

## Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Apenas para exportação pelos EUA.

<b>Informações gerais</b> .....	<b>2</b>
Utilização pretendida .....	2
Resumo e explicação do teste .....	2
Princípios do procedimento .....	3
Advertências e precauções .....	4
Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes .....	7
Colheita e conservação de espécimes .....	8
Amostras dentro do Panther System .....	12
Transporte de espécimes .....	12
<b>Panther System</b> .....	<b>13</b>
Reagentes e materiais fornecidos .....	13
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente .....	15
Materiais opcionais .....	16
Procedimento de teste no Panther System .....	16
Notas sobre o procedimento .....	21
<b>Controlo de qualidade</b> .....	<b>22</b>
Calibração do ensaio .....	22
Controlos negativo e positivo .....	22
Calibrador interno/controlo interno .....	22
<b>Interpretação de resultados</b> .....	<b>23</b>
<b>Limitações</b> .....	<b>24</b>
<b>Desempenho</b> .....	<b>25</b>
O limite de detecção (LOD) Usando o padrão internacional 3.º HIV-1 WHO .....	25
Limite de detecção em vários subtipos e grupos de HIV-1 .....	26
Intervalo linear .....	27
Linearidade nos subtipos e grupos do HIV-1 .....	28
Limite inferior de quantificação Usando o padrão internacional 3.º HIV-1 WHO .....	29
Verificação do LLOQ em vários subtipos e grupos de HIV-1 .....	30
Precisão .....	31
Substâncias potencialmente interferentes .....	32
Especificidade .....	34
Especificidade analítica .....	35
Repetibilidade de espécimes clínicos .....	36
Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes .....	37
Correlação de métodos .....	38
Concordância do diagnóstico .....	38
Contaminação por transferência .....	39
Painel de seroconversão .....	39
Estudo de equivalência em soro e plasma .....	40
<b>Bibliografia</b> .....	<b>41</b>

## **Informações gerais**

### **Utilização pretendida**

O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay 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 sistema Panther™ totalmente automatizado. Destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HIV-1, como confirmação da infecção pelo HIV-1 e como auxiliar no controlo clínico de doentes infectados pelo HIV-1.

O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay pode ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HIV-1, incluindo infecção aguda ou primária. A presença de RNA do HIV-1 no plasma ou soro de doentes sem anticorpos contra o HIV-1 é indicativa de infecção aguda ou primária pelo HIV-1. O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay pode ser utilizado como um teste suplementar para espécimes com resultados reactivos repetidos com imunoensaios de HIV aprovados. Se o espécime for reactivo no Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, a infecção pelo HIV-1 é confirmada.

O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay pode ainda ser utilizado em conjunto com o quadro clínico e outros marcadores laboratoriais para obter o prognóstico da doença em indivíduos afectados pelo HIV-1. O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay pode também ser utilizado como auxiliar na monitorização do efeito do tratamento com antirretrovirais, através da medição de alterações na concentração plasmática de RNA do HIV-1.

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

Este ensaio não se destina a ser utilizado no rastreio de dadores de sangue ou de plasma.

### **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 infectados ou por transmissão mãe-filho (8). No prazo de 3 a 6 semanas da exposição ao HIV, os indivíduos infectados 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 infectados, 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 infectados 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 infecções 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 infectadas e substituição das células CD4+, o que tem como resultado níveis relativamente estáveis de viremia plasmática e das células CD4+ (20-22).

\*Nota: também podem ser utilizados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx espécimes de Dried blood spot (DBS). Para obter uma descrição completa da utilização prevista, bem como informações relativas a espécimes de DBS, consulte o suplemento acerca de Dried Blood Spot do folheto informativo do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay (AW-17780).

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 directa do RNA viral no plasma utilizando tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos ou de amplificação do sinal (26-30).

Actualmente, a detecção da infecção pelo HIV-1 baseia-se principalmente no teste serológico de anticorpos e/ou de antígeno p24 através de imunoensaio. Os Centros de Controlo de Doenças (EUA) recomendam a utilização de um teste de anticorpos e de RNA para diagnóstico de infecções agudas do HIV (31). Apesar de a sensibilidade do anticorpo anti-HIV-1 e do antígeno p24 ter melhorado, ainda existe um período de janela entre a altura da infecção e a altura da detecção de marcadores serológicos. Este período de janela depende da sensibilidade do teste serológico utilizado. Uma estimativa (32) sugere que a 4.<sup>a</sup> geração de ensaios de antígeno p24/anticorpos pode detectar infecções quando a concentração de RNA do HIV-1 atingir 14 000 cópias/ml. O limite de detecção do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay é significativamente inferior a 14 000 cópias/ml e pode detectar a presença de HIV-1 mais cedo do que os imunoensaios do HIV.

As técnicas moleculares como a amplificação mediada pela transcrição (TMA) têm sido amplamente usadas para amplificar os ácidos nucleicos (31). A TMA usa uma captura alvo específica e amplificação isotérmica para detectar ácidos nucleicos em patógenos infecciosos múltiplos (32).

O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, através da TMA, utiliza primários múltiplos e longos que têm como objectivo diversas regiões do genoma HIV-1 para compensar a taxa elevada de mutação e as potenciais mutações múltiplas na região alvo.

## Princípios do procedimento

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

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 sobre micropartículas magnéticas que são separadas do espécime num campo magnético. Os passos de lavagem removem componentes estranhos do tubo de reacção.


A amplificação do alvo ocorre através da TMA, que é um método de amplificação do ácido nucleico mediado pela transcrição que utiliza duas enzimas, a transcriptase reversa MMLV (vírus de leucemia murínica de Moloney) e polimerase T7 RNA. A transcriptase reversa é usada para criar um cópia de DNA (com uma sequência promotora para a polimerase do RNA T7) da sequência-alvo. A polimerase do RNA T7 produz várias cópias do produto de amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA. O Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utiliza o método TMA para amplificar duas regiões do RNA do HIV-1 (Pol e LTR). A amplificação destas regiões específicas é conseguida utilizando “primers” específicos que foram concebidos para amplificar os grupos M, N e O do HIV-1. O design do “primer” e a abordagem de alvo duplo asseguram a detecção e quantificação exactas do HIV-1.

A detecção é conseguida utilizando sondas fluorescentes de ácidos nucleicos de cadeia simples que estão presentes durante a amplificação do alvo e que se hibridizam especificamente com o produto da amplificação em tempo real. Cada sonda fluorescente tem um fluoróforo e um agente de extinção. Quando a sonda fluorescente não é hibridizada com o produto da amplificação, o agente de extinção fica em estreita proximidade com o fluoróforo e suprime a fluorescência. Quando a sonda fluorescente se liga ao produto de 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 sonda fluorescente se hibridiza com o produto de amplificação, é gerado um sinal de fluorescência mais elevado. O tempo que demora até o sinal fluorescente atingir um limiar especificado é proporcional à concentração inicial de HIV-1. Cada reacção tem um calibrador interno/controlo interno (internal control, IC) que controla as variações do processamento, da amplificação e da detecção de espécimes. A concentração de uma amostra é determinada pelo Panther System Software utilizando os sinais do HIV-1 e do IC para cada reacção e comparando-os com as informações da calibração.

### Advertências e precauções

- A. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- B. Para reduzir o risco de resultados inválidos, leia atentamente todo o folheto informativo e o *Panther System Operator's Manual* (Manual de instruções do Panther System) antes de executar este ensaio.

### Relacionadas com o laboratório

-  C. **PRECAUÇÃO:** 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 reactivo 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 (35-37).
- D. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e no manuseamento de materiais infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfecte imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- E. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- F. Empregue todas as precauções laboratoriais de rotina. Não pipete com a boca. Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho designadas. Use luvas sem pó descartáveis, protecção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes de um kit. Lave bem as mãos depois de manusear os espécimes e os reagentes do kit.
- G. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).
- H. Elimine todos os materiais que tenham estado em contacto com espécimes e reagentes de acordo com os regulamentos europeus, nacionais e locais (35-38). Limpe e desinfecte minuciosamente todas as superfícies de trabalho.

- I. 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 eliminadas com água corrente em abundância. Estas precauções são recomendadas para evitar a acumulação de depósitos em canos metálicos onde se poderiam desenvolver condições explosivas.
- J. Boas práticas padronizadas para os laboratórios moleculares incluem a monitorização ambiental. Para monitorizar o ambiente de um laboratório, sugere-se o seguinte procedimento.
  1. Obtenha um cotonete e use com o Tubo Aptima Specimen Aliquot Tube (SAT).
  2. Identifique adequadamente cada SAT.
  3. Encha cada SAT com 1 ml de diluente de espécimes Aptima.
  4. Para colher amostras de superfície, humedeça 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 o cotonete 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**

- K. Os espécimes podem ser infecciosos. Empregue as Precauções Universais (35-37) quando executar este ensaio. Devem ser estabelecidos métodos de manuseamento e eliminação adequados de acordo com os regulamentos locais (38). Este procedimento só deve ser executado por pessoal devidamente qualificado na utilização do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e no manuseamento de materiais infecciosos.
- L. Mantenha condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime em condições de transporte além das recomendadas não foi avaliada.
- M. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desapertar 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 elas entrarem em contacto com o espécime.

**Relacionadas com o ensaio**

- N. Os resultados quantitativos do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay foram avaliados com plasma. O soro não pode ser utilizado para resultados quantitativos. Os resultados qualitativos foram avaliados com plasma e com soro.
- O. Não utilize o kit de reagentes, o calibrador nem os controlos após o prazo de validade.
- P. Não permuta, 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 diferentes números de lote.
- Q. Evite a contaminação microbiana ou com ribonuclease dos reagentes.
- R. Tape e conserve todos os reagentes do ensaio às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afectado pela utilização de reagentes conservados de forma incorrecta. Consulte as secções *Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes* e *Procedimento de teste no Panther System* para obter mais informações.
- S. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos do ensaio sem instruções específicas para tal. Não adicione reagentes ou fluidos aos respectivos recipientes. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- T. Alguns reagentes deste kit possuem símbolos de risco e segurança nos rótulos.

**Nota:** A informação sobre a Comunicação do Risco contempla as classificações das Folhas de Dados de Segurança (SDS). Para obter informações sobre a comunicação de risco específicas da sua região, consulte as respetivas SDS na Biblioteca de Folha de Dados de Segurança em [www.hologicds.com](http://www.hologicds.com).


	<p><b>HIV VL Kit Controls</b>  <b>Azoteto de sódio 0.2%</b>                  Human Serum 95-100%</p>
	<p><b>Atenção</b>                  H312 - Nocivo em contacto com a pele                  H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros                  P273 - Evitar a libertação para o ambiente                  P280 - Usar protecção ocular/protecção facial</p>

## Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes

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

Reagente	Conservação de produtos por abrir	Kit aberto (reconstituído)	
		Conservação	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 <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup>
Reagente de captura do alvo qHIV-1	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias <sup>a</sup>
qHIV-1 NC CONTROL – (controlo negativo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 20 horas
qHIV-1 LPC CONTROL + (controlo positivo baixo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 20 horas
qHIV-1 HPC CONTROL + (controlo positivo alto)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 20 horas
qHIV-1 PCAL (calibrador positivo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 20 horas

<sup>a</sup> Quando os reagentes são removidos do Panther System, deverão ser imediatamente devolvidos às respectivas 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. A estabilidade dos reagentes conservados dentro do Panther System é de 72 horas. Os reagentes podem ser carregados no Panther System até 5 vezes. O Panther System regista cada uma das vezes que os reagentes são carregados.
- D. Depois de descongelar o calibrador, a solução tem de 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 conservação e a preparação para utilização.

## Colheita e conservação de espécimes

**Nota:** Manuseie todos os espécimes como se contivessem agentes potencialmente infecciosos. Use as Precauções Universais.

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

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

Podem ser utilizados espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou de plástico:

Para medições quantitativas:

- Tubos com anticoagulantes EDTA ou ácido citrato dextrose (ACD) ou
- Tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT).

Para determinação qualitativa:

- Tubos com anticoagulantes EDTA ou ACD; ou
- PPT; ou
- Tubos de soro; ou
- Tubos de separação de soro (Serum Separator Tubes, SST).

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 tem que 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 o soro pode ser testado no Panther System, num tubo primário, ou transferido para um tubo secundário, como, por exemplo, o Tubo de Alíquotas de Espécime Aptima. 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 forem testados imediatamente, o plasma e o soro podem ser conservados de acordo com as especificações a seguir descritas. Se 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 que o resultado seja afectado. Não congele os espécimes em EDTA, ACD nem em tubos de colheita de soro primários.

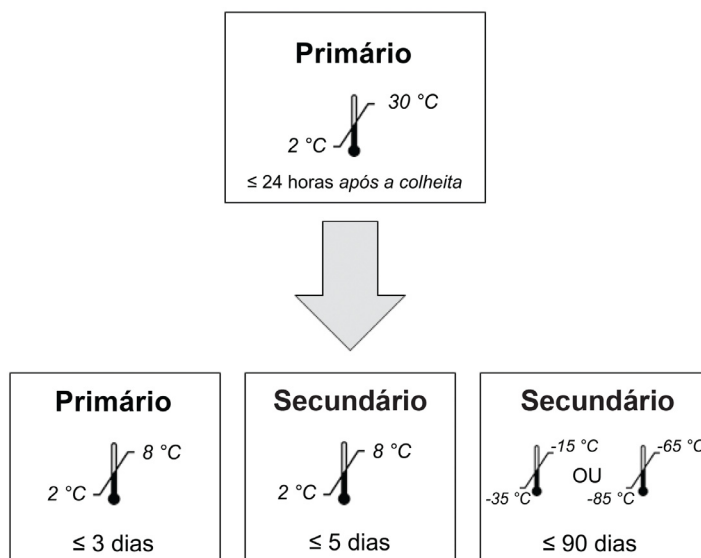


## B. Condições de conservação de espécimes

## 1. Espécimes de plasma com EDTA e ACD

Durante um período de até 24 horas após a colheita do espécime, os tubos primários com plasma centrifugado podem ser conservados a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C (figura 1, caixa superior). Após 24 horas, o plasma pode ser conservado por um período de tempo 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 a -20 °C ou -70 °C durante até 90 dias.

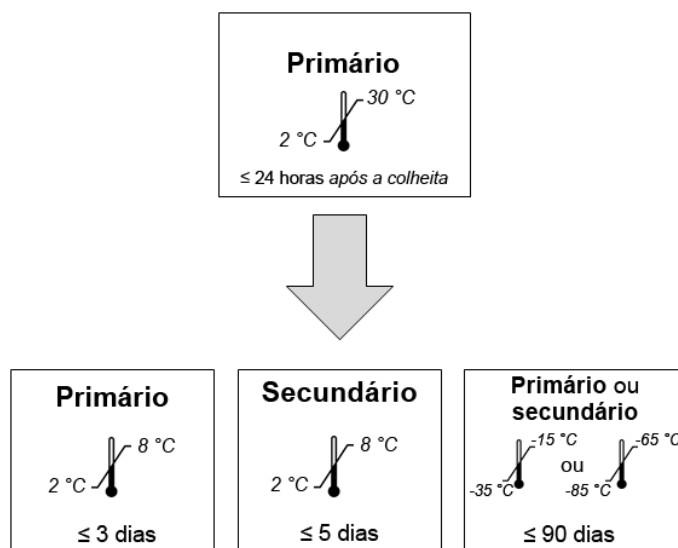


**Figura 1. Condições de armazenamento dos Tubos EDTA/ACD**

2. Espécimes de PPT

Durante um período de até 24 horas após a colheita do espécime, os PPT com plasma centrifugado podem ser conservados a uma temperatura 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 a -20 °C ou -70 °C durante até 90 dias.

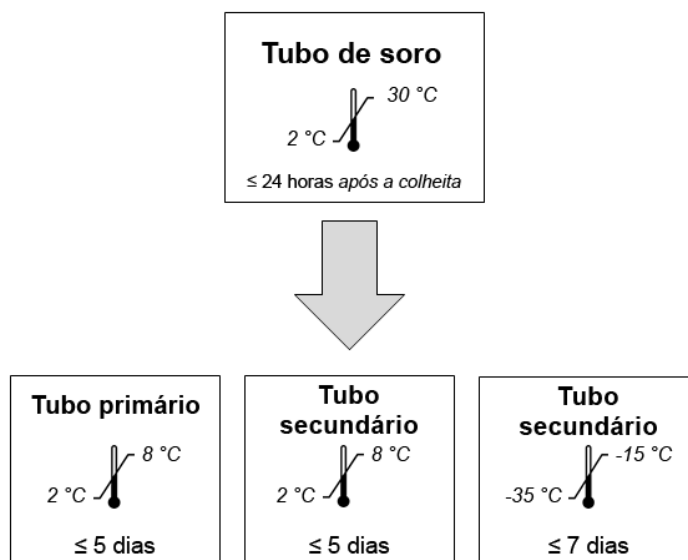


**Figura 2. Condições de conservação dos PPT**

### 3. Espécimes no tubo de soro

Durante um período de até 24 horas após a colheita do espécime, os tubos de soro com soro centrifugado podem ser conservados a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C (figura 3, caixa superior). Após 24 horas, o soro pode ser conservado por um período de tempo 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 7 dias.

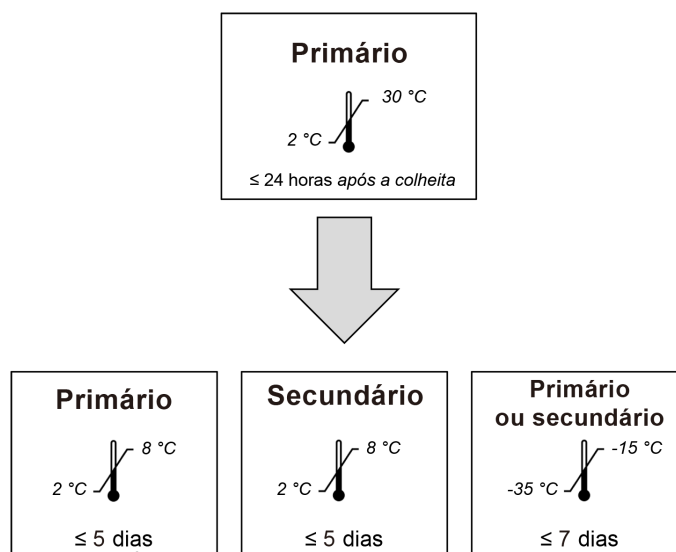


**Figura 3. Condições de conservação dos tubos de soro**

### 4. Espécimes em SST

Durante um período de até 24 horas após a colheita do espécime, os SST com soro centrifugado podem ser conservados a uma temperatura 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 ou SST a -20 °C durante um máximo de 7 dias.



**Figura 4. Condições de armazenamento dos SST**

### C. Diluição de espécimes de plasma

Um espécime de plasma pode ser diluído no SAT ou tubo secundário para teste no Panther System. Consulte as secções *Procedimento de teste no Panther System*, passo E.6 abaixo para obter mais informações.

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

⚠ A diluição dos espécimes de plasma só pode ser usado para resultados quantitativos. Não dilua amostras de plasma para resultados de diagnóstico.

### Amostras dentro do Panther System

As amostras podem ficar destapadas no Panther System por um período total de até 8 horas. As amostras podem ser retiradas do Panther System e testadas desde que o tempo total no instrumento não exceda as 8 horas antes da pipetagem da amostra pelo Panther System.

### Transporte de espécimes

Mantenha as condições de conservação de amostras descritas na secção *Colheita e conservação de espécimes*.

**Nota:** Os espécimes têm de ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais, internacionais e regionais em vigor.

## Panther System

Os reagentes do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay para o Panther System estão indicados abaixo. Os Símbolos de Identificação do Reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

### Reagentes e materiais fornecidos

**Nota:** Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Kit de Aptima HIV-1 Quant Dx Assay**, 100 testes, código de produto PRD-03000 (1 caixa de ensaio, 1 kit de calibrador e 1 kit de controlos)

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

#### Caixa do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)

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

**Aptima HIV-1 Quant Dx Kit do Calibrador** (código de produto PRD-03001)  
(conservar a uma temperatura de -15 °C a -35 °C após a receção)

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

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

Símbolo	Componente	Quantidade
NC	<b>Controlo negativo qHIV-1</b> <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	<b>Controlo positivo baixo qHIV-1</b> <i>Armored RNA (RNA blindado) 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	<b>Controlo positivo alto qHIV-1</b> <i>Armored RNA (RNA blindado) 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
	<b>Etiqueta de código de barras do controlo</b>	—

**Materiais necessários, mas disponíveis separadamente**

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

Material	Código de Produto
Panther System	—
Kit de execução Panther para ensaios em tempo real (apenas para ensaios em tempo real)	PRD-03455 (5000 testes)
<i>Kit de fluidos do Aptima Assay (também conhecido como kit de Fluidos universal) contém solução de lavagem Aptima, tampão Aptima para fluido de desactivação e reagente de óleo Aptima</i>	303014 (1000 testes)
<i>Unidades Multitubos (Multi-Tube Units, MTU)</i>	104772-02
<i>Kit do saco de resíduos Panther</i>	902731
<i>Tampa do recipiente de resíduos Panther</i>	504405
Ou, Kit de execução do sistema Panther <i>(ao realizar ensaios TMA diferidos em paralelo com ensaios TMA em tempo real) contém MTU, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, detecção automática e fluidos de ensaio</i>	303096 (5000 testes)
Pontas, condutoras de 1000 µl, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Luvas sem pó descartáveis	—
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas de substituição para reagentes	
<i>Frascos de reconstituição do reagente de amplificação, enzimático e promotor</i>	CL0041 (100 tampas)
<i>Frasco de TCR</i>	CL0040 (100 tampas)
Coberturas de bancada laboratorial revestidas de plástico	—
Toalhetes que não larguem pêlos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubo de colheita primário (ACD, EDTA, PPT, SST, Soro):	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Centrifuga	—
Misturador vortexe	—

## 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	—
<i>Tubos Aptima Specimen Aliquot (SATs) (100 conjuntos)</i>	503762
Tampa de tubo de transporte (100 conjuntos)	504415
<i>tampa para SAT</i>	
Diluyente de espécimes Aptima	PRD-03003
Kit Diluyente de Amostra Aptima	PRD-03478
<i>contém diluyente de espécime, 100 SATs e 100 tampas</i>	
Pipetas de transferência	—
Painéis disponíveis no mercado, por exemplo:	—
<i>HIV-1 do Controlo de Qualidade de Diagnóstico Molecular (QCMD) ou painel de pesquisa da carga viral HIV do College of American Pathologists (CAP) ou Painéis SeraCare ACCURUN HIV</i>	
Zaragatoas com ponta de algodão	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—

## Procedimento de teste no Panther System

**Nota:** Consulte o *Panther System Operator's Manual (Manual de instruções do Panther 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 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxágue com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada onde serão preparados os reagentes e as amostras com capas limpas e absorventes para bancadas de laboratórios com forro 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 atingir 15 °C a 30 °C antes do processamento da seguinte forma:

1. Retire 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 no 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.

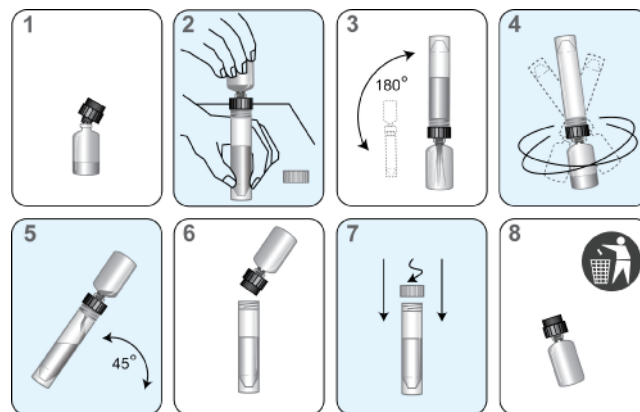
1. Para preparar o reagente de captura do alvo (target capture reagent, TCR), proceda da seguinte forma:
  - a. Retire o TCR da conservação (2 °C a 8 °C). Verifique o número de lote no frasco de TCR para se certificar de que corresponde ao número de lote da folha do código de barras do lote mestre.
  - 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: Retire o TCR da conservação (2 °C a 8 °C) e agite de imediato 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. Retire os reagentes liofilizados e as soluções de reconstituição correspondentes da conservação (2 °C a 8 °C). Emparelhe cada solução de reconstituição com o respectivo 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 Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal 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 (p. ex., 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. Retire cuidadosamente o colar de reconstituição e o frasco de vidro (figura 5, Passo 6).
- e. Volte a colocar a tampa da garrafa. Grave as iniciais do operador e a data da reconstituição na etiqueta (figura 5, Passo 7).
- f. Elimine o colar 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 no Panther System.



**Figura 5. Processo de reconstituição de reagentes**

#### D. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos

1. Retire 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 suporte. Evite criar espuma excessiva quando inverter os reagentes.
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 conservação de espécimes na página 8.
2. Certifique-se de que os espécimes congelados são totalmente descongelados. Agite no vortexe os espécimes descongelados durante 3 a 5 segundos para misturar totalmente.
3. Deixe os espécimes atingir uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento. Consulte a secção *Amostras dentro do Panther System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.
4. Certifique-se de que cada tubo de colheita primária contém até 1200 µl de espécime ou de que cada SAT contém, pelo menos, 700 µl de espécime. Consulte a tabela fornecida em *Colheita de espécimes* na página 8 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.6 abaixo para obter mais informações.
5. Imediatamente antes de carregar os espécimes num suporte de amostras, centrifugue cada espécime de 1000 a 3000 g durante 10 minutos. Não retire as tampas. A existência de bolhas no tubo pode comprometer a deteção de nível do Panther System.

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

6. Dilua um espécime de plasma a 1:3 num SAT ou a 1:100 num tubo secundário.  
Um espécime de plasma pode ser diluído num tubo secundário para teste no Panther System.

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

**Nota:** Se um espécime for diluído, tem de 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 no Panther System (consulte o *Panther System Operator's Manual* [Manual de instruções do Panther System] para obter mais informações). O software comunicará automaticamente o resultado do produto não diluído por aplicação do factor 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.

Espécimes diluídos 1:100 podem ser testados usando a opção 1:100 num sistema Panther (ver *Manual do Operador do Sistema Panther* para obter mais informações). O software irá automaticamente comunicar um resultado limpo ao aplicar o factor de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

**Nota:** Nos espécimes diluídos com concentrações não diluídas superiores ao ULOQ (limite superior de quantificação), os resultados serão apresentados com uma notação científica.

## F. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções no *Panther System Operator's Manual* (Manual de instruções do Panther System) e na secção *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 suporte de amostras. 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 suporte de amostras.
  - c. Repita os passos 2.a e 2.b para cada amostra restante.
  - d. Depois de as amostras terem sido carregadas no suporte de amostras, retire e elimine a tampa de cada um dos tubos 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. Quando a última tampa tiver sido removida, carregue o suporte de amostras na 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 2.a a 2.f para o suporte de amostras seguinte.

## Notas sobre o procedimento

### A. Calibrador e controlos

1. O calibrador positivo qHIV-1, o controlo positivo baixo qHIV-1, o controlo positivo elevado qHIV-1 e os tubos de controlo negativo qHIV-1 podem ser carregados em qualquer posição no Suporte de amostras e em qualquer Compartimento de amostras no sistema Panther. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
  - a. O calibrador e os controlos estão actualmente a ser processados pelo sistema.
  - b. Os resultados válidos para os controlos e calibrador são registados no sistema.
2. Quando o calibrador e os tubos de controlo forem pipetados e estiverem a processar para o kit de reagente de ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx, os espécimes pode ser testados com o kit associado e reconstituído até 24 horas **salvo se**:
  - a. O calibrador ou resultados do controlo forem inválidos.
  - b. O respectivo kit de reagente de ensaio seja retirado do sistema;
  - c. Respectivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. O calibrador e cada tubo de controlo for usado mais do que uma vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez puderem levar a erros de processamento.

### B. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada 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 estas estiverem documentadas. Neste caso, será necessário testar novamente os espécimes.

### **Calibração do ensaio**

Para gerar resultados válidos, é necessário realizar uma calibração do ensaio. Um calibrador positivo único é executado em triplicado de cada vez que um kit reagente é carregado no sistema Panther. Depois de estabelecida, a calibração é válida até 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 Panther System. Se menos do que duas réplicas do calibrador forem válidas, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras numa execução invalidada têm de ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

### **Controlos negativo e positivo**

Para gerar resultados válidos, é necessário testar um conjunto de controlo do ensaio. Uma réplica do controlo negativo, de controlo positivo baixo e de controlo positivo elevado deve ser testada sempre que um kit reagente for carregado no sistema Panther. Depois de estabelecida, os controlos são válidos até 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 Panther System. Para gerar resultados válidos, o controlo negativo deve gerar um resultado de "Não detectado" e os controlos positivos devem gerar resultados com parâmetros pré-definidos. Se algum dos controlos tiver um resultado inválido, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras numa execução invalidada têm de 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 Panther System. Se um resultado IC é 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 sistema Panther é concebido para verificar com precisão os processos quando os procedimentos são efectuados seguindo as instruções fornecidas no folheto informativo e no *Manual do Operador do Sistema Panther*.

## Interpretação de resultados

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

O Panther System determina automaticamente a concentração de RNA do HIV-1 para espécimes e controlos mediante comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de RNA do HIV-1 são apresentadas em cópias/ml e  $\log_{10}$  de cópias/ml. A interpretação de resultados é fornecida em tabela 1. 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 factor de diluição, e as amostras diluídas são assinaladas como diluídas.

**Nota:** Nos espécimes diluídos, os resultados indicados como “Não Detectado” ou “< 30 detectado” podem ser gerados pela diluição de um espécime com uma concentração superior, mas próxima do LOD (limite de detecção) ou do LLOQ (limite inferior de quantificação). Caso não se obtenha um resultado quantitativo, recomenda-se a colheita e teste de outro espécime não diluído.

O Panther System não fornece um resultado qualitativo (isto é, “Reactivo” ou “Não reactivo”) para fins de diagnóstico. O operador tem de interpretar a concentração de RNA do HIV-1 apresentada convertendo-a num resultado qualitativo (tabela 1). Os espécimes com resultados listados como “Não detectado” são não reactivos para o RNA do HIV-1. Os espécimes com resultados listados como “< 30 detectado” ou espécimes com resultados listados dentro do intervalo linear indicam que foi detectado RNA do HIV-1 e que estes espécimes foram reactivos para o RNA do HIV-1.

Tabela 1: Interpretação de resultados

Resultado apresentado do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay		Interpretação da concentração do RNA do HIV-1	Interpretação qualitativa do diagnóstico do utilizador <sup>c</sup>
Cópias/ml <sup>a</sup>	Valor <sup>b</sup> $\log_{10}$		
Não detectado	Não detectado	RNA do HIV-1 não detectado.	Não reactivo para RNA do HIV-1
Detectado < 30 <sup>e</sup>	< 1,47	HIV-1 RNA é detectado, mas a um nível abaixo de LLOQ.	Reactivo para 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.	Reactivo para RNA do HIV-1
> 10 000 000	> 7,00	A concentração do RNA do HIV-1 está acima do limite superior de quantificação (ULOQ).	Reactivo para RNA do HIV-1
Inválida <sup>d</sup>	Inválida <sup>d</sup>	Houve um erro na produção do resultado. O espécime deverá ser novamente testado.	Inválido

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

<sup>b</sup> O valor b é truncado para dois lugares decimais.

<sup>c</sup> Uma interpretação de diagnóstico pode ser feita a partir de espécimes de soro ou plasma que não tenham sido diluídas.

<sup>d</sup> Os resultados inválidos são apresentados em letra azul.

<sup>e</sup> O valor mais baixo reportável pelo software é 30 cópias/ml. O LoD mais elevado do ensaio é 17,5 cópias/ml para o subtipo G. Para saber os valores de LoD de todos os subtipos, consulte a Tabela 3. O LoD obtido utilizando o 3.º Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS) (subtipo B) para o RNA do HIV-1 é 12,1 cópias/ml (consulte a Tabela 2).

**Limitações**

- A. A utilização deste ensaio está limitada a pessoal que tenha recebido formação no procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto pode levar a resultados erróneos.
- B. A fiabilidade dos resultados depende da colheita, transporte, conservação e processamento adequados.
- C. Este ensaio foi validado para utilização como um ensaio quantitativo apenas com plasma humano.
- D. Este ensaio foi validado para utilização como um ensaio qualitativo com plasma e soro humanos.
- E. Apesar de ser raro, poderão ocorrer mutações em regiões altamente conservadas do genoma viral abrangido pelos “primers”/ou sondas no Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, que poderão resultar na subquantificação do vírus ou na falha de detecção do vírus.



## Desempenho

### O limite de detecção (LOD) Usando o padrão internacional 3.º HIV-1 WHO

O limite de detecção (Limit of Detection, LOD) é definido como a concentração de RNA do HIV-1 que é detectada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2 (39). O LOD foi determinado por teste de painéis que consistiam em diluições segundo o 3.º Padrão Internacional da OMS para o HIV-1 (subtipo B, código NIBSC: 10/152) em plasma HIV-1-negativo. Foram executadas trinta réplicas de cada diluição em três Panther System utilizando três lotes de reagentes para um total de 90 réplicas para cada diluição. Segundo a norma CLSI EP17-A2, os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada para o limite de detecção previsto são definidos como LOD e são mostrados na tabela 2. Através da análise Probit, o LOD do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay é 12 cópias/ml (35 UI/ml; 0,35 cópias = 1 UI).

Tabela 2: Limite de detecção do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay utilizando a o 3.º Padrão Internacional da OMS para o HIV-1

Limite de detecção previsto	Concentração (cópias/ml)
10%	1,2
20%	1,6
30%	2,0
40%	2,5
50%	3,1
60%	3,8
70%	4,8
80%	6,2
90%	9,0
95%	12,1

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

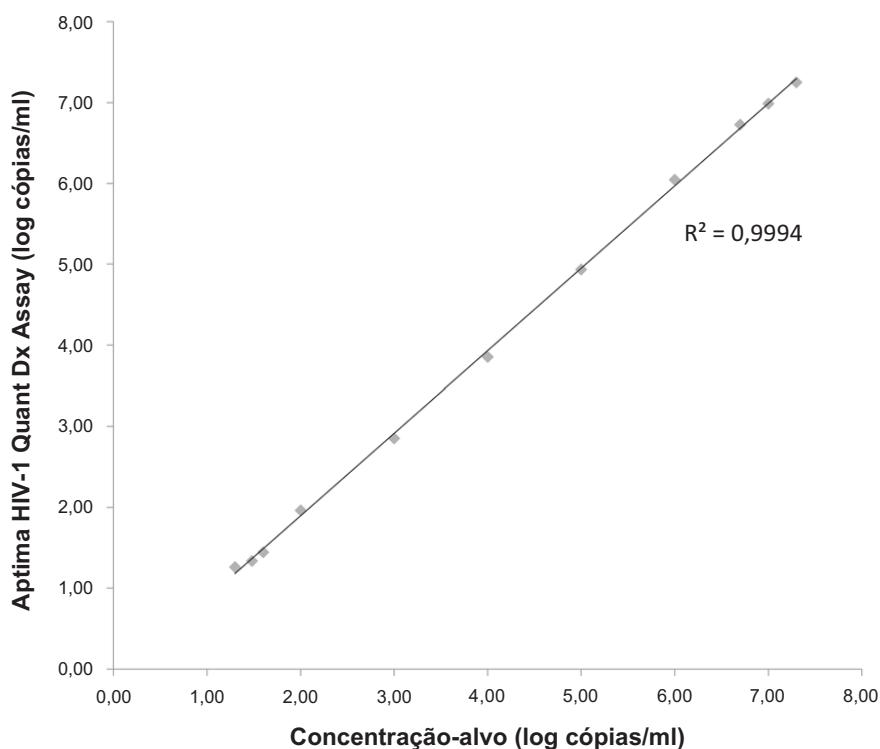
Para o grupo M do HIV-1 (subtipos A, C, D, F, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG) e grupos N e O, foram criados sete painéis mediante adição de vírus HIV-1 de cultura ou de espécimes clínicas positivas a plasma humano HIV-1-negativo (0 a 40 cópias/ml). Cada membro do painel foi testado em 30 réplicas com dois lotes de reagentes para um total de 60 réplicas por membro do painel. A atribuição da concentração para espécimes clínicas ou stocks de vírus de cultura foi determinada utilizando um ensaio de comparação. Foi realizada a análise Probit para gerar limites de detecção previstos de 50% e 95%. Segundo a norma CLSI EP17-A2 (39), os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada para o limite de detecção previsto são definidos como LOD e são mostrados na tabela 3.

*Tabela 3: Limite de detecção em vários subtipos e grupos de HIV-1*

Subtipo/Grupo	Limite de detecção previsto	Concentração (cópias/ml)
<b>A</b>	50%	3,0
	95%	12,3
<b>CRF01_AE</b>	50%	1,8
	95%	6,2
<b>CRF02_AG</b>	50%	3,4
	95%	15,4
<b>C</b>	50%	2,0
	95%	10,7
<b>D</b>	50%	3,7
	95%	14,0
<b>F</b>	50%	2,1
	95%	8,3
<b>G</b>	50%	3,1
	95%	17,5
<b>N</b>	50%	1,2
	95%	7,8
<b>O</b>	50%	1,8
	95%	8,0

### Intervalo linear

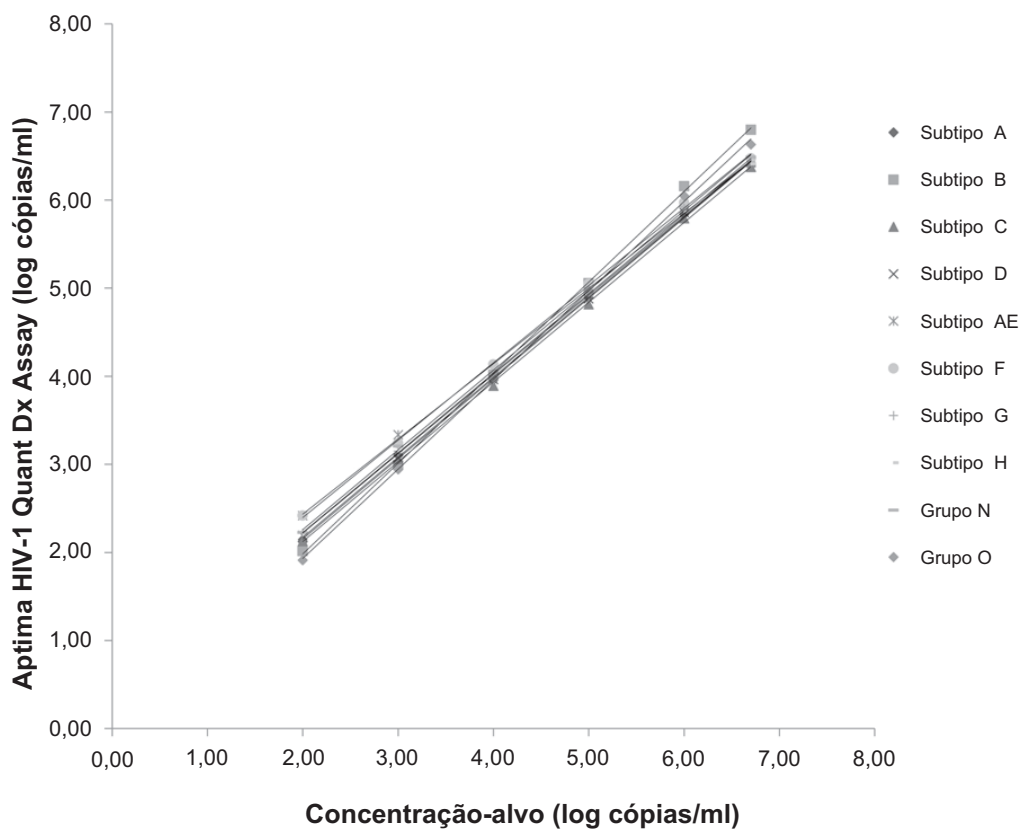
O intervalo linear do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay foi estabelecido por painéis de teste que consistiram em vírus HIV-1 subtipo B de cultura diluído em plasma humano HIV-1-negativo de acordo com a norma CLSI EP06-A (40). A concentração dos painéis variou de 1,30 a 7,30 log cópias/ml. Os testes foram realizados em sete Panther Systems com dois lotes de reagentes de Aptima HIV-1 Quant Dx Assay. Tal como se mostra na figura 6, o Aptima Quant Dx Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado.



**Figura 6. Linearidade do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay**

### Linearidade nos subtipos e grupos do HIV-1

A resposta linear do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay no grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, CRF01\_AE) e 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 cópias/ml. Os testes foram realizados em quatro Panther Systems 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**

### Limite inferior de quantificação Usando o padrão internacional 3.º HIV-1 WHO

O limite inferior de quantificação (LLOQ) é definido como a concentração mais baixa em que o RNA do HIV-1 é quantificado com fiabilidade dentro de um erro total (ET), de acordo com a norma CLSI EP17-A2 (39). O ET foi calculado através do modelo Westgard ( $ET = |\text{desvio sistemático}| + 2 DP$ ). Para garantir a exactidão e a precisão das medições, o ET do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay foi definido em 1 log cópias/ml (ou seja, no LLOQ, a diferença entre duas medições de mais de 1 log cópias/ml é estatisticamente significativa).

O LLOQ foi determinado por teste de painéis que consistiam em diluições segundo o 3.º Padrão Internacional da OMS para o HIV-1 (subtipo B, código NIBSC: 10/152) em plasma HIV-1-negativo. De acordo com a norma CLSI EP17-A2, os painéis foram testados com três lotes de reagentes em réplicas de 30 para cada lote de 23 execuções. Os resultados são mostrados na tabela 4. O LLOQ mais elevado para os três lotes testados com o ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx usando o padrão internacional 3.º HIV-1 WHO é de 15 cópias/ml (1,17 cópias de registo/ml) (tabela 5).

Tabela 4: 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 cópias/ml)	Aptima HIV-1 Quant Dx (log cópias/ml)	DP (log cópias/ml)	Desvio sistemático  (log cópias/ml)	ET calculado (log 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

Tabela 5: Resumo de LLOQ utilizando o 3.º Padrão Internacional da OMS para o HIV-1 (3 lotes de reagentes)

Lote de reagente	LLOQ (log 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 definido seguindo a norma CLSI EP17-A2 (39). Os painéis foram fabricados para grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG) e grupos N e O mediante adição a plasma humano HIV-1-negativo agrupado de amostras clínicas naturalmente infectadas ou isolados clínicos. Os testes consistiram num total de 30 réplicas por membro do painel. Os dados na tabela 6 mostram a concentração mais baixa para cada subtipo ou grupo em que o ET tenha sido inferior a 1 log 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, seleccionado como o LLOQ para o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay.

Tabela 6: 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 Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, um painel produzido por adição de vírus HIV-1 suptipo B de cultura a plasma HIV-1-negativo foi testado por três operadores utilizando três lotes de reagentes em três Panther Systems durante 20 dias (tabela 7).

O painel consistiu em um membro do painel HIV-1-negativo e em oito membros do painel HIV-1-positivos. A atribuição da concentração para espécimes clínicos ou stocks de vírus de cultura foi determinada utilizando um ensaio de comparação.

Tabela 7: Precisão do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay

Número de réplicas válidas	Concentração média (log cópias/ml)	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre execuções		Intra-execução		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 <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> Este membro do painel foi diluído 1:3 com diluente espécime e testado para avaliar a precisão da amostra diluída.

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

### Substâncias potencialmente interferentes

Foi avaliada a susceptibilidade do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay à interferência por níveis elevados de substâncias endógenas e fármacos frequentemente receitados a indivíduos infectados pelo HIV-1. Foram testadas amostras de plasma humano HIV-1 negativas às quais foi adicionada uma concentração de 3 log cópias/ml de RNA do HIV-1.

Não foi observada nenhuma interferência no desempenho do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay 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 nenhuma interferência no desempenho do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay na presença das substâncias exógenas indicadas na tabela 8 em concentrações pelo menos três vezes a  $C_{máx}$  (plasma humano).

Tabela 8: 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 Aptima HIV-1 Quant Dx Assay espécimes de plasma clínicos indicados na tabela 9 de doentes com níveis elevados de substâncias definidas ou de doentes que padeçam das doenças indicadas com e sem a presença de 3 log cópias de RNA do HIV-1. Não foi observada interferência no desempenho.

Tabela 9: Tipos de espécimes clínicos testados

Tipos de espécimes clínicos	
1	Factor reumatóide (FR)
2	Anticorpo antinuclear (ANA)
3	Anticorpo anti-Jo-1 (JO-1)
4	Lúpus eritematoso sistémico (LES)
5	Artrite reumatóide (AR)
6	Esclerose múltipla (EM)
7	Hiperglobulinemia
8	Alanina-aminotransferase (ALT) elevada
9	Cirrose alcoólica (CA)
10	Mieloma múltipla (MM)
11	Lipémica (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

**Especificidade**

A especificidade do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay foi determinada utilizando 120 espécimes de plasma frescas e 510 congeladas HIV-1-negativas e utilizando 120 espécimes de soro frescas e 510 espécimes de soro congeladas HIV-1-negativas. Todos os resultados foram não reactivos (especificidade de 100%; IC de 95%: 99,4%-100%).

Tabela 10: Especificidade no Plasma e espécimes de sérum

	Plasma fresco	Plasma congelado	Plasma total	Soro fresco	Soro congelado	Soro total
<b>Réplicas válidas (n)</b>	120	510	630	120	510	630
<b>Não reactivo</b>	120	510	630	120	510	630
<b>Especificidade (IC de 95%)</b>	100% (97,0-100)	100% (99,3-100)	100% (99,4-100)	100% (97,0-100)	100% (99,3-100)	100% (99,4-100)

IC = intervalo de confiança

### Especificidade analítica

A potencial reactividade cruzada com agentes patogénicos (tabela 11) foi avaliada no Aptima HIV-1 Quant Dx Assay na presença ou ausência de 3 log cópias/ml de RNA do HIV-1 em plasma HIV-1-negativo. Não foi observada interferência no desempenho do ensaio na presença de agentes patogénicos.

Tabela 11: Agentes patogénicos testados para a especificidade analítica

Agente patogénico	Concentração
Vírus de hepatite A	100 000 UFP/ml <sup>a</sup>
Vírus de hepatite B	100 000 UI/ml <sup>b</sup>
Vírus de hepatite C	100 000 UI/ml
Vírus de hepatite G	100 000 cópias/ml
Vírus herpes simplex 1 (HSV-1)	100 000 UFP/ml
Vírus herpes simplex 2 (HSV-2)	75 000 UFP/ml
Vírus herpes simplex 6 humano	100 000 cópias/ml
Vírus herpes simplex 8 humano	42 000 UFP/ml
HIV-2	5 500 UFP/ml
Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV)	100 000 pv/ml <sup>c</sup>
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 UFP/ml
Vírus Dengue	100 000 cópias/ml
Vírus de Influenza A	100 000 UFP/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000 UFC/ml <sup>d</sup>
<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000 UFC/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000 UFC/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000 UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	300 000 UFI/ml <sup>e</sup>
<i>Candida albicans</i>	1 000 000 UFC/ml

<sup>a</sup> UFP/ml = unidades formadoras de placa por ml.

<sup>b</sup> UI/ml = Unidades Internacionais por ml.

<sup>c</sup> pv/ml = partículas virais por ml.

<sup>d</sup> UFC/ml = unidades formadores de colónias por ml.

<sup>e</sup> UFI/ml = unidades formadores de inclusão por ml.

**Repetibilidade de espécimes clínicos**

Foram testadas dez amostras de plasma clínicas em três réplicas com o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay. A concentração média e o desvio-padrão são mostrados na tabela 12.

*Tabela 12: Repetibilidade de espécimes clínicos*

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

### 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 Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e com duas amostras acima do limite superior de quantificação do ensaio (tabela 13).

Tabela 13: Diluição de amostras

Diluição	Concentração não diluída média (log cópias/ml)	Concentração média apresentada <sup>a</sup> (log cópias/ml)	Diferença
<b>1:3</b>	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 <sup>b</sup>	2,19	-0,27
<b>1:100</b>	> 7,00 (7,16 <sup>c</sup> )	7,48	0,32
<b>1:100</b>	> 7,00 (7,40 <sup>c</sup> ) <sup>b</sup>	7,39	-0,01

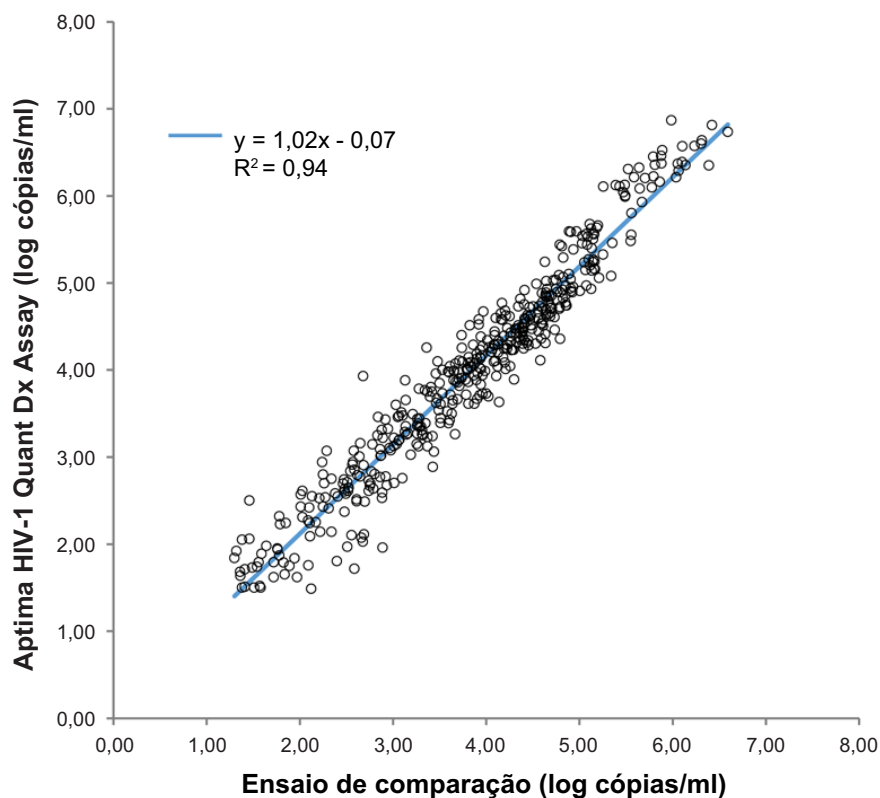
<sup>a</sup> A concentração apresentada é o valor indicado pelo sistema Panther após a aplicação do factor de diluição.

<sup>b</sup> Espécime à qual foi adicionado um analito.

<sup>c</sup> Todos os resultados > 7,00 log cópias/ml foram calculados utilizando análise adicional.

## Correlação de métodos

O desempenho do Aptima HIV-1 Quant Dx Assay foi avaliado contra um ensaio de comparação com marcação CE através do teste de espécimes de plasma clínicas não diluídas de doentes infectados pelo HIV-1 em quatro Panther Systems com dois lotes de reagentes. Foi utilizado para a regressão linear um total de 342 espécimes de plasma congeladas e 108 frescas com resultados quantificáveis tanto no Aptima HIV-1 Quant Dx Assay como no ensaio de comparação (figura 8). Os espécimes incluíram HIV-1 do grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, H, CRF01\_AE, CRF02\_AG).



**Figura 8. Correlação entre o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e o ensaio de comparação**

## Concordância do diagnóstico

Para avaliar a concordância do diagnóstico, foram testados espécimes de indivíduos HIV-1-positivos utilizando o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e um ensaio qualitativo de HIV-1 com marcação CE: 414 espécimes tiveram resultados válidos (tabela 14). Os resultados para ambos os ensaios foram classificados da seguinte forma. Qualquer resultado que forneça um resultado quantificável ou detectável foi classificado como “Detectado”. Qualquer resultado de alvo não detectado foi classificado como “Alvo não detectado”.

**Tabela 14: Concordância de diagnóstico entre o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay e o ensaio de comparação**

		Aptima HIV-1 Quant Dx Assay	
		Detectado	Alvo não detectado
Ensaio de comparação	Detectado	214	0
	Alvo não detectado	0	200

### Contaminação por transferência

Para estabelecer que o Panther System minimiza o risco de resultados falso-positivos decorrentes de contaminação por transferência, foi realizado um estudo analítico com várias execuções utilizando os painéis com vírus adicionado em dois Panther Systems. A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras às quais foi adicionado HIV-1 em título elevado (7 log 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 Aptima HIV-1 Quant Dx Assay 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 reactivo utilizando testes do antígeno p24, testes de anticorpos anti-HIV 1/2 e o Aptima HIV-1 Quant Dx Assay é indicado na tabela 15. O ensaio Aptima HIV-1 Quant Dx detectou HIV-1 RNA, uma média de 5,58 e 11,16 dias antes do antígeno p24 e dos testes ao anticorpo anti-HIV 1/2.

Tabela 15: Resumo de dados do painel de seroconversão

ID do painel	Número de membros do painel testados	Número de membros do painel reactivos			Dias até ao primeiro resultado reactivo			Diferença em dias até ao primeiro resultado reactivo (com base na data da colheita)	
		Aptima HIV-1 Quant Dx	Antigénio p24 do HIV	Anticorpos anti-HIV 1/2	Aptima HIV-1 Quant Dx	Antigénio p24 do HIV	Anticorpos anti-HIV 1/2	Dias antes da detecção pelo teste de antigénio 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 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	7	10
PRB963	7	4	2	0	9	17	21 <sup>a</sup>	8	12
PRB966	10	5	3	2	35	44	48	9	13
PRB974 <sup>b</sup>	4	3	2	1	7	9	16	2	9
PRB975 <sup>b</sup>	5	3	1	0	7	14	14 <sup>a</sup>	7	7
PRB978 <sup>b</sup>	7	3	1	0	26	33	33 <sup>a</sup>	7	7
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>82</b>	<b>51</b>	<b>20</b>	<b>Média</b>			<b>5,58</b>	<b>11,16</b>
					<b>Mediana</b>			<b>7</b>	<b>12</b>

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

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

<sup>b</sup>os painéis PRB974, PRB975 e PRB978 que foram testados com o teste Siemens Anti-HIV 1/2.

O teste do antigénio p24 do HIV-1 foi realizado com o teste Coulter HIV-1 p24 Ag, excepto:

<sup>b</sup>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 Aptima HIV-1 Quant Dx Assay 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% (IC de 95%: 97,0%-100,0%). A concordância positiva foi de 98,4% (IC de 95%: 95,4%-99,5%).



**Bibliografia**

1. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouziuz, W. Rozenbaum, and 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, and 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. Streiner, M. Kaplan, D. F. Haynas, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and 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, and J. M. Mann.** 1988. AIDS: An international perspective. *Science* **239**:573–579.
5. **Sarngadharan, J. G., M. Popovic, L. Broch, J. Scupbach, and 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, and 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. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343–346.
8. **Curran, J. W., H. W. Jaffe, A. M. Hardy, W. M. Morgan, R. M. Selik, and T. J. Dondero.** 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* **239**:610–616.
9. **Gaines, H., M. A. von Sydow, and L. V. von Stedingk.** 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995–999.
10. **Tindall, B., and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and 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, and C. S. Crumpacker.** 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (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, and J. Kahn.** 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 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, and 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., and J. R. George,** ed. 1994. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide To Technical, Medical, Social, Legal and Management Issues*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York.
  28. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and 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, and 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. Schukink, D. van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, and P. Lens.** 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods* **43**:177–187.
  31. **Centers for Disease Control and Association of Public Health Laboratories.** 2014. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: Updated recommendations.
  32. **Pandori, M. W., J. Hackett Jr., B. Louie, A. Vallari, T. Dowling, S. Liska, and J. D. Klausner.** 2009. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2639–2642.
  33. **Gill, P. and Ghaemi, A.** 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**(3):224–43.
  34. **Hill, C.** 2001. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **1**(4): 445–455.
  35. **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.
  36. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
  37. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.*
  38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. *Clinical Laboratory Waste Management.* CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
  39. **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.
  40. **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.



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

Apoio ao Cliente: +1 800 442 9892  
customersupport@hologic.com  
Suporte técnico: +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Para mais informações de contacto, visite [www.hologic.com](http://www.hologic.com).



**Hologic BVBA**  
Da Vincilaan 5  
1930 Zaventem  
Belgium

Hologic, Aptima, Panther e logótipos associados são marcas comerciais e/ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respectivas subsidiárias nos EUA e/ou em outros países.

Armored RNA é uma marca registada da Asuragen, Inc.

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

Este produto pode estar coberto por uma ou mais patentes dos EUA indicadas em [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).

© 2014-2019 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-11853-601 Rev. 005

2019-01