dia de trabalho, ou no decurso de dois dias de trabalho (com diferentes procedimentos).

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

Os materiais devem ser exclusivos de cada procedimento e não devem ser usados para outros, nem transportados entre áreas.

Os materiais e equipamento de Pós-amplificação devem permanecer sempre na Área de Pós-amplificação.

As amostras e os controlos deverão ser manipulados como se estivessem infectadas, utilizando procedimentos de laboratório seguros.

Nenhum método de teste 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.

Algumas soluções contêm azida sódica, que pode reagir com tubagens de chumbo e cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar estas soluções, lave os canos com água em abundância, de modo a evitar a acumulação de azidas.

Método Standard até 24 amostras e controlos, em cada execução:

Recomenda-se a inclusão de pelo menos uma replicação de Controlo negativo COBAS AmpliPrep, do Controlo (I) Baixo STD HIV-1 MONITOR, v1.5 e do Controlo (I) Alto HIV-1 MONITOR, v1.5.

Método Ultra-Sensível até 24 amostras e controlos, em cada execução:

Recomenda-se a inclusão de pelo menos uma replicação de Controlo negativo COBAS AmpliPrep, do Controlo (+) Baixo STD HIV-1 MONITOR, v1.5 e do Controlo (-) Alto HIV-1 MONITOR, v1.5.

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

A semelhança do que sucede com qualquer novo procedimento laboratorial, os operadores com pouca experiência, deverão considerar o uso de controlos adicionais.

O analisador COBAS AMPLICOR foi programado para sinalizar os erros e as inconsistências de resultados mais comuns. Como parte integrante do processo de laboratório de rotina para avaliação de dados, recomenda-se que sejam revistas as leituras dos valores de A_{660} a fim de garantir a integridade máxima dos resultados.

Como um só estudo clínico talvez não demonstre de forma adequada a utilidade clínica de um teste da medida quantitativa do RNA do HIV em todas as populações de pacientes, em todas as situações clínicas ou com todos os tratamentos antiretrovirais, deve-se proceder com cuidado suficiente antes de aplicar a interpretação dos dados do estudo, a qualquer paciente individual. Como é o caso de qualquer teste diagnóstico, os resultados do teste devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e de laboratório pertinentes a cada paciente.