

Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay

Instruções de Utilização
Para utilização em diagnóstico *in vitro*
Exclusivamente para exportação para os EUA

Informações gerais	3
Utilização prevista	3
Resumo e explicação do teste	3
Princípios do procedimento	4
Resumo de segurança e desempenho	5
Advertências e precauções	5
Requisitos de armazenamento e manuseamento de reagentes	9
Colheita e armazenamento de espécimes	10
Amostras dentro do Panther System	13
Transporte de espécimes	13
Panther System	14
Reagentes e materiais fornecidos	14
Materiais necessários, mas disponibilizados separadamente	16
Materiais opcionais	17
Procedimento de teste do Panther System	17
Notas sobre o procedimento	22
Controlo de qualidade	23
Calibração do ensaio	23
Controlos negativo e positivo	23
Calibrador interno/controlo interno	23
Interpretação de resultados	24
Limitações	26
Desempenho analítico	27
Limite de detecção (LoD) utilizando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1	27
Limite de detecção em vários subtipos e grupos de HIV-1	28
Intervalo linear	29
Linearidade nos subtipos e grupos do HIV-1	30
Determinação do limite inferior de quantificação usando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1	31
Verificação do LLOQ em vários subtipos e grupos de HIV-1	32
Precisão	33
Substâncias endógenas e exógenas potencialmente interferentes	34
Desempenho com espécimes HIV-1 negativos	36
Contaminantes microbianos potencialmente interferentes	36
Repetibilidade de espécimes clínicos	38
Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes	39
Contaminação por transferência	39
Painel de seroconversão	40
Estudo de equivalência em soro e plasma	41
Estudos de reprodutibilidade	41

Desempenho clínico	44
Validação da quantificação da carga viral	44
Estudos de especificidade clínica	45
Estudos de sensibilidade clínica	45
Positividade em amostras serodiscordantes	46
Bibliografia	47
Informações de contacto e histórico de revisões	49

Informações gerais

Utilização prevista

O ensaio Aptima® HIV-1 Quant Dx é um teste de amplificação de ácidos nucleicos in vitro para detecção e quantificação dos grupos M, N e O de RNA do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) no Panther™ System totalmente automatizado. É indicado para utilização como auxiliar no diagnóstico de infecção pelo HIV-1, como confirmação da infecção pelo HIV-1 e como auxiliar no controlo clínico de pacientes infetados pelo HIV-1.

O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx pode ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de infecção pelo HIV-1, incluindo infecção aguda ou primária. A presença de RNA do HIV-1 no plasma ou soro de pacientes sem anticorpos para o HIV-1 é indicadora de infecção aguda ou primária pelo HIV-1. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx pode ser utilizado como teste suplementar em espécimes que apresentem resultados reativos repetidos em imunoensaios de HIV aprovados. Se o espécime for reativo no ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, está confirmada a infecção pelo HIV-1.

O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx pode também ser utilizado em conjunto com o quadro clínico e outros marcadores laboratoriais para o prognóstico da doença em indivíduos infetados pelo HIV-1. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx pode ser utilizado como auxiliar na monitorização do efeito do tratamento antirretroviral através da medição das alterações de concentração de RNA do HIV-1 no plasma.

Quando um ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx é utilizado como auxiliar no diagnóstico de infecção pelo HIV-1, o desempenho dos resultados qualitativos é aferido através de espécimes de plasma e de soro. Quando utilizado como auxiliar na monitorização do efeito da terapêutica antirretroviral, o desempenho dos resultados quantitativos é aferido apenas através de espécimes de plasma. Os espécimes de soro não podem ser utilizados para obter resultados quantitativos.

Este ensaio não é indicado para utilização no rastreio de dadores de sangue ou plasma.

**Também podem ser utilizados espécimes de gota de sangue seca (Dried Blood Spot, DBS) com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx. Para obter a descrição completa da utilização prevista e informações para espécimes de DBS, consulte o Suplemento de gota de sangue seca do folheto informativo do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx.*

Resumo e explicação do teste

Estudos epidemiológicos identificaram o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) como o agente etiológico da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (1-7). O HIV pode ser transmitido por contacto sexual, exposição a sangue ou derivados do sangue infetados ou por transmissão mãe-filho (8). No prazo de 3 a 6 semanas da exposição ao HIV, os indivíduos infetados desenvolvem geralmente uma síndrome aguda breve que se caracteriza por sintomas gripais e está associada a níveis elevados de viremia no sangue periférico (9-12). Na maior parte dos indivíduos infetados, a esta fase precoce segue-se uma resposta imunitária específica do HIV e uma diminuição da viremia plasmática, normalmente dentro de 4 a 6 semanas após o aparecimento dos sintomas (13-14). Após a seroconversão, os indivíduos infetados entram tipicamente numa fase assintomática, clinicamente estável, que pode durar anos (15-17). Este período assintomático caracteriza-se por viremia plasmática de nível baixo, persistente (18) e por uma depleção gradual dos linfócitos T CD4+. Esta depleção conduz a uma imunodeficiência grave, a múltiplas infeções oportunistas, a tumores malignos e à morte (19). Apesar de os níveis de vírus no sangue periférico serem relativamente baixos durante a fase assintomática da infecção, a replicação e a eliminação do vírus parecem ser processos dinâmicos nos quais velocidades elevadas de produção do vírus e de infecção das células CD4+ são equilibradas por velocidades igualmente elevadas de eliminação do vírus, morte de células infetadas e substituição das células CD4+, o que tem como resultado níveis relativamente estáveis de viremia plasmática e das células CD4+ (20-22).

As medições quantitativas do HIV no sangue periférico demonstraram que níveis de vírus mais elevados podem estar correlacionados com o aumento do risco de progressão clínica da doença associada ao HIV e que reduções nos níveis virais plasmáticos podem estar associadas à diminuição do risco de progressão clínica (23-25). Os níveis de vírus no sangue periférico podem ser quantificados por medição do antígeno p24 do HIV no soro, por cultura quantitativa do HIV a partir do plasma ou por medição direta do RNA viral no plasma utilizando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos ou de amplificação do sinal (26-30).

As técnicas moleculares como a amplificação mediada por transcrição (TMA) têm sido amplamente usadas para amplificar os ácidos nucleicos (31). A TMA usa uma captura do alvo específica e amplificação isotérmica para detectar ácidos nucleicos em múltiplas doenças infecciosas, incluindo CT, NG, HPV, TV e HIV/HCV/HBV para testes de doadores de sangue (32).

O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, através da TMA, utiliza “primers” múltiplos e longos que têm como objetivo diversas regiões do genoma do HIV-1 para compensar a taxa elevada de mutação do HIV-1. O ensaio inclui sistemas de amplificação e de detecção de alvo duplo, tendo como objetivo duas regiões do genoma do HIV-1 (Pol e LTR) de forma independente. O software do ensaio não calcula a média dos sinais dos dois sistemas.

O sistema de alvo duplo Aptima foi concebido para aumentar as probabilidades de detecção e quantificação exatas das amostras.

Princípios do procedimento

O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx envolve três passos principais que decorrem todos num único tubo no sistema Panther: captura do alvo, amplificação do alvo por amplificação mediada por transcrição (TMA) e detecção dos produtos da amplificação (amplicon) através de sondas com marcadores fluorescentes (torches).

Durante a captura do alvo, os ácidos nucleicos virais são isolados dos espécimes. O espécime é tratado com um detergente para solubilizar o invólucro viral, desnaturar as proteínas e libertar o RNA genómico viral. Os oligonucleótidos de captura são hibridados com regiões altamente conservadas do genoma do HIV-1, caso estejam presentes, no espécime que está a ser testado. O alvo hibridado é depois capturado por micropartículas magnéticas que são separadas do espécime num campo magnético. Os passos de lavagem retiram componentes estranhos do tubo de reação.

A amplificação do alvo ocorre via TMA, que é um método de amplificação de ácidos nucleicos baseado na transcrição que utiliza duas enzimas: a transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina de Moloney) e a T7 RNA polimerase. A transcriptase reversa é utilizada para criar uma cópia de DNA (com uma sequência promotora para a T7 RNA polimerase) da sequência-alvo. A T7 RNA polimerase produz várias cópias do RNA amplicon a partir do modelo da cópia do DNA. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx utiliza o método TMA para amplificar duas regiões do RNA do HIV-1 (Pol e LTR). É gerado um sinal independente a partir da amplificação de cada região utilizando “primers” específicos, que são designados para amplificar os grupos M, N e O do HIV-1.

A detecção é conseguida utilizando “torches” de ácidos nucleicos de cadeia simples, presentes durante a amplificação de cada alvo, que se hibridam especificamente com os produtos da amplificação em tempo real. Cada “torch” tem um fluoróforo e um agente de extinção. Quando a sonda fluorescente não é hibridada com o produto da amplificação, o agente de extinção fica em estreita proximidade com o fluoróforo e suprime a fluorescência. Quando o torch se liga ao produto da amplificação, o agente de extinção é ainda mais afastado do fluoróforo e emite um sinal num determinado comprimento de onda quando excitado por uma fonte de luz. À medida que uma maior quantidade de sondas fluorescentes se hibridiza com o produto de amplificação, é gerado um sinal de fluorescência mais elevado. O tempo que demora até o sinal fluorescente

de cada alvo atingir um limiar especificado (“tTime”) é proporcional à concentração inicial de HIV-1. Cada reação tem um calibrador interno/controlo interno (internal control, IC) que controla as potenciais variações do processamento, da amplificação e da detecção de espécimes. A concentração de uma amostra é então calculada utilizando os tTimes para a amplificação das regiões Pol e LTR pelo software do Panther System. Através do seu algoritmo e da comparação com as informações de calibração armazenadas, o software do sistema Panther devolve um resultado único e clinicamente validado para cada amostra.


Resumo de segurança e desempenho

O Resumo de segurança e desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) está disponível na base de dados europeia de dispositivos médicos (Eudamed), onde está associado aos identificadores do dispositivo (UDI-DI básico). Para localizar o SSP do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, consulte o Identificador único do dispositivo básico (BUDI): 54200455DIAGAPTHIV1XB

Advertências e precauções

- A. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- B. Para utilização profissional.
- C. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx não se destina a ser utilizado como um teste de rastreio à presença de HIV-1 em sangue doado.
- D. Para reduzir o risco de resultados inválidos, leia atentamente todo o folheto informativo e o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion™* antes de executar este ensaio.

Relacionadas com o laboratório

- E.  CUIDADO: Os controlos deste ensaio contêm plasma humano. O plasma é negativo para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpos anti-HCV, anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, e antígeno HIV quando testados com procedimentos licenciados pela Agência dos Medicamentos e Alimentos dos EUA. Além disso, o plasma não é reativo para o RNA do HCV e o RNA do HIV-1 quando testado com testes de ácidos nucleicos licenciados utilizando amostras agrupadas. Todos os materiais com origem em sangue humano devem ser considerados como potencialmente infecciosos e devem ser manuseados de acordo com as Precauções Universais (33-35).
- F. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e no manuseamento de materiais infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- G. Utilize apenas artigos de laboratório descartáveis fornecidos ou especificados.
- H. Adote precauções de laboratório de rotina. Não pipete com a boca. Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho designadas. Use luvas sem pó descartáveis, óculos de proteção e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes do kit. Lave bem as mãos após manusear os espécimes e os reagentes do kit.
- I. As superfícies de trabalho, pipetas e outros equipamentos têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).

- J. Elimine todos os materiais que tenham estado em contacto com espécimes e reagentes de acordo com os regulamentos regionais (33-36). Limpe e desinfete minuciosamente todas as superfícies de trabalho.
- K. Os controlos contêm azida de sódio como conservante. Não utilize tubos de metal para a transferência de reagentes. Se as soluções com compostos de azida de sódio forem eliminadas num sistema de canalização, deverão antes ser diluídas e irrigadas com água corrente em abundância. Estas precauções são recomendadas para evitar a acumulação de depósitos em canos metálicos onde se poderiam desenvolver condições explosivas.
- L. As boas práticas padrão para os laboratórios moleculares incluem a monitorização ambiental. Para monitorizar o ambiente de um laboratório, sugere-se o seguinte procedimento.
 1. Obtenha uma zaragatoa com ponta de algodão e junte-a com um Tubo de alíquotas de espécime Aptima® (SAT).
 2. Identifique adequadamente cada SAT.
 3. Encha cada SAT com 1 ml de diluente de espécimes Aptima®.
 4. Para colher amostras de superfície, humedeca ligeiramente uma zaragatoa com água desionizada sem nuclease.
 5. Colha a amostra da superfície relevante movimentando a zaragatoa verticalmente, de cima para baixo. Rode a zaragatoa cerca de meia volta enquanto colhe a amostra do local.
 6. Coloque imediatamente a amostra em zaragatoa dentro do tubo e rode suavemente a zaragatoa no diluente para extrair materiais potencialmente colhidos. Prima a zaragatoa no lado do tubo de transporte para extrair o máximo de líquido possível. Elimine a zaragatoa e tape o tubo.
 7. Repita os passos para as restantes amostras em zaragatoa.
 8. Teste a zaragatoa com um ensaio molecular.

Relacionadas com os espécimes




- M. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize as precauções universais (33-35) quando executar este ensaio. Devem ser estabelecidos métodos de manuseamento e eliminação adequados de acordo com os regulamentos locais (36). Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e com formação no manuseamento de materiais infecciosos.
- N. Mantenha as condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes, para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime noutras condições de transporte que não as recomendadas não foi avaliada.
- O. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento de espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desaperçar ou destapar espécimes. Os espécimes podem conter níveis de organismos extremamente elevados. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e deite fora os materiais usados sem passá-los por cima de recipientes abertos. Mude de luvas se estas entrarem em contacto com o espécime.

Relacionadas com o ensaio

- P. Os resultados quantitativos do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foram avaliados utilizando plasma. O soro não pode ser utilizado para obter resultados quantitativos. Os resultados qualitativos foram avaliados com plasma e com soro. A utilização deste kit de testes com outros espécimes além dos especificamente aprovados para utilização com este kit de testes pode originar resultados de teste inexatos.
- Q. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foi clinicamente validado utilizando o algoritmo do software do Panther System. O resultado validado a ser comunicado é fornecido pelo software do sistema Panther no ecrã Resultados e no relatório Resultados.
- R. Não utilize o kit de reagentes, o calibrador nem os controlos após o prazo de validade.
- S. Não troque, misture, nem combine reagentes do ensaio de kits com números de lote mestre diferentes. Os fluidos do ensaio podem pertencer a números de lote diferentes. Os controlos e o calibrador podem pertencer a números de lote diferentes.
- T. Evite a contaminação microbiana ou com nuclease dos reagentes.
- U. Tape e conserve todos os reagentes do ensaio às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afetado pela utilização de reagentes conservados de forma incorreta. Consulte as secções *Requisitos de armazenamento e manuseamento de reagentes* e *Materiais opcionais* para obter mais informações.
- V. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos do ensaio sem instruções específicas para tal. Não adicione reagentes ou fluidos. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- W. Alguns reagentes deste kit estão marcados com informações sobre perigos.

Nota: A informação sobre a comunicação de perigos reflete as classificações da Ficha de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) da União Europeia. Para obter informações sobre a comunicação de riscos específicas da sua região, consulte a respetiva FDS na Biblioteca de Fichas de Dados de Segurança em www.hologicsds.com. Para obter mais informações sobre os símbolos, consulte a legenda dos símbolos em www.hologic.com/package-inserts.

Informações sobre perigos para a UE	
—	Amplification Reagent Cloreto de magnésio 60-65% — H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.
—	Enzyme Reagent HEPES 1-5% Triton X-100 1-5% — H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.


<p>—</p>	<p>Enzyme Reconstitution Reagent <i>Glicerina 20-25%</i> <i>Triton X-100 5-10%</i> <i>HEPES 1-5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
<p>—</p>	<p>Promoter Reagent <i>Cloreto de magnésio 60-65%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
<p>—</p>	<p>Target Capture Reagent <i>HEPES 15-20%</i> <i>Sal de lítio de lauril sulfato 5-10%</i> <i>Monoidrato de hidróxido de lítio 1-5%</i> <i>Ácido succínico 1-5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
<p>  </p>	<p>HIV VL Kit Controls <i>Soro humano/Plasma humano 95-100%</i> <i>Azida de sódio <1%</i></p> <p>PERIGO H300 – Mortal por ingestão. H410 – Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P264 – Lavar o rosto, as mãos e toda a pele exposta cuidadosamente após manuseamento. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P301 + P310 – EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P321 – Tratamento específico (ver instruções de primeiros socorros suplementares no presente rótulo). P330 – Enxaguar a boca. P391 – Recolher o produto derramado.</p>
<p>—</p>	<p>HIV VL Kit Calibrators <i>HEPES 15-20%</i> <i>Lauryl Sulfate LithiumSalt 5-10%</i> <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 1-5%</i> <i>Succinic Acid 1-5%</i></p> <p>—</p> <p>H412 – Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P273 – Evitar a libertação para o ambiente. P501 – Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>

Requisitos de armazenamento e manuseamento de reagentes

- A. Na tabela seguinte, são mostradas as condições de conservação e estabilidade para reagentes, controlos e calibrador.

Reagente	Armazenamento o por abrir	Kit aberto (reconstituído)	
		Armazenamento	Estabilidade
Reagente de amplificação qHIV-1	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente de amplificação qHIV-1	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente enzimático qHIV-1	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente enzimático qHIV-1	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente promotor qHIV-1	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente promotor qHIV-1	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente de captura do alvo qHIV-1	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
qHIV-1 NC CONTROL – (controlo negativo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar dentro de 20 horas
qHIV-1 LPC CONTROL + (controlo positivo baixo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar dentro de 20 horas
qHIV-1 HPC CONTROL + (controlo positivo alto)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar dentro de 20 horas
qHIV-1 PCAL (calibrador positivo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar dentro de 20 horas

^a Quando os reagentes são removidos do Panther System, devem ser imediatamente devolvidos às respetivas temperaturas de conservação adequadas.

- B. Deite fora quaisquer reagentes reconstituídos e o reagente de captura do alvo (Target Capture Reagent, TCR) não usados após 30 dias ou após a data de validade do lote principal, conforme o que ocorrer primeiro.
- C. Os reagentes conservados dentro do Panther System têm 72 horas de estabilidade. Os reagentes podem ser carregados no sistema Panther até 8 vezes. O Panther System regista cada uma das vezes que os reagentes são carregados.
- D. Depois de descongelar o calibrador, a solução deve estar límpida, ou seja, sem turvação ou precipitados.
- E.  O Reagente promotor e o Reagente promotor reconstituído são fotossensíveis. Proteja estes reagentes da luz durante a sua conservação e a preparação para utilização.

Colheita e armazenamento de espécimes

Nota: Manuseie todos os espécimes como se contivessem agentes potencialmente infecciosos. Respeite as precauções universais.

Nota: Tenha cuidado para evitar a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento das amostras. Por exemplo, elimine o material usado sem passar por cima de tubos abertos.

Nota: Só são recomendados para conservação tubos secundários de plástico.

Podem utilizar-se espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou de plástico:

Para medições quantitativas:

- Tubos com anticoagulantes EDTA ou ácido de citrato e dextrose (ACD) ou
- Tubos de preparação de plasma (PPTs).

Para determinação qualitativa:

- Tubos com anticoagulantes EDTA ou ACD ou
- PPTs ou
- Tubos de soro ou
- Tubos de separação de soro (Serum Separator Tubes, SSTs).

No caso de soro, aguarde até o coágulo se formar antes de continuar o processamento.

A. Colheita de espécimes

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. Separe o plasma ou o soro dos glóbulos vermelhos aglomerados seguindo as instruções do fabricante do tubo utilizado. O plasma ou soro pode ser testado no sistema Panther no tubo primário ou transferido para o tubo secundário. Para obter o volume de reação de 500 µL, o volume mínimo de plasma ou de soro é de até 1200 µl para tubos de colheita primários e de 700 µl para tubos secundários. A tabela que se segue identifica os requisitos de volume morto para cada tipo de tubo primário e secundário:

Tubo (tamanho e tipo)	Volume morto no Panther System
Tubo de alíquotas de espécime Aptima (SAT)	0,2 ml
12x75 mm	0,5 ml
13x100 mm	0,5 ml
13x100 mm com gel	0,3 ml
16x100 mm com gel	0,7 ml

Se não for testado imediatamente, o plasma ou o soro pode ser conservado de acordo com as especificações a seguir descritas. Se for transferido para um tubo secundário, o plasma pode ser congelado a -20 °C ou -70 °C e o soro pode ser congelado a -20 °C. Não exceda três ciclos de congelamento/descongelamento para evitar afetar o resultado. Não congele os espécimes em EDTA, ACD nem em tubos de colheita de soro primários.

B. Condições de conservação de espécimes

1. Espécimes de plasma com EDTA e ACD

Até 24 horas após a colheita do espécime, os tubos primários com plasma centrifugado podem ser conservados entre 2 °C e 30 °C (Figura 1, caixa superior). Após 24 horas, o plasma pode ser conservado por um período mais prolongado numa das seguintes condições (Figura 1, caixas inferiores):

- No tubo de colheita primário de 2 °C a 8 °C durante até 3 dias,
- No tubo secundário de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias ou
- No tubo secundário de -20 °C a -70 °C durante até 90 dias

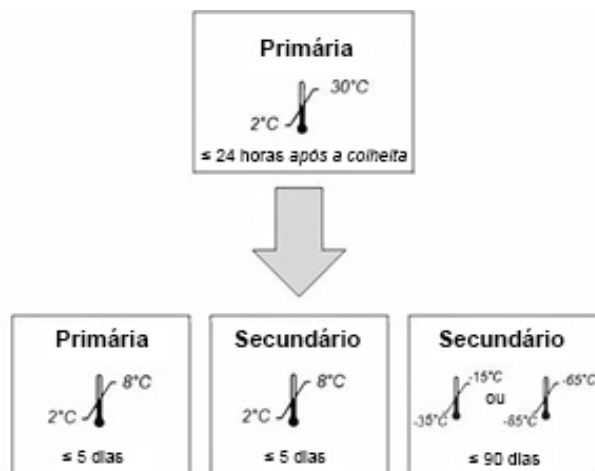


Figura 1. Condições de conservação dos tubos EDTA/ACD

2. Espécimes de PPT

Até 24 horas após a colheita do espécime, os PPTs com plasma centrifugado podem ser conservados entre 2 °C e 30 °C (Figura 2, caixa superior). Após 24 horas, o plasma pode ser conservado por um período de tempo mais prolongado numa das seguintes condições (Figura 2, caixas inferiores):

- No PPT de 2 °C a 8 °C durante até 3 dias,
- No tubo secundário de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias ou
- No PPT ou no tubo secundário de -20 °C a -70 °C durante até 90 dias.

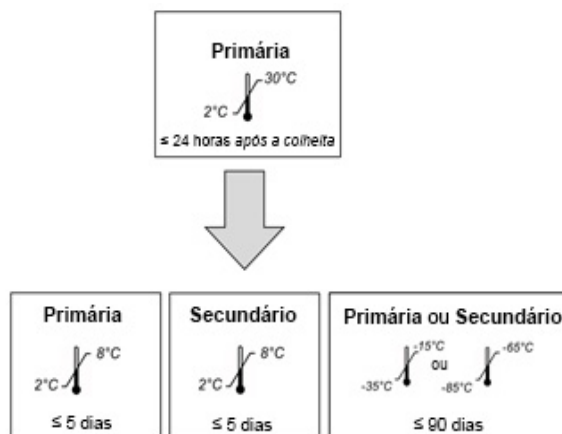


Figura 2. Condições de conservação dos PPTs

3. Espécimes no tubo de soro

Até 24 horas após a colheita do espécime, os tubos de soro com soro centrifugado podem ser conservados entre 2 °C e 30 °C (Figura 3, caixa superior). Após 24 horas, o soro pode ser conservado por um período mais prolongado numa das seguintes condições (Figura 3, caixas inferiores):

- No tubo de soro de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias,
- No tubo secundário de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias ou
- No tubo secundário a -20 °C durante até 90 dias.

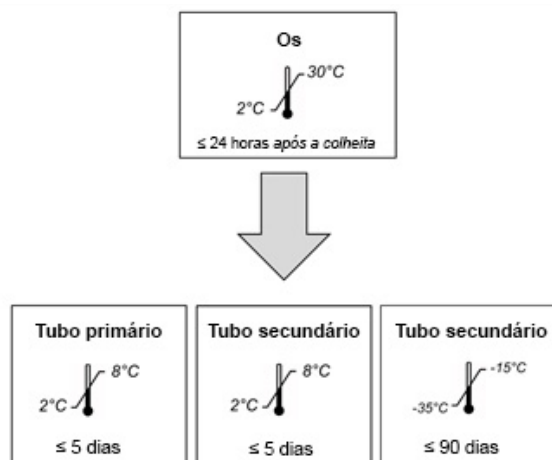


Figura 3. Condições de conservação dos tubos de soro

4. Espécimes em SST

Até 24 horas após a colheita do espécime, os SSTs com soro centrifugado podem ser conservados entre 2 °C e 30 °C (Figura 4, caixa superior). Após 24 horas, o soro pode ser conservado por um período de tempo mais prolongado numa das seguintes condições (Figura 4, caixas inferiores):

- No SST de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias,
- No tubo secundário de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias ou
- No tubo secundário a -20 °C durante até 90 dias.

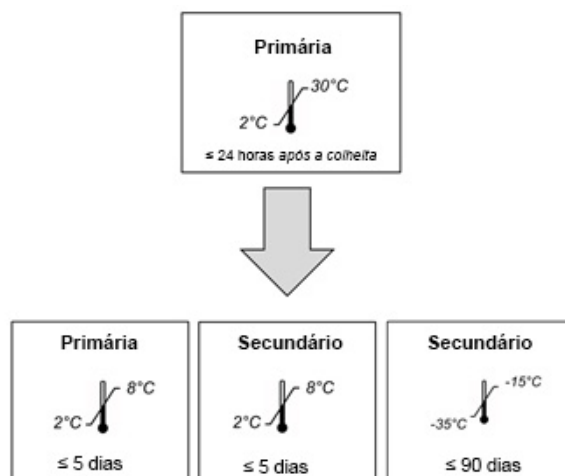


Figura 4. Condições de conservação dos SSTs

C. Diluição de espécimes de plasma

Nota: Um espécime de plasma pode ser diluído no SAT ou tubo secundário para teste no Panther System. Consulte Procedimento de teste do Panther System, passo E.4 para obter mais informações.

Nota: Se um espécime estiver diluído, deverá ser testado imediatamente após a diluição. Não congele um espécime diluído.



Nota: A diluição dos espécimes de plasma só pode ser utilizada para resultados quantitativos. Não dilua amostras de plasma para resultados de diagnóstico.

Amostras dentro do Panther System

As amostras podem permanecer destapada no sistema Panther por um período máximo de 8 horas no total. As amostras podem ser removidas do Panther System e testadas, desde que o tempo total no instrumento não exceda as 8 horas antes da pipetagem da amostra pelo sistema Panther.

Transporte de espécimes

Mantenha as condições de conservação de amostras descritas em *Colheita e armazenamento de espécimes*.

Nota: Os espécimes devem ser expedidos de acordo com os regulamentos de transporte locais, nacionais e internacionais em vigor.

Panther System

Os reagentes do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx para o sistema Panther estão indicados abaixo. Os símbolos de identificação do reagente também estão indicados junto ao nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Kit de ensaio do Aptima HIV-1 Quant Dx

100 testes (1 kit de ensaio, 1 kit de calibrador e 1 kit de controlo) (Código de produto PRD-03000)

É possível encomendar calibradores e controlos adicionais em separado. Consulte os respetivos códigos de produto abaixo.

Kit de ensaio do Aptima HIV-1 Quant Dx

(armazenar a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
A	Reagente de amplificação qHIV-1 <i>Ácidos nucleicos não infecciosos liofilizados em solução tamponada.</i>	1 frasco
E	Reagente enzimático qHIV-1 <i>Transcriptase reversa e polimerase de RNA liofilizadas em solução tamponada com HEPES.</i>	1 frasco
PRO	Reagente promotor qHIV-1 <i>Ácidos nucleicos não infecciosos liofilizados em solução tamponada.</i>	1 frasco
AR	Solução de reconstituição do reagente de amplificação qHIV-1 <i>Solução aquosa contendo glicerol e conservantes.</i>	1 x 7,2 ml
ER	Solução de reconstituição do reagente enzimático qHIV-1 <i>Solução tamponada com HEPES com surfactante e glicerol.</i>	1 x 5,8 ml
PROR	Solução de reconstituição do reagente promotor qHIV-1 <i>Solução aquosa contendo glicerol e conservantes.</i>	1 x 4,5 ml
TCR	Reagente de captura do alvo qHIV-1 <i>Ácidos nucleicos numa solução salina tamponada com fase sólida, ácidos nucleicos não infecciosos e calibrador interno.</i>	1 x 72,0 ml
	Aros de reconstituição	3
	Folha de códigos de barras do lote mestre	1 folha

Kit do calibrador Aptima HIV-1 Quant Dx (código de produto PRD-03001)
(armazenar a uma temperatura entre -15 °C e -35 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
PCAL	qHIV-1 Calibrador positivo <i>Transcrito em solução tampão</i>	5 x 2,5 ml
	Etiqueta de código de barras do calibrador	—

Kit de controlos Aptima HIV-1 Quant Dx (código de produto PRD-03002)
(armazenar a uma temperatura entre -15 °C e -35 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
NC	Controlo negativo qHIV-1 <i>Plasma humano desfibrinado HIV-1 negativo com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 1,5 ml
LPC	Controlo positivo baixo qHIV-1 <i>Armored RNA de HIV-1 não infeccioso em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 1,5 ml
HPC	Controlo positivo alto qHIV-1 <i>Armored RNA de HIV-1 não infeccioso em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 1,5 ml
	Etiqueta de código de barras do controlo	—

Materiais necessários, mas disponibilizados separadamente

Nota: Os materiais disponibilizados pela Hologic têm a indicação dos códigos de produto, a menos que o contrário seja especificado.

Material	Código de produto
Panther System	303095
Panther Fusion System	PRD-04172
Fluidos contínuos e resíduos Panther System (Panther Plus)	PRD-06067
Kit de calibrador Aptima® HIV-1 Quant Dx	PRD-03001
Kit de controlos Aptima® HIV-1 Quant Dx	PRD-03002
Kit de execução Panther™ para ensaios em tempo real (apenas para ensaios em tempo real)	PRD-03455 (5000 testes)
Kit de fluidos do ensaio Aptima® (também conhecido como Kit de fluidos universais) <i>contém solução de lavagem Aptima®, tampão para o fluido de desativação Aptima® e reagente de óleo Aptima®</i>	303014 (1000 testes)
<i>Unidades multitubos (MTUs)</i>	104772-02
Kit de sacos de resíduos Panther™	902731
Tampa do recipiente de resíduos Panther™	504405
Ou o Kit de execução do Panther™ System (ao realizar ensaios TMA, sem ser em tempo real em paralelo com os ensaios TMA em tempo real) <i>contém MTUs, sacos de resíduos, tampas do recipiente de resíduos, detetores automáticos e fluidos de ensaio</i>	303096 (5000 testes)
Pontas, 1000 µl, com filtro, condutoras, deteção de líquido e descartáveis <i>Nem todos os produtos estão disponíveis em todas as regiões. Contacte o seu representante para obter informações específicas da região.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 8,25% (0,7 M a 1,16 M)	—
Luvras sem pó descartáveis	—
Tampas de substituição para reagentes <i>Frascos de reconstrução do reagente de amplificação, do reagente enzimático e do reagente promotor</i> <i>Frasco de TCR</i>	CL0041 (100 tampas) CL0040 (100 tampas)
Coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico	—
Toalhetes que não libertem pelos	—
Pipetador	—
PONTAS	—
Opções de tubos de colheita primários (EDTA, ACD, PPT, SST, soro): 13 mm x 100 mm 13 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	— — —
Centrífuga	—
Agitador de vórtex	—

Materiais opcionais

Material	Código de produto
Opções de tubo secundário:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Tubos de Alíquotas de Espécime Aptima (SATs) (100 por embalagem)	FAB-18184
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) <i>tampa para SAT</i>	504415
Diluyente de espécimes Aptima	PRD-03003
Kit de diluyente de espécimes Aptima <i>contém diluentes de espécimes, 100 SATs, e 100 tampas</i>	PRD-03478
Pipetas de transferência	—
Painéis disponíveis no mercado, por exemplo: <i>HIV-1 de Controlo de qualidade para diagnóstico molecular (QCMD) ou Painei de pesquisa da carga viral HIV do College of American Pathologists (CAP) ou Paineis SeraCare ACCURUN HIV</i>	—
Zaragatoas com ponta de algodão	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	PRD-03488

Procedimento de teste do Panther System

Nota: Consulte o Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System para mais informações sobre o procedimento.

A. Preparação da área de trabalho

1. Limpe as superfícies de trabalho onde serão preparados os reagentes. Limpe as superfícies de trabalho com uma solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante, pelo menos, 1 minuto e depois enxagúe com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada na qual vai preparar os reagentes e as amostras com uma proteção limpa e absorvente com forro de plástico.
2. Limpe uma superfície de trabalho separada onde as amostras serão preparadas. Siga o procedimento supramencionado (passo A.1).
3. Limpe os pipetadores. Siga o procedimento supramencionado (passo A.1).

B. Preparação do calibrador e dos controlos

Deixe o calibrador e os controlos atingirem uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes de efetuar o processamento da seguinte forma:

1. Remova o calibrador e os controlos da conservação (-15 °C a -35 °C) e coloque-os a uma temperatura de 15 °C a 30 °C. Ao longo do processo de descongelação, inverta suavemente cada tubo para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

Opção. Os tubos de calibrador e controlo podem ser colocados num dispositivo de agitação de tubos por oscilação para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

Nota: Evite criar espuma excessiva quando inverter o calibrador e os controlos. A espuma compromete o sensor de nível do Panther System.

2. Quando o conteúdo do tubo tiver descongelado, seque a parte de fora do tubo com um toalhete descartável, limpo e seco.
3. Para prevenir a contaminação, não abra os tubos agora.

C. Reconstituição/preparação dos reagentes de um novo kit

Nota: A reconstituição dos reagentes deve ser realizada antes de iniciar qualquer trabalho no Panther System.

1. Para preparar o reagente de captura do alvo (TCR), proceda da seguinte forma:
 - a. Remova o TCR da conservação (2 °C a 8 °C). Verifique o número de lote no frasco de TCR para se certificar de que corresponde ao número de lote da folha do código de barras do lote mestre.
 - b. Agite imediata e vigorosamente o frasco de TCR 10 vezes. Deixe o frasco de TCR a uma temperatura de 15 °C a 30 °C para aquecer durante, pelo menos, 45 minutos. Durante este período, gire e inverta o tubo de TCR pelo menos a cada 10 minutos.

Opção. O frasco de TCR pode ser preparado num dispositivo de agitação de tubos por oscilação seguindo estas instruções: Remova o TCR da conservação (2 °C a 8 °C) e agite imediata e vigorosamente 10 vezes. Coloque o frasco de TCR num dispositivo de agitação de tubos por oscilação e deixe o TCR a uma temperatura de 15 °C a 30 °C para aquecer durante, pelo menos, 45 minutos.

- c. Antes da utilização, assegure-se de que todo o precipitado está dissolvido e que as partículas magnéticas estão em suspensão.
2. Para reconstituir o reagente de amplificação, o reagente enzimático e o reagente promotor, proceda da seguinte forma:
 - a. Remova os reagentes liofilizados e as soluções de reconstituição correspondentes da conservação (2 °C a 8 °C). Emparelhe cada solução de reconstituição com o respetivo reagente liofilizado.
 - b. Certifique-se de que a solução de reconstituição e os reagentes liofilizados têm cores de rótulo correspondentes. Verifique os números do lote na Folha de códigos de barras do lote mestre para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados.
 - i. Abra o frasco de reagente liofilizado removendo o selo metálico e a rolha de borracha.
 - ii. Insira com firmeza a extremidade ranhurada do aro de reconstituição (preto) no frasco (Figura 5, passo 1).

- iii. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
- iv. Coloque o frasco da solução de reconstituição numa superfície estável (por exemplo, a bancada). Em seguida, inverta o frasco de reagente liofilizado sobre o frasco da solução de reconstituição e fixe firmemente o aro ao frasco da solução de reconstituição (Figura 5, passo 2).
- v. Inverta lentamente os frascos montados (frasco ligado ao frasco de solução) para permitir que a solução drene para o frasco de vidro (Figura 5, passo 3).
- vi. Recolha os frascos montados e gire-os durante pelo menos 10 segundos (Figura 5, passo 4).
- vii. Aguarde pelo menos 30 minutos para que o reagente liofilizado passe para a solução.
- viii. Depois de o reagente liofilizado estar na solução, gire os frascos montados durante pelo menos 10 segundos e, em seguida, oscile a solução no interior do frasco de vidro para a frente e para trás para misturar totalmente.
- c. Incline lentamente os frascos montados outra vez para permitir que toda a solução seja novamente drenada para dentro do frasco da solução de reconstituição (Figura 5, passo 5).
- d. Remova cuidadosamente o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 6).
- e. Volte a colocar a tampa do frasco. Grave as iniciais do operador e a data de reconstituição na etiqueta (Figura 5, passo 7).
- f. Descarte o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 8).

Advertência: evite formar espuma excessiva quando reconstituir os reagentes. A espuma compromete o sensor de nível do Panther System.

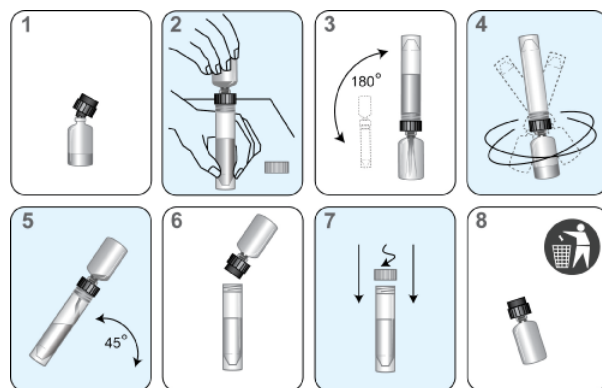


Figura 5. Processo de reconstituição de reagentes

D. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos

1. Remova os reagentes previamente preparados da conservação (2 °C a 8 °C).
2. Os reagentes de amplificação, enzimático, promotor e TCR previamente preparados devem atingir uma temperatura situada entre 15 °C e 30 °C antes do início do ensaio.
3. No caso de TCR previamente preparado, execute o passo C.1 anterior antes de colocá-lo no sistema.

4. Misture bem os reagentes de amplificação, enzimático e promotor girando-os e invertendo-os antes de os colocar no sistema. Evite criar espuma excessiva quando inverter os reagentes.

Opção: Os reagentes previamente preparados podem ser preparados num dispositivo de agitação de tubos por oscilação seguindo estas instruções: Remova os reagentes da conservação (2 °C a 8 °C). Coloque os reagentes num dispositivo de agitação de tubos por oscilação e deixe a uma temperatura de 15 °C a 30 °C para aquecer durante, pelo menos, 30 minutos.

5. Não ateste frascos de reagente. O Panther System reconhece e rejeita os frascos que tenham sido atestados.

E. Manuseamento de espécimes

1. Certifique-se de que os espécimes processados em tubos primários ou os espécimes não diluídos em tubos secundários foram conservados corretamente de acordo com *Colheita e armazenamento de espécimes*.
2. Assegure-se de que os espécimes congelados estejam totalmente descongelados. Coloque no vórtex os espécimes descongelados durante 3 a 5 segundos para misturar totalmente.
3. Deixe os espécimes atingirem uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento. Consulte *Amostras dentro do Panther System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.
4. Certifique-se de que cada tubo de colheita primário contém até 1200 µL de espécime ou de que cada SAT contém, pelo menos, 700 µL de espécime. Consulte a tabela fornecida em *Colheita e armazenamento de espécimes* para identificar os requisitos de volume morto para cada tipo de tubo primário e secundário. Se for necessária a diluição de espécimes, consulte o passo E.5 abaixo para obter mais informações.
5. Dilua um espécime de plasma a 1:3 no SAT ou a 1:100 num tubo secundário.

Um espécime de plasma pode ser diluído num tubo secundário para teste no sistema Panther.



Nota: A diluição dos espécimes de plasma só pode ser utilizada para resultados quantitativos. Não dilua amostras de plasma para resultados de diagnóstico.

Nota: Se um espécime estiver diluído, deverá ser testado imediatamente após a diluição.

a. Diluição de espécimes de volume reduzido

O volume de espécimes de plasma pode ser aumentado até ao volume mínimo necessário (700 µl) utilizando o diluente de espécimes Aptima. Os espécimes com pelo menos 240 µl de plasma podem ser diluídos com duas partes de diluente de espécimes (1:3) da seguinte forma:

- i. Coloque 240 µl de espécime no SAT.
- ii. Adicione 480 µl de diluente de espécimes Aptima.
- iii. Tape o tubo.
- iv. Inverta suavemente 5 vezes para misturar.

Os espécimes diluídos na proporção de 1:3 podem ser testados utilizando a opção 1:3 do sistema Panther (consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* para obter mais informações). O software irá comunicar automaticamente um resultado final ao aplicar o fator de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

b. Diluição de espécimes de titulação alta

Se o resultado de um espécime estiver acima do limite superior de quantificação, poderá ser diluído com 99 partes de diluente de espécimes Aptima (1:100) da seguinte forma:

- i. Coloque 30 µl de espécime no SAT ou num tubo secundário.
- ii. Adicione 2970 µl de diluente de espécimes Aptima.
- iii. Tape o tubo.
- iv. Inverta suavemente 5 vezes para misturar.

Os espécimes diluídos na proporção de 1:100 podem ser testados utilizando a opção 1:100 do sistema Panther (consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* para obter mais informações). O software irá comunicar automaticamente um resultado final ao aplicar o fator de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

Nota: Para espécimes diluídos com concentrações puras superiores ao ULoQ, os resultados serão elaborados utilizando notação científica.

6. Imediatamente antes de carregar os espécimes num Amostra Suporte, centrifugue cada espécime de 1000 a 3000g durante 10 minutos. Não remova as tampas. A existência de bolhas no tubo pode comprometer a detecção de nível do Panther System.

Consulte a *Preparação do sistema*, Passo F.2 abaixo para obter informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

F. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* e das *Notas sobre o procedimento*. Certifique-se de que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.
2. Carregue as amostras no respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibrador e controlos):

- a. Desaperte a tampa de um tubo de amostra, mas não a remova já.

Nota: Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis. Desaperte as tampas das amostras com cuidado.

- b. Carregue o tubo de amostra no respetivo suporte.
- c. Repita os passos a e b para cada amostra restante.
- d. Depois de as amostras terem sido carregadas no suporte de amostras, remova e elimine a tampa de cada tubo de amostra num suporte de amostras. Para evitar a contaminação, não passe uma tampa sobre quaisquer outros suportes de amostras ou tubos de amostras.
- e. Se necessário, use uma pipeta de transferência descartável e nova para remover quaisquer bolhas ou espuma.
- f. Depois de removida a última tampa, carregue o suporte de amostras numa zona de amostras.

Nota: Se tentar executar outros tipos de ensaios e de amostras ao mesmo tempo, fixe o Retentor de amostras antes de carregar o Suporte de amostras na Zona de amostras.

- g. Repita os passos a a f para o suporte de amostras seguinte.

Notas sobre o procedimento

A. Calibrador e controlos

1. Os tubos de calibrador positivo qHIV-1, controlo positivo baixo qHIV-1, controlo positivo alto qHIV-1 e controlo negativo qHIV-1 podem ser carregados em qualquer posição no suporte de amostras e em qualquer corredor da zona de amostras do sistema Panther. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
 - a. O calibrador e os controlos estão atualmente a serem processados pelo sistema.
 - b. Os resultados válidos para os controlos e calibrador são registados no sistema.
2. Quando os tubos de calibrador e controlos tiverem sido pipetados e estiverem a ser processados pelo kit de reagente de ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, os espécimes podem ser testados com o kit reconstituído associado até um máximo de 24 horas, **a não ser que:**
 - a. O calibrador ou resultados do controlo sejam inválidos.
 - b. O respetivo kit de reagente de ensaio do seja retirado do sistema.
 - c. O respetivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. O calibrador e cada tubo de controlo só podem ser usados uma única vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez podem dar origem a erros de processamento.

B. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó em algumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. Recomenda-se a utilização de luvas sem pó.

Controlo de qualidade

Um resultado de uma execução ou espécime pode ser invalidado por um operador se tiverem sido observadas dificuldades técnicas, do operador ou do instrumento durante a execução do ensaio e se estas estiverem documentadas. Neste caso, será necessário testar novamente os espécimes.

Calibração do ensaio

Para gerar resultados válidos, é necessário concluir uma calibração do ensaio. Um calibrador positivo único é executado em triplicado de cada vez que um kit de reagente é carregado no sistema Panthe. Depois de estabelecida, a calibração é válida durante um máximo de 24 horas. O software do Panther System alerta o operador quando uma calibração for necessária. O operador lê um coeficiente de calibração que se encontra na folha de códigos de barras do lote mestre fornecida com cada kit de reagente.

Durante o processamento, os critérios de aceitação do calibrador são automaticamente verificados pelo software do sistema Panther. Se menos do que duas réplicas do calibrador forem válidas, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras de uma execução invalidada devem ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

Controlos negativo e positivo

Para gerar resultados válidos, deve ser testado um conjunto de controlos de ensaio. Deve ser testada uma réplica do controlo negativo, uma do controlo positivo baixo e outra do controlo positivo alto sempre que um kit de reagente for carregado no sistema Panther. Depois de estabelecidos, os controlos são válidos durante um máximo de 24 horas. O software do Panther System alerta o operador quando os controlos forem necessários.

Durante o processamento, os critérios de aceitação dos controlos são automaticamente verificados pelo software do sistema Panther. Para gerar resultados válidos, o controlo negativo deve apresentar um resultado de “Não detetado” e os controlos positivos devem obter resultados dentro dos parâmetros predefinidos (alvo do LPC: $\sim 3 \text{ Log}_{10}$ cópias/ml, alvo do HPC: $\sim 5 \text{ Log}_{10}$ cópias/ml). Se algum dos controlos tiver um resultado inválido, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras de uma execução invalidada devem ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

Calibrador interno/controlo interno

Cada amostra contém um calibrador interno/controlo interno (IC). Durante o processamento, os critérios de aceitação do IC são automaticamente verificados pelo software do sistema Panther. Se um resultado de IC for inválido, o resultado da amostra é invalidado. É necessário repetir o teste de cada amostra com um resultado de IC inválido para obter um resultado válido. O software do Panther system foi concebido para verificar os processos com exatidão, quando os procedimentos são feitos de acordo com as instruções fornecidas neste folheto informativo e no *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System*.

Interpretação de resultados

Nota: Os resultados quantitativos do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foram avaliados utilizando plasma. O soro não pode ser utilizado para obter resultados quantitativos. Os resultados qualitativos foram avaliados com plasma e com soro.

O sistema Panther determina automaticamente a concentração de RNA do HIV-1 dos espécimes e controlos mediante a comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de RNA do HIV-1 são apresentadas em cópias/ml e \log_{10} cópias/ml. A interpretação de resultados é fornecida na Tabela 1. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx possui sistemas de amplificação e de deteção de alvo duplo, tendo como objetivo as regiões Pol e LTR de forma independente. O resultado apresentado pelo sistema será baseado no sistema primário, Pol, exceto se a região Pol não for amplificada. Nestes casos, o sistema irá apresentar o resultado do sistema secundário, LTR.

Se utilizar a diluição 1:3 ou 1:100 para espécimes diluídos, o sistema Panther calcula automaticamente a concentração de HIV-1 para o espécime não diluído, multiplicando a concentração diluída pelo fator de diluição, e as amostras diluídas são assinaladas como diluídas.

Nota: No caso de espécimes diluídos, os resultados indicados como “Não detetados” ou “<30 detetado” podem ser gerados por diluição de um espécime com uma concentração acima, mas próxima do LoD (limite da deteção) ou LLoQ (limite inferior de quantificação). Caso não se obtenha um resultado quantitativo, recomenda-se a colheita e teste de outro espécime não diluído.

O sistema Panther não fornece um resultado qualitativo (isto é, “Reativo” ou “Não reativo”) para fins de diagnóstico. O operador deve interpretar a concentração de RNA do HIV-1 apresentada convertendo-a num resultado qualitativo (Tabela 1). Os espécimes com resultados apresentados como “Não detetado” são não reativos para o RNA do HIV-1. Os espécimes com resultados apresentados como “<30 detetado” ou os espécimes com resultados dentro ou acima do intervalo linear indicam que foi detetado RNA do HIV-1 e que estes espécimes foram reativos para o RNA do HIV-1.

Tabela 1: Interpretação de resultados

Resultado apresentado do ensaio Aptima HIV-1 Quant Resultado Ensaio Dx		Concentração de RNA do HIV-1 Interpretação	Interpretação qualitativa do diagnóstico do utilizador ^c
Cópias/ml ^a	Valor Log ₁₀ ^b		
Não detetado	Não detetado	RNA do HIV-1 não detetado.	Não reativo para o RNA do HIV-1
< 30 detetado	< 1,47	Foi detetado RNA do HIV-1, mas num nível abaixo do limite inferior de quantificação (LLoQ)	Reativo para o RNA do HIV-1
30 a 10 000 000	1,47 a 7,00	A concentração de RNA do HIV-1 situa-se dentro do intervalo linear de 30 a 10 000 000 cópias/ml.	Reativo para o RNA do HIV-1
> 10 000 000	> 7,00	A concentração de RNA do HIV-1 é acima do limite superior de quantificação (ULoQ).	Reativo para o RNA do HIV-1
Inálido ^d	Inálido ^d	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.	Inálido ^d

^a O fator de conversão para cópias para Unidades internacionais (UI) para o 3.º Padrão Internacional para o RNA do HIV-1 (10/152) é de 0,35 cópias/UI.

^b O valor é truncado para duas casas decimais.

^c Não deve ser efetuada uma interpretação de diagnóstico a partir de um resultado “não reativo” para espécimes que tenham sido diluídos. Obtenha um espécime novo não diluído e repita o teste.

^d Os resultados inválidos são apresentados em letra azul.

Quando os resultados estiverem disponíveis no ecrã Resultados, é possível aceder ao valor de quantificação para cada alvo utilizando a funcionalidade de Relatório da curva da amostra no software do sistema Panther. Para visualizar os valores e as curvas de amplificação, selecione o ID da amostra no ecrã Resultados do software do sistema Panther. Em seguida, selecione o botão “Dados da curva”. Abre-se uma janela com o Relatório da curva da amostra, que inclui perfis de fluorescência e valores de quantificação para a amostra.

Nota: Os dados obtidos a partir do Relatório da curva da amostra são fornecidos apenas para fins informativos (por ex., resolução de problemas e verificação da curva). O resultado validado a ser comunicado para a amostra é fornecido pelo software do Panther System no ecrã Resultados e no relatório Resultados.

Nota: Consulte o Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System para obter instruções adicionais sobre o funcionamento do sistema Panther.

Os critérios de aceitação para cada um dos controlos do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx são descritos na Tabela 2.

Nota: O intervalo de recuperação apresentado abaixo varia com base no valor atribuído a cada lote específico. Consulte a concentração atribuída apresentada na Folha do código de barras do controlo fornecida com cada caixa de controlo.

Tabela 2: Critérios de aceitação para o intervalo de recuperação do Ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx

Componente	Intervalo de recuperação para execuções válidas
Controlo negativo	N/A
Controlo positivo baixo	+/- 0,5 log ₁₀ cópias/ml
Controlo positivo alto	+/- 0,5 log ₁₀ cópias/ml

Limitações

- A. A utilização deste ensaio está limitada a pessoal que tenha recebido formação relativa ao procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto informativo pode levar a resultados erróneos.
- B. A fiabilidade dos resultados depende da colheita, do transporte, da conservação e do processamento adequados dos espécimes.
- C. Este ensaio foi validado para utilização como um ensaio quantitativo apenas com plasma humano com EDTA e ACD.
- D. Este ensaio foi validado para utilização como um ensaio qualitativo com soro e plasma humano com EDTA e ACD.
- E. Apesar de ser raro, poderão ocorrer mutações em regiões altamente conservadas do genoma viral abrangido pelos "primers" e/ou sondas do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, que poderão resultar na subquantificação do vírus ou na falha de deteção do vírus.
- F. Este ensaio não foi validado para utilização em pacientes submetidos a terapias baseadas em vetores lentivirais, como a terapia com células CAR- T. A potencial sobreposição de regiões do genoma viral abrangidas pelos "primers" e/ou sondas no ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx pode resultar na amplificação de vetores lentivirais utilizados em terapias baseadas em vetores lentivirais.

Desempenho analítico

Limite de detecção (LoD) utilizando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1

O limite de detecção (Limit of detection, LoD) define-se como a concentração de RNA do HIV-1 que é detetada com uma probabilidade igual ou superior a 95%, de acordo com o documento EP17-A2 do CLSI (37). O LoD foi estabelecido através de testes de painéis que consistiram em diluições do 3.º Padrão Internacional da OMS para o HIV-1 (subtipo B, código NIBSC: 10/152) em plasma e soro EDTA negativos para o HIV-1. Foram processadas trinta réplicas de cada diluição em três sistemas Panther utilizando três lotes de reagentes, num total de 90 réplicas para cada diluição. De acordo com o documento EP17-A2 do CLSI, os LoD foram definidos utilizando os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada para o limite de detecção LoD previsto e são apresentados na Tabela 3. Através da análise Probit, o limite de detecção previsto de 95% para o LoD para o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx é de 12 cópias/ml (35 UI/ml) no plasma e 8,9 cópias/ml (25 UI/ml) no soro (0,35 cópias=1 UI).

Tabela 3: Limite de detecção do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1

Limite de detecção Previsto	Plasma		Soro	
	Concentração (cópias/ml)	Concentração (UI/ml)	Concentração (cópias/ml)	Concentração (UI/ml)
10%	1,2	3,3	0,8	2,2
20%	1,6	4,6	1,1	3,1
30%	2,0	5,7	1,4	4,0
40%	2,5	7,2	1,7	4,9
50%	3,1	8,8	2,1	5,9
60%	3,8	11	2,5	7,2
70%	4,8	14	3,1	8,9
80%	6,2	18	4,0	11
90%	9,0	26	5,8	17
95%	12,1	35	8,9	26

Limite de detecção em vários subtipos e grupos de HIV-1

Para o grupo M do HIV-1 (subtipos A, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) e os grupos N e O, foram criados seis painéis positivos e um painel negativo mediante adição de vírus HIV-1 de cultura ou de espécimes clínicos positivos a soro e plasma humano EDTA HIV-1 negativo (0 a 40 cópia/ml). Cada membro do painel foi testado em 30 réplicas com dois lotes de reagentes para um total de 60 réplicas por membro do painel. A atribuição da concentração para espécimes clínicos ou stocks de vírus de cultura foi determinada utilizando um ensaio de comparação. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos de 50% e 95%. De acordo com o documento EP17-A2 do CLSI (37), os LoD foram definidos utilizando os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada para o limite de detecção previsto definido como o LoD e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Limite de detecção em vários subtipos e grupos de HIV-1

Subtipo/Grupo	Limite de detecção previsto	Plasma	Soro
		Concentração (cópias/ml)	Concentração (cópias/ml)
A	50%	3,0	4,0
	95%	11,5	14,5
CRF01_AE	50%	1,5	4,5
	95%	4,5	15,7
CRF02_AG	50%	3,8	4,3
	95%	15,1	14,3
C	50%	2,0	4,1
	95%	9,8	16,7
D	50%	4,2	3,7
	95%	13,8	15,2
F	50%	2,4	4,9
	95%	8,9	15,0
G	50%	3,5	2,5
	95%	15,7	6,5
N	50%	1,4	2,1
	95%	6,1	5,9
O	50%	1,9	6,5
	95%	6,5	27,2

Intervalo linear

O intervalo linear do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foi estabelecido através de testes de painéis que consistiram na diluição do subtipo B do vírus do HIV-1 em cultura em plasma EDTA humano negativo para HIV-1, de acordo com o documento EP06-A do CLSI (38). A concentração dos painéis variou entre 1,30 e 7,30 \log_{10} cópias/ml. Os testes foram realizados em sete sistemas Panther com dois lotes de reagentes. Como se pode ver na Figura 6, o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx demonstrou linearidade em todo o intervalo testado.

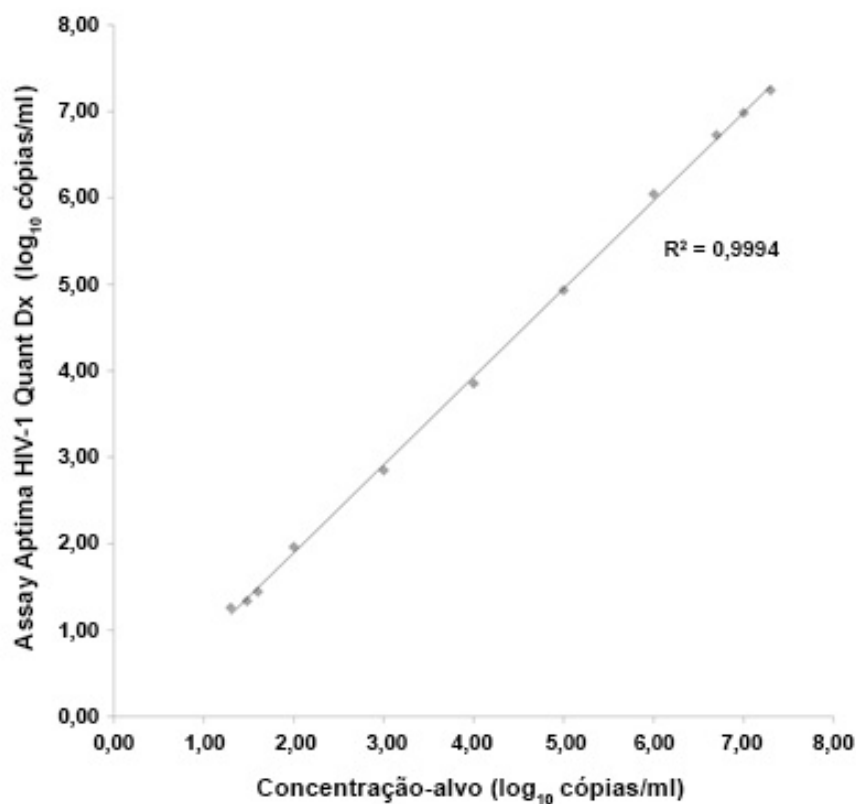


Figura 6. Linearidade do Ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx

Linearidade nos subtipos e grupos do HIV-1

A resposta linear do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx no grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) e nos grupos N e O foi confirmada por teste de painéis constituídos por transcrito de HIV-1 diluído em tampão em concentrações que variam de 2,00 a 6,70 \log_{10} cópias/ml. Os testes foram realizados em quatro sistemas Panther e seis execuções. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo testado (Figura 7).

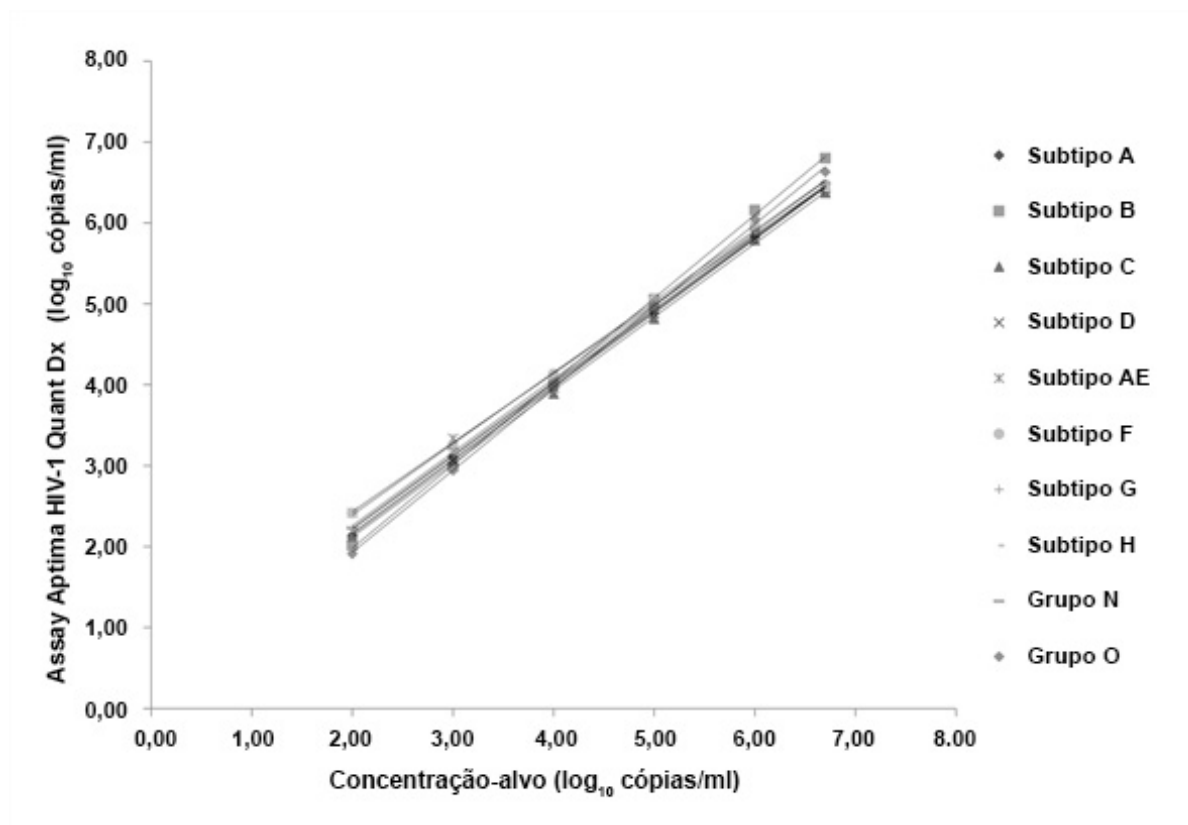


Figura 7. Linearidade em todo o grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) e grupos N e O

Determinação do limite inferior de quantificação usando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1

O limite inferior de quantificação (LLOQ) é definido como a concentração mais baixa na qual o RNA do HIV-1 é quantificado com fiabilidade dentro de um erro total (ET), de acordo com o documento EP17-A2 do CLSI (37). O ET foi calculado através do modelo Westgard ($ET = |\text{desvio sistemático}| + 2DP$). Para garantir a exatidão e a precisão das medições, o ET do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foi definido para 1 \log_{10} cópias/ml (ou seja, no LLOQ, a diferença entre duas medições superior a 1 \log_{10} cópias/ml é estatisticamente significativa).

O LLOQ foi estabelecido através de testes de painéis que consistiram em diluições do 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1 (subtipo B, código NIBSC: 10/152) em plasma EDTA humano negativo para o HIV-1. De acordo com o documento EP17-A2 do CLSI, os painéis foram testados com três lotes de reagentes em réplicas de 30 para cada lote de 23 execuções. Os resultados são apresentados na Tabela 5. O LLOQ mais elevado nos três lotes testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx usando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1 é de 15 cópias/ml (1,17 \log_{10} cópias/ml) (Tabela 6).

Tabela 5: Determinação de LLOQ do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1

Lote de reagente	Concentração-alvo (\log_{10} cópias/ml)	Aptima HIV-1 Quant Dx (\log_{10} cópias/ml)	DP (\log_{10} cópias/ml)	Desvio sistemático (\log_{10} cópias/ml)	ET calculado (\log_{10} cópias/ml)
1	1,15	1,05	0,37	0,10	0,84
	1,24	0,94	0,35	0,30	1,00
	1,42	1,37	0,33	0,05	0,71
	1,54	1,47	0,22	0,07	0,50
	1,94	1,98	0,13	0,04	0,30
	2,42	2,45	0,07	0,03	0,17
2	1,15	0,50	0,33	0,65	1,31
	1,24	0,80	0,44	0,45	1,33
	1,42	0,93	0,37	0,49	1,24
	1,54	1,17	0,31	0,38	0,99
	1,94	1,75	0,21	0,19	0,62
	2,42	2,28	0,21	0,14	0,55
3	1,15	0,88	0,41	0,26	1,09
	1,24	0,98	0,35	0,27	0,97
	1,42	1,15	0,34	0,27	0,96
	1,54	1,35	0,37	0,20	0,93
	1,94	1,84	0,17	0,11	0,44
	2,42	2,37	0,11	0,05	0,27

DP=desvio padrão ET=erro total.

Tabela 6: Resumo de LLoQ utilizando o 3.º padrão internacional da OMS para o HIV-1 (3 lotes de reagentes)

Lote de reagente	LLoQ (log ₁₀ cópias/ml)	LLoQ (cópias/ml)
1	0,94	8,7
2	1,17	15
3	0,98	9,5

Verificação do LLOQ em vários subtipos e grupos de HIV-1

O LLoQ em vários subtipos e grupos de HIV-1 foi verificado seguindo o documento EP17-A2 do CLSI (37). Foram fabricados painéis para cada grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) e os grupos N e O do HIV-1 mediante adição a plasma EDTA humano negativo para HIV-1 amostras clínicas infetadas naturalmente ou isolados clínicos. Os testes consistiram num total de 30 réplicas por membro do painel. Os dados na Tabela 7 mostram a concentração mais baixa para cada subtipo ou grupo em que o ET tenha sido inferior a 1 log₁₀ cópias/ml. O LLoQ mais elevado para todos os subtipos e grupos testados foi de 30 cópias/ml; este valor mais elevado foi, por isso, selecionado como o LLoQ para o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx (Tabela 7).

Tabela 7: Verificação do LLOQ por subtipo ou grupo de HIV-1

Painel	LLoQ (cópias/ml)
Subtipo A	30
Subtipo CRF01_AE	10
Subtipo CRF02_AG	30
Subtipo B	10
Subtipo C	30
Subtipo D	15
Subtipo F	15
Subtipo G	30
Grupo N	10
Grupo O	15

Precisão

Para avaliar a precisão do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, um painel produzido por adição de vírus HIV-1 subtipo B de cultura a plasma EDTA negativo para HIV-1 foi testado por três operadores utilizando três lotes de reagentes em três sistemas Panther durante 20 dias (Tabela 8). O painel era constituído por um membro do painel negativo para o HIV-1 e oito membros do painel positivo para o HIV-1. A atribuição da concentração para espécimes clínicos ou stocks de vírus de cultura foi determinada utilizando um ensaio de comparação.

Tabela 8: Precisão do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Número de réplicas válidas	Concentração média (log ₁₀ cópias/ml)	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre execuções		Intraexecuções		Total	
		DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
137	1,80	0,00	0,00	0,03	1,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	8,93	0,16	9,10
157	2,37	0,00	0,00	0,05	2,08	0,01	0,36	0,08	3,33	0,15	6,19	0,17	7,34
160	2,47 ^a	0,00	0,00	0,03	1,37	0,03	1,35	0,07	2,97	0,12	5,03	0,15	6,15
162	2,95	0,00	0,00	0,08	2,57	0,02	0,61	0,10	3,29	0,09	3,04	0,15	5,20
162	3,80	0,01	0,32	0,03	0,80	0,02	0,48	0,06	1,49	0,07	1,80	0,10	2,53
159	4,93	0,00	0,00	0,02	0,37	0,04	0,77	0,05	1,10	0,04	0,71	0,08	1,56
162	5,69	0,00	0,00	0,02	0,27	0,04	0,66	0,03	0,58	0,07	1,29	0,09	1,58
162	6,71	0,00	0,00	0,01	0,22	0,04	0,52	0,04	0,60	0,05	0,78	0,08	1,13

CV=coeficiente de variação, DP=desvio padrão.

^a Este membro do painel foi diluído 1:3 com diluente de espécimes e testado para avaliar a precisão da amostra diluída.

Nota: A variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade derivada desses fatores for muito pequena. Quando tal ocorre, DP=0 e CV=0%. O número total de réplicas testadas foi de 162 para cada painel; só foram analisadas réplicas com um valor numérico.

Substâncias endógenas e exógenas potencialmente interferentes

Foi avaliada a suscetibilidade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx à interferência por níveis elevados de substâncias endógenas e por fármacos frequentemente receitados a indivíduos infectados pelo HIV-1. Foram testadas amostras de plasma EDTA humano negativas para HIV-1 e amostras às quais foi adicionado HIV-1 a uma concentração de $3 \log_{10}$ cópias/ml de RNA do HIV-1.

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx na presença de albumina (90 mg/ml), hemoglobina (5 mg/ml), triglicéridos (30 mg/ml) ou bilirrubina não conjugada (0,2 mg/ml).

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 9 em concentrações pelo menos três vezes a $C_{m\acute{a}x}$ (plasma humano).

Tabela 9: Substâncias exógenas

Grupo de substâncias exógenas	Substâncias exógenas testadas
1	Lopinavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, mesilato de nelfinavir, darunavir, amprenavir, atazanavir
2	Nevirapina, efavirenz, rilpivirina, claritromicina, anfotericina B
3	Fumarato disoproxílico de tenofovir, dipivoxilo de adefovir, ribavirina, enfuvirtida, maraviroc, raltegravir, dolutegravir
4	Sulfato de abacavir, didanosina, zidovudina, lamivudina, estavudina, entecavir, telbivudina, emtricitabina
5	Cloridrato de paroxetina, fluoxetina, sertralina
6	Ganciclovir, valaciclovir, aciclovir, rifampina/rifampicina, etambutol
7	Ciprofloxacina, azitromicina, amoxicilina, cefalexina, ampicilina, trimetoprim
8	Cloridrato de valganciclovir, boceprevir, telaprevir, simeprevir, sofosbuvir
9	Interferão alfa-2b peguilado, interferão alfa-2a, interferão alfa-2b
10	Heparina, EDTA, citrato de sódio
11	Tipranavir
12	Isoniazida

Foram testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx os espécimes clínicos de plasma EDTA indicados na Tabela 10 de pacientes com níveis elevados de substâncias definidas ou de pacientes com as doenças indicadas com e sem a presença de 3 log₁₀ cópias de RNA do HIV-1. Não foi observada interferência no desempenho.

Tabela 10: Tipos de espécimes clínicos testados

Tipos de espécimes clínicos	
1	Fator reumatóide (FR)
2	Anticorpo antinuclear (ANA)
3	Anticorpos anti-Jo-1 (JO-1)
4	Lúpus eritematoso sistêmico (LES)
5	Artrite reumatóide (AR)
6	Esclerose múltipla (EM)
7	Hiperglobulinemia
8	Alanina-aminotransferase (ALT) elevada
9	Cirrose alcoólica (CA)
10	Mieloma múltiplo (MM)
11	Lipêmica (lípidos elevados)
12	Ictérica (bilirrubina elevada)
13	Hemolisada (hemoglobina elevada)
14	Albumina proteica elevada
15	Anticorpos anti-HCV
16	Anticorpos anti-HBV
17	Anticorpos anti-HIV-2

Desempenho com espécimes HIV-1 negativos

A especificidade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foi determinada utilizando 120 espécimes de plasma EDTA frescos e 510 congelados HIV-1 negativos. Não foi detectado RNA do HIV-1 nas 630 amostras (especificidade de 100%; CI de 95%: 99,4-100%) (Tabela 11).

Tabela 11: Especificidade em espécimes de plasma

	Plasma fresco	Plasma congelado	Todos
Réplicas válidas (n)	120	510	630
Não reativo	120	510	630
Especificidade (IC de 95%)	100% (97,0-100)	100% (99,3-100)	100% (99,4-100)

IC=intervalo de confiança

Contaminantes microbianos potencialmente interferentes

A potencial reatividade cruzada com agentes patogênicos (Tabela 12) foi avaliada no ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx na presença ou ausência de 3 log₁₀ cópias/ml de RNA do HIV-1 em plasma EDTA humano HIV-1 negativo. Não foi observada interferência no desempenho do ensaio na presença dos agentes patogênicos.

Tabela 12: Agentes patogênicos testados para a reatividade cruzada

Patogénico	Concentração
Vírus da hepatite A	100 000 PFU/ml ^a
Vírus de hepatite B	100 000 UI/ml ^b
Vírus da hepatite C	100 000 UI/ml
Vírus de hepatite G	100 000 cópias/ml
Vírus herpes simplex 1 (HSV-1)	100 000 PFU/ml
Vírus herpes simplex 2 (HSV-2)	75 000 PFU/ml
Vírus herpes 6 humano	100 000 cópias/ml
Vírus herpes 8 humano	42 000 PFU/ml
HIV-2	5 500 PFU/ml
Vírus linfotrófico de células T humanas (HTLV)	100 000 vp/ml ^c
Vírus do Nilo Ocidental	100 000 cópias/ml
Parvovírus B19	100 000 UI/ml
Citomegalovírus	100 000 cópias/ml
Vírus Epstein-Barr	100 000 cópias/ml
Adenovírus tipo 5	100 000 PFU/ml
Vírus Dengue	100 000 cópias/ml
Vírus influenza A	100 000 PFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.000.000 CFU/ml ^d
<i>Propionibacterium acnes</i>	1.000.000 CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000.000 CFU/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.000.000 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	300 000 IFU/ml ^e
<i>Candida albicans</i>	1.000.000 CFU/ml

^a PFU/ml = Unidades formadoras de placa por ml.^b UI/ml = Unidades internacionais por ml.^c vp/ml = Partículas virais por ml.^d CFU/ml = Unidades formadoras de colónias por ml.^e IFU/ml = Unidades formadoras de inclusão por ml.

Repetibilidade de espécimes clínicos

Foram testadas dez amostras clínicas de plasma EDTA e dez de soro em três réplicas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx. A concentração média e o desvio padrão (DP) são mostrados na Tabela 13 e na Tabela 14.

Tabela 13: Repetibilidade de espécimes clínicos de plasma

Espécime	Plasma	
	Concentração média (log ₁₀ cópias/ml)	DP
1	2,57	0,06
2	3,20	0,03
3	3,24	0,06
4	3,97	0,02
5	4,20	0,05
6	4,85	0,01
7	5,17	0,04
8	5,51	0,06
9	5,84	0,02
10	6,64	0,00

DP = desvio padrão

Tabela 14: Repetibilidade de espécimes clínicos de soro

Espécime	Soro	
	Concentração média (log ₁₀ cópias/ml)	DP
1	1,68	0,10
2	2,44	0,19
3	3,08	0,03
4	3,37	0,06
5	4,05	0,04
6	4,55	0,06
7	5,06	0,04
8	5,49	0,05
9	6,28	0,02
10	6,79	0,04

DP = desvio padrão

Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes

Para avaliar a diluição de amostras, foi testado em triplicado um painel não diluído e diluído (1:3 ou 1:100 em diluente de espécimes) constituído por 11 amostras com concentrações que abrangeram o intervalo linear do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e com duas amostras acima do ULoQ do ensaio (Tabela 15).

Tabela 15: Diluição de amostras

Diluição	Concentração não diluída média (log ₁₀ cópias/ml)	Concentração média apresentada ^a (log ₁₀ cópias/ml)	Diferença
1:3	2,57	2,72	0,15
	3,20	3,33	0,13
	3,24	3,55	0,30
	3,97	4,05	0,07
	4,20	4,24	0,04
	4,85	4,81	-0,04
	5,17	5,08	-0,08
	5,51	5,32	-0,19
	5,84	5,94	0,10
	6,64	6,66	0,02
	2,46 ^b	2,19	-0,27
1:100	>7,00 (7,16 ^c)	7,48	0,32
1:100	>7,00 (7,40 ^c) ^b	7,39	-0,01

^a A concentração apresentada é o valor indicado pelo sistema Panther após a aplicação do fator de diluição.

^b Espécime ao qual foi adicionado um analito.

^c Todos os resultados > 7,00 log₁₀ cópias/ml foram calculados utilizando análise adicional.

Contaminação por transferência

Para estabelecer que o sistema Panther minimiza o risco de resultados positivos falsos causados por contaminação por transferência, foi feito um estudo analítico de múltiplas execuções utilizando painéis com vírus adicionado em dois sistemas Panther. A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras às quais foi adicionado HIV-1 em título elevado (7 log₁₀ cópias/ml) dispersas entre amostras HIV-1 negativas num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de cinco execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0% (n = 469).

Painel de seroconversão

Foram testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx dezanove conjuntos de painéis de seroconversão do HIV-1, constituídos por 204 amostras. A detecção do RNA do HIV-1 foi comparada com a detecção com testes de antígeno p24 e com testes de anticorpos anti-HIV-1/2. O número de dias até ao primeiro resultado reativo utilizando testes do antígeno p24, testes de anticorpos anti-HIV 1/2 e o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx é indicado na Tabela 16. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx detetou RNA do HIV-1, uma média de 5,58 e 11,16 dias antes do antígeno p24 e dos testes ao anticorpo anti-HIV 1/2.

Tabela 16: Resumo de dados do painel de seroconversão

ID do painel	Número de membros do painel testados	Número de membros do painel reativos			Dias até ao primeiro resultado reativo			Diferença em dias até ao primeiro resultado reativo (com base na data da colheita)	
		Aptima HIV-1 Quant Dx	Antígeno p24 do HIV	Anticorpos anti-HIV 1/2	Aptima HIV-1 Quant Dx	Antígeno p24 do HIV	Anticorpos anti-HIV 1/2	Dias antes da detecção pelo teste de antígeno p24 do HIV	Dias antes da detecção pelo teste de anticorpos anti-HIV 1/2
6248	7	3	2	1	14	18	25	4	11
6243	10	6	3	2	18	25	32	7	14
6247	9	4	4	1	21	21	30	0	9
9016	10	3	2	0	27	30	34 ^a	3	7
9018	11	5	3	2	21	28	32	7	11
9020	22	5	4	1	83	87	97	4	14
9021	17	5	4	1	43	47	57	4	14
9022	9	3	2	1	23	25	32	2	9
9023	22	5	3	0	71	78	85 ^a	7	14
9030	16	5	3	1	40	47	54	7	14
9034	13	4	3	1	41	46	53	5	12
9089	6	5	3	2	7	16	20	9	13
12008	13	7	4	4	21	28	33	7	12
PRB962	6	4	2	0	7	14	17 ^a	7	10
PRB963	7	4	2	0	9	17	21 ^a	8	12
PRB966	10	5	3	2	35	44	48	9	13
PRB974 ^b	4	3	2	1	7	9	16	2	9
PRB975 ^b	5	3	1	0	7	14	14 ^a	7	7
PRB978 ^b	7	3	1	0	26	33	33 ^a	7	7
Total	204	82	51	20			Média Mediana	5,58 7	11,16 12

^a Todas as colheitas neste painel foram não reativas para os anticorpos anti-HIV 1/2. O último dia da colheita foi utilizado como "Dias até ao primeiro resultado reativo".

O teste de anticorpos anti-HIV-1/2 foi realizado com o teste Abbott Anti-HIV 1/2, exceto:

^b Os painéis PRB974, PRB975 e PRB978 que foram testados com o teste Siemens Anti-HIV 1/2.

O teste do antígeno p24 do HIV-1 foi realizado com o teste Coulter HIV-1 p24 Ag, exceto:

^b Os painéis PRB974, PRB975 e PRB978 que foram testados com o teste BioMérieux p24 Ag.

Estudo de equivalência em soro e plasma

Para avaliar a equivalência, foram testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx conjuntos correspondentes de soro e plasma (25 HIV-1 positivos e 25 HIV-1 negativos) e 40 amostras às quais foi adicionado HIV-1 de cultura (50-1 000 000 cópias/ml em plasma e soro HIV-1 negativos). A concordância negativa foi de 100,0% (CI de 95%: 97,0%–100,0%). A concordância positiva foi de 98,4% (CI de 95%: 95,4%–99,5%).

Estudos de reprodutibilidade

Reprodutibilidade em amostras de plasma

A reprodutibilidade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx em amostras de plasma foi avaliada em 3 centros externos. Dois operadores realizaram os testes em cada centro. Cada operador realizou 2 execuções por dia durante 3 dias, utilizando 3 lotes de reagentes durante os testes. Cada execução teve 3 réplicas de cada membro do painel.

A reprodutibilidade foi testada utilizando membros do painel compostos por plasma EDTA HIV-1 negativo. Os membros do painel positivo foram criados mediante adição ao plasma negativo de vírus de cultura (subtipo B do HIV-1) em concentrações que abrangeram o intervalo linear do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx.

A Tabela 17 mostra a reprodutibilidade e a precisão dos resultados do ensaio para cada membro do painel positivo entre centros, entre operadores, entre lotes, entre dias, entre execuções, dentro das execuções e globais. Quando foram incluídas apenas amostras com resultados acima do limite inferior de quantificação (LLOQ) (as amostras com resultados abaixo do LLOQ foram excluídas), o DP total foi $\leq 0,2 \log_{10}$ cópias/ml para todos os membros do painel. Quando foram incluídas todas as amostras com RNA do HIV-1 detetável, os valores do DP total permaneceram inalterados, exceto o membro do painel 1, que teve um DP total de $0,3 \log_{10}$ cópias/ml.

Para todos os membros do painel positivo para HIV-1, os valores de concordância foram de 100%. Para o membro do painel negativo para HIV-1, foram testadas 108 réplicas e não foi detetado RNA do HIV-1 em nenhuma das 108 réplicas (concordância negativa=100%, CI de 95% da pontuação: 96,6% a 100%).

Tabela 17: Reprodutibilidade e precisão do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay no Panther System em membros do painel de plasma positivo

Painel	N ^a	Média Log ₁₀ Cópias/ml	Entre centros		Entre operadores		Entre lotes		Entre dias		Entre execuções		Intraexecuções		Total	
			DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
1	107	1,71 ^b	0,05	2,66	0,07	4,10	0,07	4,09	0,00	0,00	0,17	9,90	0,25	14,62	0,32	18,77
	85 ^c	1,84	0,07	3,51	0,00	0,00	0,02	0,97	0,00	0,00	0,06	3,07	0,17	8,98	0,19	10,17
2	108	2,94	0,08	2,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	1,49	0,00	0,00	0,11	3,69	0,14	4,83
3	108	3,84	0,07	1,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,95	0,04	0,98	0,06	1,62	0,11	2,75
4	108	4,94	0,08	1,52	0,00	0,00	0,03	0,57	0,03	0,50	0,05	1,01	0,06	1,18	0,11	2,30
5	108	5,71	0,07	1,26	0,00	0,00	0,01	0,22	0,05	0,85	0,04	0,77	0,07	1,23	0,12	2,11
6	108 ^d	6,71	0,05	0,80	0,00	0,00	0,02	0,32	0,03	0,43	0,07	1,03	0,06	0,85	0,11	1,65

CV=coeficiente de variação, DP=desvio padrão

^a Número de resultados de teste válidos com RNA do HIV-1 detetável.^b Inclui 22 réplicas relatadas como <1,47 log₁₀ cópias/ml. Esta amostra teve um valor atribuído de 1,176 log₁₀ cópias/ml.^c Número de resultados válidos dentro do intervalo linear do ensaio.^d Inclui uma réplica relatada como >7 log₁₀ cópias/ml. Esta amostra teve um valor atribuído de 7,18 log₁₀ cópias/ml.**Nota:** A variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa. Isto pode ocorrer se a variabilidade devido a esses fatores for muito pequena (inferior a 0,01). Nesses casos, o DP e o CV são mostrados como 0.

Reprodutibilidade em amostras de soro

A reprodutibilidade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx em amostras de soro foi avaliada em 3 centros externos. Dois operadores realizaram os testes em cada centro. Cada operador realizou 1 execução por dia durante 5 dias, utilizando 1 lote de reagentes durante os testes. Cada execução teve 3 réplicas de cada membro do painel.

A reprodutibilidade foi testada utilizando membros do painel preparados com soro HIV-1 negativo. Foram criados dois membros do painel positivo mediante adição de matriz de soro negativa com concentrações de vírus de cultura (subtipo B do HIV-1) de 3X-5X LoD e 10X LoD.

A Tabela 18 mostra a reprodutibilidade e a precisão dos resultados do ensaio para cada membro do painel positivo entre centros, entre operadores, entre dias, entre execuções, dentro das execuções e globais.

Para todos os membros do painel positivo para HIV-1, os valores de concordância foram de 100%. Para o membro do painel negativo para HIV-1, foram testadas 90 réplicas e não foi detectado RNA do HIV-1 em 89/90 réplicas (concordância negativa=98,9%, CI de 95% da pontuação: 94,0% a 99,8%).

Tabela 18: Reprodutibilidade e precisão do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay no Panther System em membros do painel de soro positivo

Painel	N	Média de Log ₁₀ cópias/ ml	Entre centros		Entre operadores		Entre dias		Entre execuções		Intraexecuções		Total	
			DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
1	90	1,34	0,07	5,41	0,00	0,00	0,04	2,63	0,00	0,00	0,22	16,26	0,23	17,34
2	89	1,95	0,05	2,41	0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	9,67	0,20	10,01

CV = coeficiente de variação log-normal, DP = desvio padrão (log₁₀ cópias/ml).

Nota: A variabilidade derivada de alguns fatores pode ser numericamente negativa. Tal ocorreu quando a variabilidade devido a esses fatores foi muito pequena. Nesses casos, o DP e o CV são mostrados como 0,00.

Desempenho clínico

Validação da quantificação da carga viral

A quantificação do RNA do HIV-1 foi comparada entre o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e um ensaio de comparação. O estudo incluiu testes de amostras clínicas de plasma EDTA (fresco ou congelado armazenado) e amostras artificiais (vírus de cultura adicionado a amostras clínicas de plasma negativo). Cada amostra foi testada em duplicado com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e o ensaio de comparação. Os testes com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx foram realizados em 3 centros externos, tendo cada centro utilizado 3 lotes de kits de reagentes; os testes com o ensaio de comparação foram realizados num laboratório externo.

Foram testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e com o ensaio de comparação 628 conjuntos de amostras correspondentes (dentro do intervalo linear de ambos os ensaios) criados a partir de 484 pacientes registados e 144 amostras artificiais. A Figura 8 apresenta os resultados da análise de regressão de Deming ($y = -0,03 + 1,04x$).

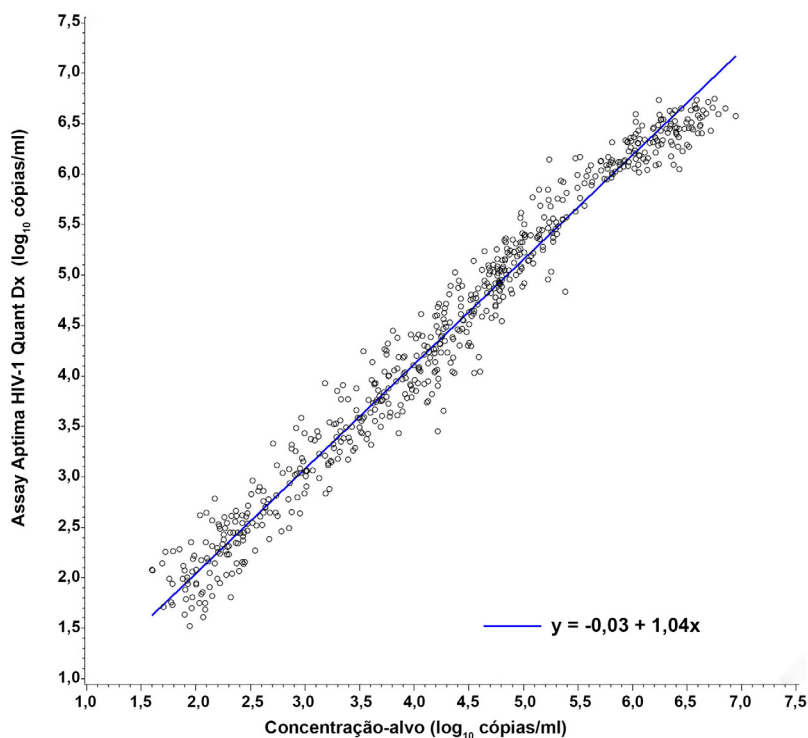


Figura 8. Correlação entre o Ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx e o Ensaio de comparação

Estudos de especificidade clínica

Especificidade clínica em amostras HIV-1 negativas

Foram testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx amostras de plasma EDTA HIV-1 negativo anteriormente congeladas de doadores de sangue total voluntários. Os testes foram realizados com 3 lotes de kits de reagentes em 3 centros externos. A especificidade clínica foi calculada como a percentagem de amostras HIV-1 negativas com resultados de “não detetado”. Foram testadas seiscentas (600) amostras de plasma HIV-1 negativas e o RNA do HIV-1 não foi detetado em nenhuma das 600 amostras. A especificidade em amostras de plasma negativas foi de 100% (600/600, CI de 95% da pontuação: 99,4% a 100%).

Especificidade clínica em população de baixo risco

Foram testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx amostras anteriormente congeladas obtidas de doadores de sangue pela primeira vez e de não doadores de sangue com baixo risco de infecção por HIV-1. Os testes foram realizados com 1 lote de kit de reagentes num centro externo. A especificidade clínica foi calculada comparando os resultados do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx com os resultados de ensaios de NAT.

A Tabela 19 mostra a especificidade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx numa população de baixo risco por tipo de amostra.

Tabela 19: Especificidade clínica do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay numa população de baixo risco por tipo de amostra

Tipo de amostra	n	PV	FP	NV	FN	Especificidade % (CI de 95%) ^a
Todos	911	4	3	902	2	99,7 (99,0, 99,9)
Os	304	1	2 ^b	300	1	99,3 (97,6, 99,9)
Plasma	607	3	1	602	1	99,8 (99,1, 100)

CI = intervalo de confiança, NF = negativo falso, PF = positivo falso, NV = negativo verdadeiro, PV = positivo verdadeiro.

^a CI de Clopper-Pearson.

^b 1 de 2 amostras de soro com resultados positivos falsos foi positiva, quando testadas utilizando um imunoensaio de combinação antígeno/anticorpo HIV-1/HIV-2 de 4.^a geração.

Estudos de sensibilidade clínica

Sensibilidade clínica em amostras HIV-1 positivas

Foram testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx amostras HIV-1 positivas anteriormente congeladas. Os testes foram realizados com 2 lotes de kits de reagentes em 3 centros, incluindo 2 centros externos.

A Tabela 20 mostra a sensibilidade do ensaio Aptima HIV 1 Quant Dx em amostras positivas por tipo de amostra.

Tabela 20: Sensibilidade clínica do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay em amostras HIV-1 positivas por tipo de amostra

Tipo de amostra	n	PV	FN	Sensibilidade % (CI de 95%) ^a
Todos	1572	1565	7	99,6 (99,1, 99,8)
Os	524	520	4	99,2 (98,1, 99,8)
Plasma	1048	1045	3	99,7 (99,2, 99,9)

CI = intervalo de confiança, NF = negativo falso, PV = positivo verdadeiro.

^a CI de Clopper-Pearson.

Sensibilidade clínica em população de alto risco

Foram testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx amostras colhidas prospectivamente de indivíduos com risco elevado de infecção por HIV-1. Os testes foram realizados com 1 lote de kit de reagentes em 3 centros, incluindo 2 centros externos. A sensibilidade clínica foi calculada comparando os resultados do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx com os resultados de ensaios de NAT.

Das 498 amostras avaliáveis, 332 eram amostras de plasma e 166 eram amostras de soro. A sensibilidade clínica foi de 100% (1/1, CI de 95%: 20,7% a 100%) nas amostras de soro. Não foi possível avaliar a sensibilidade nas amostras de plasma, pois não foram observadas amostras com resultados dos ensaios positivos verdadeiros ou negativos falsos.

Positividade em amostras serodiscordantes

Foram testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx amostras serodiscordantes anteriormente congeladas (ou seja, repetidamente reativas num imunoensaio de HIV inicial e indeterminadas ou negativas num imunoensaio suplementar) obtidas de doadores de sangue e não doadores de sangue. Das 473 amostras avaliáveis, 76 foram selecionadas a partir de painel de seroconversão. Os testes foram realizados com 2 lotes de kits de reagentes num centro interno. A positividade foi calculada para as amostras serodiscordantes testadas com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx.

A Tabela 21 mostra a positividade do ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx em amostras serodiscordantes por grupo de amostras, tipo de teste suplementar de HIV e resultado do teste suplementar de HIV.

Tabela 21: Positividade do Aptima HIV-1 Quant Dx em amostras serodiscordantes

Tipo de teste suplementar	Resultado do teste suplementar	Positividade % (n/N) CI de 95% ^a		
		Grupo do painel sem seroconversão		Grupo do painel com seroconversão
		3. ^a ger.	4. ^a ger.	4. ^a ger.
Imunocromatográfico HIV-1/2	Negativo	N/A	0,0 (0/11) 0,0-25,9	100 (6/6) 61,0-100
Imunocromatográfico HIV-1/2	Indeterminado	N/A	100 (1/1) 20,7-100	100 (1/1) 20,7-100
Rápido HIV-1/2	Negativo	N/A	0,0 (0/11) 0,0-25,9	100 (24/24) 86,2-100
Rápido HIV-1/2	Indeterminado	N/A	0,0 (0/2) 0,0-65,8	N/A
WB ou IFA HIV-1	Negativo	0,4 (1/239) 0,1-2,3	100 (4/4) 51,0-100	100 (35/35) 90,1-100
WB ou IFA HIV-1	Indeterminado	0,0 (0/128) 0,0-2,9	100 (1/1) 20,7-100	100 (10/10) 72,2-100

3.^a ger. = imunoensaio de terceira geração, 4.^a ger. = imunoensaio de quarta geração, CI = intervalo de confiança, IFA = ensaio de imunofluorescência indireta, N/D = não disponível, WB = Western blot.

^a CI da pontuação.

Bibliografia

1. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daugey, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, e L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **220**:868–871.
2. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, e R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497–500.
3. Gallo R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Streeter, M. Kaplan, D. F. Haynas, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, e P. D. Markham. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500–503.
4. Piot, P., F. A. Plummer, F. S. Mhalu, J.-L. Lamboray, J. Chin, e J. M. Mann. 1988. AIDS: An international perspective. *Science* **239**:573–579.
5. Sarngadharan, J. G., M. Popovic, L. Broch, J. Scupbach, e R. C. Gallo. 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**:506–508.
6. Gallo, D., J. S. Kimpton, e P. J. Dailey. 1987. Comparative studies on use of fresh and frozen peripheral blood lymphocyte specimens for isolation of human immunodeficiency virus and effects of cell lysis on isolation efficiency. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1291–1294.
7. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. Rey, M. O. Santos-Ferraira, A. G. Laurent, C. Daugey, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, e L. Montagnier. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343–346.
8. DeCock, K.M., Jaffe, H.W., Curran, J.W. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS*, 2012.
9. Gaines, H., M. A. von Sydow, e L.V. von Stedingk. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995–999.
10. Tindall, B., e D. A. Cooper. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1–14.
11. Daar, E. S., T. Moudgil, R. D. Meyer, e D. D. Ho. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:961–964.
12. Clark, S. J., M. S. Saag, e W. D. Decker. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Medicine* **324**:954–960.
13. Albert J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom, e E. M. Fenyo. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* **4**:107–112.
14. Horsburgh, C. R. Jr., C. Y. Ou, J. Jason, S. D. Holmberg, I. M. Longini Jr., C. Schable, K. H. Mayer, A. R. Lifson, G. Schochetman, J. W. Ward, et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **16**:637–640.
15. Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, e A. S. Fauci. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305–308. Erratum in: *Science* 1989 **245**, preceding 694.
16. Schnittman, S. M., J. J. Greenhouse, M. C. Psallidopoulos, M. Baseler, N. P. Salzman, A. S. Fauci, e H.C. Lane. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Intern. Med.* **113**:438–443.
17. Pantaleo, G., C. Graziosi, e A. S. Fauci. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *N. Engl. J. Med.* **328**:327–335.
18. Piatak, M. Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw, e J. D. Lifson. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**:1749–1754.
19. Fauci, A. S., S. M. Schnittman, G. Poli, S. Koenig, e G. Pantaleo. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Intern. Med.* **114**:678–693.
20. Coffin, J. M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483–489.
21. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, e M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123–126.
22. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117–122.
23. O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhart, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, e J. D. Hamilton. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N. Engl. J. Med.* **334**:426–431.
24. Welles, S. L., J. B. Jackson, B. Yen-Lieberman, L. Demeter, A. J. Japour, L. M. Smeaton, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, P. A. Reichelderfer, D. D. Richman, R. Reichman, M. Fischl, R. Dolin, R. W. Coombs, J. O. Kahn, C. McLaren, J. Todd, S. Kwok, e C. S. Crumpacker. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *J. Infect. Dis.* **174**:696–703.

25. **Coombs, R. W., S. L. Welles, C. Hooper, P. S. Reichelderfer, R. T. D'Aquila, A. J. Japour, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, S. Kwok, J. Todd, J. B. Jackson, V. DeGruttola, C. S. Crumpacker, e J. Kahn.** 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *J. Infect. Dis.* **174**:704–712.
26. **Hammer, S., C. Crumpacker, R. D'Aquila, B. Jackson, J. Lathey, D. Livnat, e P. Reichelderfer.** 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2557–2564.
27. **Schochetman, G., e J. R. George,** ed. 1994. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide To Technical, Medical, Social, Legal and Management Issues*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
28. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, e S. Kwok.** 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**:292–300.
29. **Dewar, R. L., H. C. Highbarger, M. D. Sarmiento, J. A. Todd, M. B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J. A. Kovacs, N. P. Salzman, H. C. Lane, e M. S. Urdea.** 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J. Infect. Dis.* **170**:1172–1179.
30. **van Gemen, B., T. Kievits, R. Schukkink, D. van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, e P. Lens.** 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods* **43**:177–187.
31. **Gill, P. e Ghaemi, A.** 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**(3):224–43.
32. **Hill, C.** 2001. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Reve. Mol. Diagn.* **1**(4): 445–455.
33. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2005. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.* CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
34. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
35. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL);* current version.
36. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
37. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition.* CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.* CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Informações de contacto e histórico de revisões



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA



Hologic BV
Da Vinci laan 5
1930 Zaventem
Belgium

Promotor australiano
Hologic (Australia &
New Zealand) Pty Ltd.
Macquarie Park NSW 2113

Para obter o endereço de e-mail e o número de telefone do suporte técnico e do apoio ao cliente específicos de cada país, visite www.hologic.com/support.

Incidentes graves que ocorram em relação ao dispositivo na União Europeia devem ser comunicados ao fabricante e à autoridade competente do Estado Membro onde o utilizador e/ou paciente reside.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion e os logótipos associados são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Hologic, Inc. e/ou das respetivas subsidiárias nos Estados Unidos e/ou noutros países.

Armored RNA é uma marca comercial da Asuragen, Inc.

Quaisquer outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo pertencem aos respetivos proprietários.

Este produto pode estar abrangido por uma ou várias patentes nos EUA, as quais podem ser consultadas em www.hologic.com/patents.

© 2020–2025 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-28214-601 Rev. 002

2025-10

Histórico de revisões	Data	Descrição
AW-28214-601 Rev. 001	Abril de 2025	• Publicação inicial para cumprir os requisitos do IVDR.
AW-28214-601 Rev. 002	Outubro de 2025	• Esta versão está alinhada com AW-28214-001 Rev. 002 & Rev. 003 (This version aligns with AW-28214-001 Rev. 002 & Rev. 003).