

Test EBV Quant Assay (Panther Fusion™)

Per uso diagnostico *in vitro*

Solo per l'esportazione dagli USA

SOMMARIO

Informazioni generali	2
Usato previsto	2
Riepilogo e spiegazione del test	2
Principi della procedura	2
Avvertenze e precauzioni	3
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti	6
Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici	7
Campioni caricati sul Panther Fusion System	8
Trasporto dei campioni biologici	8
Panther Fusion System	9
Reagenti e materiali forniti	9
Materiali richiesti e disponibili separatamente	10
Materiali opzionali	11
Procedura di test del Panther Fusion System	11
Note procedurali	16
Controllo della qualità	17
Calibrazione del test	17
Controlli positivi e negativi	17
Controllo interno	17
Interpretazione dei risultati	18
Limiti	19
Prestazioni	20
Limite di rilevamento utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS	20
Range lineare	21
Limite inferiore di quantificazione utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS	22
Conferma del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi di EBV	24
Riconducibilità al primo standard internazionale dell'OMS	25
Precisione interna del laboratorio	27
Sostanze potenzialmente interferenti	27
Specificità analitica	29
Correlazione fra metodi	30
Contaminazione/Contaminazione crociata	31
Bibliografia	32
Recapiti	33

Informazioni generali

Uso previsto

Il test EBV Quant Assay Panther Fusion™ è un test di amplificazione degli acidi nucleici (RT-PCR) *in vitro* completamente automatizzato per la quantificazione del DNA del virus di Epstein–Barr (EBV) umano in campioni di plasma EDTA umano e di sangue intero.

Il test EBV Quant Assay Panther Fusion è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nella gestione dei pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi e di quelli sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Il test EBV Quant Assay Panther Fusion non deve essere utilizzato come test di screening per verificare la presenza di EBV nel sangue o negli emoderivati. Questo test è destinato all'utilizzo sul Panther Fusion System.

Riepilogo e spiegazione del test

Il virus EBV è un virus a DNA a doppia elica lineare e ubiquitario di 172 kb che appartiene alla famiglia degli Herpesvirus. Esistono due principali genotipi di EBV, il tipo 1 e il tipo 2, distinti dalle differenze nel gene EBNA-2.

A seguito di un'infezione primaria, EBV entra nel linfocita B circolante e da allora in poi rimane in uno stato latente. Si stima che il 90% della popolazione mondiale sia infetta da EBV¹. Negli individui immunocompetenti, l'infezione da EBV può essere asintomatica durante l'infanzia; tuttavia, potrebbe portare alla mononucleosi infettiva² negli adulti ed è associata a diversi tipi di cancro: linfomi, leucemie, neoplasie epiteliali maligne e tumore dello stomaco³.

Negli individui immunocompromessi, come coloro che hanno subito un trapianto e gli individui infettati dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), la riattivazione di EBV può provocare una linfoproliferazione maligna ed è un'importante causa di morbilità e mortalità. La maggior parte di questi tumori associati a EBV, noti come "malattia linfoproliferativa post-trapianto" (PTDL), si manifesta spesso entro il primo anno dopo il trapianto³.

Il test di amplificazione quantitativa degli acidi nucleici da campioni di sangue intero o plasma è il metodo preferito per il monitoraggio dell'infezione e della malattia da EBV nei pazienti che hanno subito trapianti perché è rapido, sensibile, conveniente e non invasivo. Linee guida recenti raccomandano un monitoraggio settimanale della carica virale di EBV per supportare le decisioni sull'inizio della terapia anti-EBV e per monitorare la risposta alla terapia⁴.

In generale, valori di carica virale più elevati sono legati ad un aumentato rischio di malattia correlata ad EBV⁵. Pertanto, la quantificazione del DNA di EBV in combinazione con la presentazione clinica e altri marker di laboratorio è cruciale nella gestione dei pazienti con infezione da EBV.

Principi della procedura

Il Panther Fusion System automatizza completamente il trattamento dei campioni biologici, inclusi lisi cellulare, cattura di acidi nucleici, amplificazione e rilevamento per il test EBV Quant Assay Panther Fusion. Il test EBV Quant Assay Panther Fusion ha come target il gene EBNA-1 altamente conservato per garantire una quantificazione accurata del DNA di EBV. Il test è standardizzato secondo il primo standard internazionale dell'OMS (codice NIBSC: 09/260) per EBV⁶.

Trattamento del campione e cattura dell'acido nucleico: un controllo interno (IC-B) viene aggiunto automaticamente a ciascun campione biologico tramite il reagente X di cattura di lavoro Fusion (wFCR-B - working Panther Fusion Capture Reagent-B) per monitorare l'interferenza durante il trattamento dei campioni biologici, l'amplificazione e il rilevamento causati da guasto reagente o sostanze inibitorie. I campioni vengono prima aggiunti al reagente B di cattura Fusion (FCR-B) e al reagente B di potenziamento Fusion (FER-B) per rilasciare acido nucleico per l'ibridizzazione su particelle magnetiche. Le particelle di cattura vengono quindi separate dalla matrice del campione residuo in un campo magnetico mediante una serie di fasi di lavaggio con un detergente delicato. L'acido nucleico catturato viene in seguito eluito dalle particelle magnetiche con un reagente a bassa forza ionica (tampone di eluizione Panther Fusion).

Nota: il Panther Fusion System aggiunge IC-B su FCR-B. Dopo l'aggiunta di IC-B a FCR-B, vi si fa riferimento come wFCR-B.

Amplificazione della PCR e rilevamento della fluorescenza: la miscela master PCR a dose singola liofilizzata viene ricostituita con tampone di ricostituzione I Panther Fusion e combinata con l'acido nucleico eluito in una provetta di reazione. Per prevenire l'evaporazione durante la reazione PCR, viene aggiunto il reagente dell'olio Panther Fusion. L'amplificazione del target basata sulla PCR avviene di conseguenza con primer diretto e inverso specifici del target, generando un segnale fluorescente.

Il sistema Panther Fusion fornisce un valore Ct proporzionale alla concentrazione di EBV nei campioni del test. La concentrazione del campione viene determinata dal software del Panther Fusion System utilizzando i valori Ct di EBV per ciascuna reazione e confrontandoli con la curva di calibrazione. I risultati di EBV sono riportati in IU/mL e \log_{10} IU/mL sia per i campioni di sangue intero sia per quelli di plasma. Quando si seleziona il fattore di conversione del sangue intero sul software Panther Fusion, per tenere conto della fase di diluizione durante il trattamento del campione di sangue intero, ai risultati della carica virale EBV viene applicato automaticamente un fattore di diluizione 4.

I target e i canali utilizzati per il loro rilevamento sul Panther Fusion System sono riepilogati nella tabella seguente:

Target	Gene target	Canale dello strumento
EBV	EBNA-1	HEX
Controllo interno	Non applicabile	Quasar 705

Avvertenze e precauzioni

- A. Per uso diagnostico *in vitro*.
- B. Per uso professionale.
- C. Leggere attentamente l'intero foglietto illustrativo e il *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System/Panther Fusion System)* prima di eseguire questo test.
- D. Il reagente B di potenziamento Panther Fusion (FER-B) è corrosivo e pericoloso se ingerito; provoca inoltre gravi ustioni alla pelle e lesioni agli occhi.
- E. Queste procedure devono essere eseguite solo da personale adeguatamente formato nell'utilizzo di questo test e nella manipolazione di materiali potenzialmente infettivi. Se si verifica un versamento, disinfettare immediatamente seguendo le procedure del centro appropriate.

- F. I campioni biologici potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le precauzioni universali. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio. L'esecuzione di questa procedura diagnostica deve essere permessa esclusivamente al personale adeguatamente formato nella manipolazione di materiali infettivi⁷.
- G. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere né fumare nelle aree di lavoro designate. Quando si maneggiano campioni biologici e reagenti, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni biologici e reagenti.
- H. Utilizzare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- I. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5-3,5% (da 0,35 M a 0,5 M).
- J. Smaltire tutto il materiale che è entrato in contatto con campioni biologici e reagenti in conformità alle normative nazionali, internazionali e regionali in vigore.
- K. Mantenere le corrette condizioni di conservazione durante la spedizione del campione biologico per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione biologico in condizioni di spedizione diverse da quelle raccomandate non è stata determinata.
- L. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni biologici. Prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol quando si allentano o si tolgono i tappi dei contenitori dei campioni biologici. I campioni biologici possono contenere livelli di virus o altri organismi estremamente elevati. Assicurarsi che i contenitori dei campioni biologici non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni biologici.
- M. Non utilizzare i reagenti, i calibratori o i controlli dopo la data di scadenza. Non utilizzare la provetta del diluente per sangue intero Aptima™ dopo la data di scadenza.
- N. Conservare i componenti dei test alle condizioni di conservazione raccomandate. Consultare *Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti e Procedura di test del Panther Fusion System* per maggiori informazioni.
- O. Non combinare liquidi o reagenti del test. Non rabboccare reagenti o liquidi: il Panther Fusion System verifica i livelli dei reagenti.
- P. Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi dei reagenti.
- Q. I requisiti del controllo di qualità devono essere analizzati in conformità alle normative nazionali, internazionali e/o regionali in vigore o ai requisiti di accreditamento e le procedure di controllo di qualità standard del proprio laboratorio.
- R. Non utilizzare la cartuccia del test se il sacchetto di conservazione non presenta più il sigillo o se la pellicola della cartuccia del test non è integra. Contattare l'assistenza tecnica Hologic se dovesse verificarsi uno di questi eventi.
- S. Non utilizzare le confezioni di liquido se il sigillo della pellicola non è intatto. Contattare l'assistenza tecnica Hologic se dovesse verificarsi un tale evento.

T. Manipolare con cura le cartucce del test. Non far cadere o capovolgere le cartucce del test. Evitare l'esposizione prolungata alla luce ambientale.

U. Alcuni reagenti di questo kit sono etichettati con simboli di rischio e sicurezza.

Nota: le informazioni relative alle comunicazioni relative alle indicazioni di pericolo utilizzano le classificazioni delle schede di sicurezza UE (SDS). Per informazioni relative alla comunicazione sui pericoli, specifiche per la propria regione, fare riferimento alla scheda SDS specifica della regione nella Raccolta delle schede di sicurezza all'indirizzo www.hologicds.com.

Informazioni sui rischi UE	
—	<p>Cartuccia del test EBV Quant Assay Panther Fusion A-CICLODESTRINA 20-25%</p> <p>H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata P273 - Non disperdere nell'ambiente P280 - Proteggere gli occhi/il viso</p>
	<p>Olio Panther Fusion POLIDIMETILSILOSSANO 100%</p> <p>AVVERTENZA H315 - Provoca irritazione cutanea H319 - Provoca grave irritazione oculare</p>
	<p>Reagente B di potenziamento Panther Fusion (FER-B) IDROSSIDO DI LITIO MONOIDRATO 5-10%</p> <p>PERICOLO H302 - Nocivo se ingerito H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari</p>
	<p>P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso P303 + P361 + P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico</p>

Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti

A. La seguente tabella indica i requisiti di conservazione e manipolazione per questo test.

Reagente	Conservazione a confezione chiusa	Stabilità a bordo/ a confezione aperta ¹	Conservazione a confezione aperta
Cartuccia del test EBV Quant Assay Panther Fusion	Da 2 °C a 8 °C	60 giorni	Da 2 °C a 8 °C ²
Reagente B di cattura Panther Fusion (FCR-B)	Da 15 °C a 30 °C	30 giorni	Da 15 °C a 30 °C
Reagente B di potenziamento Panther Fusion (FER-B)	Da 15 °C a 30 °C	30 giorni	Da 15 °C a 30 °C
Controllo interno B Panther Fusion (IC-B)	Da 2 °C a 8 °C	(in wFCR-B)	Non applicabile
Tampone di eluizione Panther Fusion	Da 15 °C a 30 °C	60 giorni	Da 15 °C a 30 °C
Olio Panther Fusion	Da 15 °C a 30 °C	60 giorni	Da 15 °C a 30 °C
Tampone di ricostituzione I Panther Fusion	Da 15 °C a 30 °C	60 giorni	Da 15 °C a 30 °C
Calibratori per test EBV Quant Assay Panther Fusion (1-5)	Da -15 °C a -35 °C	Fiala monouso	Non applicabile - monouso
Controllo positivo alto per test EBV-BKV Panther Fusion	Da -15 °C a -35 °C	Fiala monouso	Non applicabile - monouso
Controllo positivo basso per test EBV-BKV Panther Fusion	Da -15 °C a -35 °C	Fiala monouso	Non applicabile - monouso
Controllo negativo per trapianto (III) Panther Fusion	Da -15 °C a -35 °C	Fiala monouso	Non applicabile - monouso

Quando i reagenti vengono rimossi dal Panther Fusion System, riportarli immediatamente alle rispettive temperature di conservazione appropriate.

¹ La stabilità a bordo inizia nel momento in cui il reagente viene collocato sul Panther Fusion System per la cartuccia del test EBV Quant Assay Panther Fusion, il FCR-B, il FER-B e l'IC-B. La stabilità a bordo per il tampone di ricostituzione I Panther Fusion, il tampone di eluizione Panther Fusion e il reagente dell'olio Panther Fusion inizia quando la confezione di reagente viene utilizzata per la prima volta.

² Se rimossa dal Panther Fusion System, conservare la cartuccia del test in un contenitore ermetico con essiccante alla temperatura di conservazione raccomandata.

B. Il reagente B di cattura di lavoro Panther Fusion (wFCR-B) e il reagente B di potenziamento Panther Fusion (FER-B) sono stabili per 60 giorni se tappati e conservati a una temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C. Non refrigerare.

C. Smaltire gli eventuali reagenti non utilizzati che non siano più stabili.

D. Evitare la contaminazione crociata durante la manipolazione e la conservazione del reagente.

E. **Non congelare i reagenti.**

F. **Non congelare controlli o calibratori.**

Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici

Campioni biologici: materiale clinico raccolto dal paziente e collocato in un apposito sistema di trasporto. Per il test EBV Quant Assay Panther Fusion, questo termine include campioni di sangue intero raccolti in provette contenenti anticoagulanti EDTA o provette di preparazione del plasma (PPT).

Campioni: rappresenta un termine più generico per descrivere qualsiasi materiale da analizzare sul Panther Fusion System tra cui campioni biologici, campioni biologici trasferiti in una provetta di diluente di sangue intero, nonché calibratori e controlli.

Nota: maneggiare tutti i campioni biologici come se contenessero agenti potenzialmente infettivi. Adottare le precauzioni universali.

Nota: prestare attenzione ad evitare la contaminazione crociata durante le fasi di manipolazione dei campioni biologici. Ad esempio, smaltire il materiale utilizzato senza farlo passare sulle provette aperte.

Nota: per la conservazione dei campioni si consigliano esclusivamente provette secondarie in plastica.

A. Raccolta dei campioni

Per preparare il plasma, è possibile utilizzare i campioni biologici di sangue intero raccolti nelle seguenti provette in vetro o plastica:

- Provette contenenti anticoagulanti EDTA
- Provette di preparazione del plasma (PPT)

B. Trattamento dei campioni biologici

1. Plasma: Il sangue intero può essere conservato a una temperatura tra 2 °C e 30 °C e deve essere centrifugato entro 24 ore dalla raccolta del campione biologico. Il plasma può essere preparato da provette primarie EDTA o PPT. Separare il plasma dai globuli rossi granulari secondo le istruzioni del produttore relative alla provetta utilizzata. Il plasma può essere analizzato sul Panther Fusion System in una provetta primaria o trasferito in una provetta secondaria come ad esempio una provetta per aliquota di campione Aptima (SAT).

Per garantire un volume di campione adeguato, fare riferimento alla tabella seguente:

Tabella 1: Volume minimo di campione

Provetta (dimensioni e tipo)	Volume minimo per 1 replicato
Provetta per aliquota di campione (SAT) Aptima	0,6 mL
12x75 mm	0,9 mL
13X100 mm	0,9 mL
13x100 mm con gel	0,7 mL
16x100 mm con gel	1,1 mL

Se non analizzato immediatamente, il plasma può essere conservato in conformità alle specifiche riportate nella sezione *Condizioni di conservazione dei campioni*. Se trasferito in una provetta secondaria, il plasma può essere congelato a temperature pari a -20 °C o -70 °C. Non congelare i campioni biologici di plasma nelle provette di raccolta primaria EDTA.

2. Prima di essere analizzato sul Panther Fusion System, il sangue intero deve essere trattato utilizzando provette preriempite di diluente per sangue intero. Per maggiori informazioni vedere la *Manipolazione dei campioni di sangue intero*.

C. Condizioni di conservazione dei campioni

I campioni biologici possono essere conservati in una delle seguenti condizioni:

1. Stabilità del plasma

- I campioni non trattati sono stabili per 24 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C dopo la centrifugazione.
- I campioni non trattati sono stabili per 5 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C dopo la centrifugazione.
- I campioni trattati e quelli non trattati sono stabili per 60 giorni a una temperatura compresa tra -20 °C e -70 °C.

2. Stabilità del sangue intero

- I campioni non trattati sono stabili per 36 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C.
- I campioni non trattati sono stabili per 5 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.
- I campioni trattati e quelli non trattati sono stabili per 60 giorni a una temperatura compresa tra -20 °C e -70 °C.

Campioni caricati sul Panther Fusion System

I campioni di plasma e di sangue intero trattato possono essere lasciati sul Panther Fusion System senza tappo per un periodo massimo di 8 ore. I campioni possono essere rimossi dal Panther Fusion System ed essere analizzati a condizione che il tempo totale di permanenza sullo strumento non superi le 8 ore prima del pipettaggio del campione da parte del Panther Fusion System.

Trasporto dei campioni biologici

Mantenere le condizioni di conservazione del campione biologico durante il trasporto come descritto nella sezione *Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici*.

Nota: *i campioni biologici devono essere spediti in conformità alle normative sul trasporto nazionali, internazionali e regionali applicabili.*

Panther Fusion System

Il Panther Fusion System è un sistema integrato di test dell'acido nucleico che automatizza completamente tutti i passaggi necessari per eseguire i vari test Panther Fusion, dal trattamento dei campioni alle operazioni di amplificazione, rilevamento e riduzione dei dati.

Reagenti e materiali forniti

Confezioni dei test

Componenti	Codice	Conservazione
Calibratori del test EBV Quant Assay Panther Fusion		
PCAL 1 qEBV, 3 per confezione	PRD-07159	Da -15 °C a -35 °C
PCAL 2 qEBV, 3 per confezione		
PCAL 3 qEBV, 3 per confezione		
PCAL 4 qEBV, 3 per confezione		
PCAL 5 qEBV, 3 per confezione		
Controlli per test EBV–BKV Quant Assay Panther Fusion		
Provetta di controllo positivo alto (HPC), 5 per confezione	PRD-07158	Da -15 °C a -35 °C
Provetta di controllo positivo basso (LPC), 5 per confezione		
Provetta di controllo negativo per trapianto III (NC), 5 per confezione		
Cartuccia del test EBV Quant Assay Panther Fusion, 96 test		
Cartuccia del test qEBV Assay Panther Fusion, 12 test, 8 per confezione	PRD-07157	Da 2 °C a 8 °C
Controllo interno B Panther Fusion, 960 test		
Provetta di controllo interno B Panther Fusion, 4 per confezione	PRD-06234	Da 2 °C a 8 °C
Reagente B di estrazione Panther Fusion, 960 test		
Flacone di reagente B di cattura Panther Fusion, 240 test, 4 per confezione	PRD-06232	Da 15 °C a 30 °C
Flacone di reagente B di potenziamento Panther Fusion, 240 test, 4 per confezione		
Tampone di eluizione Panther Fusion, 2.400 test		
Confezione di tamponi di eluizione Panther Fusion, 1.200 test, 2 per confezione	PRD-04334	Da 15 °C a 30 °C
Tampone di ricostituzione I Panther Fusion, 1.920 test		
Tamponi di ricostituzione I Panther Fusion, 960 test, 2 per confezione	PRD-04333	Da 15 °C a 30 °C
Reagente dell'olio Panther Fusion, 1.920 test		
Reagente dell'olio Panther Fusion, 960 test, 2 per confezione	PRD-04335	Da 15 °C a 30 °C

Materiali richiesti e disponibili separatamente

Nota: salvo altrimenti specificato, per i materiali resi disponibili da Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

Materiali	N. cat.
Panther System	303095
Panther Fusion Module	PRD-04173
Panther Fusion System	PRD-04172
Kit di liquidi per test Aptima Assay (soluzione di lavaggio Aptima, tampone per liquido di disattivazione Aptima e reagente dell'olio Aptima)	303014 (1.000 test)
Unità multiprovetta (MTU)	104772-02
Kit dei sacchetti di rifiuti Panther	902731
Coperchio del contenitore per rifiuti Panther	504405
Oppure kit procedurale Panther System Contiene unità multiprovette (MTU), sacchetti di rifiuti, coperchi del contenitore di scarico, liquidi di test e di rilevamento automatico*	303096 (5.000 test)
Puntali, 1.000 µL, filtrati, sensibili ai liquidi, conduttivi e monouso: <i>Tutti i prodotti sono disponibili in tutte le regioni geografiche. Contattare il rappresentante per informazioni specifiche sulla regione.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031(10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Vassoi per provette Panther Fusion, 1.008 test, 18 vassoi per confezione	PRD-04000
Provette di diluente per sangue intero (esclusivamente per il trattamento di campioni di sangue intero)	PRD-06783 (100 provette preriempite per sacchetto)
Tappi non penetrabili Hologic di ricambio (tappo per provetta monouso)	PRD-06720 (100 tappi per sacchetto)
Candeggina, soluzione di ipoclorito di sodio al 5%-8,25% (0,7 M-1,16 M)	—
Guanti monouso senza talco	—
Teli da banco di laboratorio plastificati	—
Panni che non lasciano pelucchi	—
Pipettatore	—
Puntali	—
Opzioni di provette di raccolta primarie (EDTA e PPT): 13 mm x 100 mm 12 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	—
Centrifuga	—
Miscelatore vortex	—

*Necessario solo per i test Aptima TMA Assay Panther.

Materiali opzionali

Materiali	N. cat.
Opzioni provetta secondaria:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Provette per aliquota di campione (SAT) Aptima (confezione da 100)	503762
Tappo per provetta di trasporto (confezione da 100) <i>tappo per SAT</i>	504415
Diluyente dei campioni Aptima	PRD-03003
Kit diluyente dei campioni Aptima <i>contiene il diluyente dei campioni Aptima, 100 SAT e 100 tappi</i>	PRD-03503
Pipette di trasferimento	—
Agitatore oscillante per provette	—

Procedura di test del Panther Fusion System

Nota: per informazioni procedurali aggiuntive, consultare il Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System/Panther Fusion System).

A. Preparazione dell'area di lavoro

1. Passare sulle superfici di lavoro una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5%-3,5% (0,35 M-0,5 M). Lasciare la soluzione di ipoclorito di sodio a contatto con le superfici per almeno 1 minuto e risciacquare con acqua deionizzata (DI). Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.
2. Pulire una superficie di lavoro separata su cui preparare i campioni. Utilizzare la procedura descritta in precedenza (fase A.1).
3. Pulire eventuali pipettatori. Utilizzare la procedura di pulizia descritta in precedenza (fase A.1).

B. Preparazione dei calibratori e dei controlli

Consentire ai calibratori e ai controlli di raggiungere una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C prima del trattamento, come indicato di seguito:

1. Togliere i calibratori e i controlli dal luogo in cui sono conservati (da -15 °C a -35 °C) e porli a una temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C. Durante l'intero processo di scongelamento, capovolgere delicatamente ciascuna provetta per miscelarla accuratamente. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Opzione. Per una miscelazione accurata, il calibratore e le provette di controllo possono essere collocati su un agitatore oscillante per provette. Assicurarsi che il contenuto delle provette sia completamente scongelato prima di utilizzarlo.

Nota: nel capovolgere calibratori e controlli, non generare schiuma eccessiva. La schiuma pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther Fusion System.

2. Quando il contenuto della provetta si è scongelato, asciugare l'esterno della provetta con un panno monouso pulito e asciutto.
3. Per prevenire la contaminazione, non aprire le provette.

C. Preparazione del reagente

1. Rimuovere i flaconi di IC-B, FCR-B e FER-B dal luogo di conservazione.
2. Mescolare FCR-B fino a quando le sfere sono completamente sospese. Evitare la formazione di schiuma durante questo procedimento.
3. Aprire i flaconi di IC-B, FCR-B e FER-B e smaltirne i tappi. Aprire lo sportello del TCR sullo scomparto superiore del Panther Fusion System.
4. Collocare i flaconi di IC-B, FCR-B e FER-B nelle posizioni appropriate sul carosello del TCR.
5. Chiudere lo sportello del TCR.

Nota: *il Panther Fusion System aggiunge l'IC-B a FCR B. Dopo l'aggiunta di IC-B a FCR-B, vi si fa riferimento come wFCR B (FCR-B di lavoro). Se wFCR-B e FER-B vengono rimossi dal sistema, utilizzare nuovi tappi e conservare immediatamente in conformità alle corrette condizioni di conservazione.*

D. Manipolazione dei campioni

Nota: *preparare i campioni biologici in base alle istruzioni contenute nella sezione Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici prima di caricarli sul Panther Fusion System.*

Ispezionare le provette del campione prima di caricarle nella rastrelliera. Se una provetta del campione contiene bolle o ha un volume inferiore rispetto a quello osservato normalmente, battere delicatamente sul fondo della provetta per favorire il deposito del contenuto sulla parte inferiore.

E. Manipolazione dei campioni di plasma

1. Assicurarsi che i campioni trattati nelle provette primarie o i campioni non diluiti nelle provette secondarie siano conservati correttamente secondo quanto indicato nella sezione *Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici*.
2. Assicurarsi che i campioni biologici congelati siano scongelati del tutto. Miscelare con vortex i campioni scongelati per 3-5 secondi per miscelarli accuratamente.
3. Lasciare che i campioni biologici raggiungano una temperatura tra 15 °C e 30 °C prima di sottoporli al trattamento. Per ulteriori informazioni sul caricamento dei campioni sullo strumento, vedere *Campioni caricati sul Panther Fusion System*.
4. Assicurarsi che ogni provetta primaria o secondaria contenga un campione biologico adeguato. Fare riferimento alla Tabella 1 per il volume minimo di campione per 1 replicato.
5. Immediatamente prima di caricare i campioni biologici in una rastrelliera campioni, centrifugare ciascun campione a 1.000 – 3.000g per 10 minuti. Non rimuovere i tappi in questa fase.

Per informazioni su come caricare la rastrelliera e togliere i tappi, vedere la fase G.2 indicata di seguito.

F. Manipolazione dei campioni di sangue intero

1. Assicurarsi che i campioni biologici non trattati nelle provette primarie siano conservati correttamente secondo quanto indicato nella sezione *Raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici*.
2. Assicurarsi che i campioni biologici congelati siano scongelati del tutto. Lasciare che i campioni biologici raggiungano una temperatura tra 15 °C e 30 °C prima di sottoporli al trattamento. Per ulteriori informazioni sul caricamento dei campioni sullo strumento, vedere *Campioni caricati sul Panther Fusion System*.

3. Capovolgere delicatamente le provette di sangue intero almeno 3 volte o miscelare delicatamente su un agitatore oscillante, fino a quando il sangue è omogeneo.
4. Prima di caricare il campione sul sistema, procedere come segue su ciascun campione biologico.
 - a. Il sangue nelle provette primarie deve essere miscelato accuratamente per inversione e il campione deve essere immediatamente trasferito nella provetta contenente il diluente per sangue intero.
 - b. Aggiungere 500 µL di campione biologico di sangue intero alla provetta preriempita di diluente per sangue intero.
 - c. Riposizionare il tappo e miscelare con vortex il campione per almeno 5 secondi.

Per informazioni su come caricare la rastrelliera e togliere i tappi, vedere la fase G.2 indicata di seguito.

G. Preparazione del sistema

1. Per istruzioni sulla configurazione del Panther Fusion System, tra cui il caricamento di campioni, reagenti, cartucce del test e liquidi universali, fare riferimento al *Panther/ Panther Fusion System Operator's Manual (Manuale per l'operatore del Panther System/ Panther Fusion System)* e alle *Note procedurali*.
2. Caricare i campioni nella rastrelliera dei campioni. Eseguire le seguenti fasi per ciascuna provetta del campione (campione biologico e, quando necessario, calibratori e controlli):
 - a. Allentare il tappo di una delle provette del campione, senza però rimuoverlo.

Nota: prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione provocata dalla diffusione degli aerosol. Allentare delicatamente i tappi dei campioni.

- b. Caricare la provetta del campione nella rastrelliera dei campioni.
- c. Ripetere le fasi 2.a e 2.b per ciascun campione rimanente.
- d. Dopo che i campioni sono stati caricati nella rastrelliera dei campioni, rimuovere e gettare tutti i tappi delle provette del campione di una rastrelliera dei campioni. Per evitare la contaminazione, non fare passare i tappi sopra le altre rastrelliere dei campioni o sopra le provette del campione.
- e. Se necessario, utilizzare una pipetta di trasferimento monouso nuova per rimuovere eventuali bolle o schiuma. La presenza di bolle nella provetta pregiudica il rilevamento del livello di liquido nel Panther Fusion System.
- f. Dopo aver rimosso l'ultimo tappo, caricare la rastrelliera dei campioni in uno scomparto dei campioni.

Nota: se contemporaneamente si eseguono altri test e si analizzano altri tipi di campioni, fissare il fermo campioni prima di caricare la rastrelliera campioni nello scomparto campioni.

- g. Ripetere le fasi da 2.a a 2.f per la successiva rastrelliera dei campioni.

H. Preparazione del sistema: applicazione del fattore di conversione del campione biologico di sangue intero

1. Impostare il sistema in base alle istruzioni fornite nel *Manuale per l'operatore del Panther/ Panther System*.
2. Caricare la rastrelliera dei campioni biologici.

3. Applicare il fattore di conversione del sangue intero agli ordini di analisi dei test per i campioni di sangue intero.

Nota: il fattore di conversione del sangue intero può essere applicato a un'intera rastrelliera o a un singolo ordine di analisi.

Per applicare il fattore di conversione del sangue intero a un'intera rastrelliera di campioni di sangue intero:

- a. Nella schermata *Sample Rack Bay* (Scomparto rastrelliera campioni) fare doppio clic sulla rastrelliera caricata d'interesse. Viene visualizzata la schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) relativa alla rastrelliera selezionata.
- b. Selezionare **Dilute All (Diluisci tutto)**.

Viene visualizzata la finestra *Dilution Factor* (Fattore di diluizione) (Figura 1).

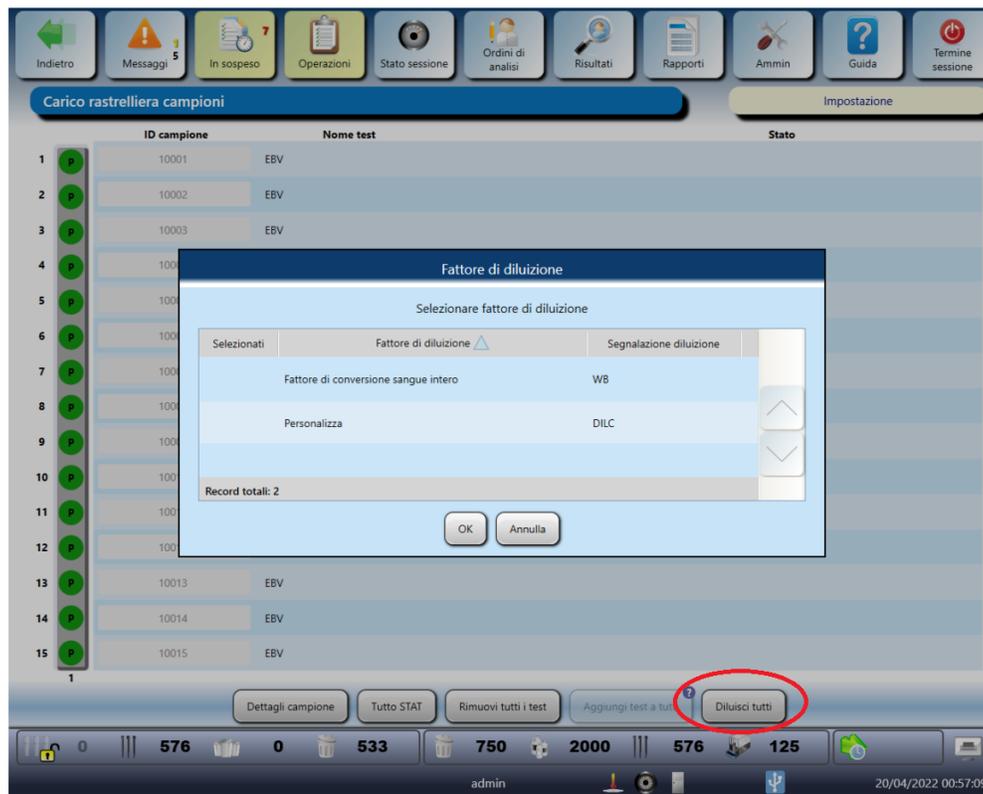


Figura 1. Finestra Dilution Factor (Fattore di diluizione) della schermata Sample Rack Loading (Caricamento rastrelliera campioni) (esempio)

- c. Selezionare **Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero)**.
- d. Selezionare **OK**.

Viene visualizzata una finestra *Set Dilution Factor for Rack* (Imposta fattore di diluizione per la rastrelliera).

- e. Selezionare **Yes (Sì)** per applicare la segnalazione Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero) all'intera rastrelliera di campioni di sangue intero.

Per applicare a un ordine di analisi singolo il fattore di conversione del sangue intero (consultare a Figura 2):

- a. Nella schermata *Sample Rack Bay* (Scomparto rastrelliera campioni), fare doppio clic sulla rastrelliera caricata con i campioni biologici d'interesse.

Viene visualizzata la schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) relativa alla rastrelliera di campioni selezionata.

- b. Nella schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) fare doppio clic sul campione biologico d'interesse.

Viene visualizzata la schermata *Sample Details* (Dettagli campione) con gli ordini di analisi correnti per il campione biologico selezionato.

- c. Selezionare l'ordine di analisi di interesse dal pannello *Test Orders* (Ordini di analisi).
d. Selezionare **Apply Dilution (Applica diluizione)**.

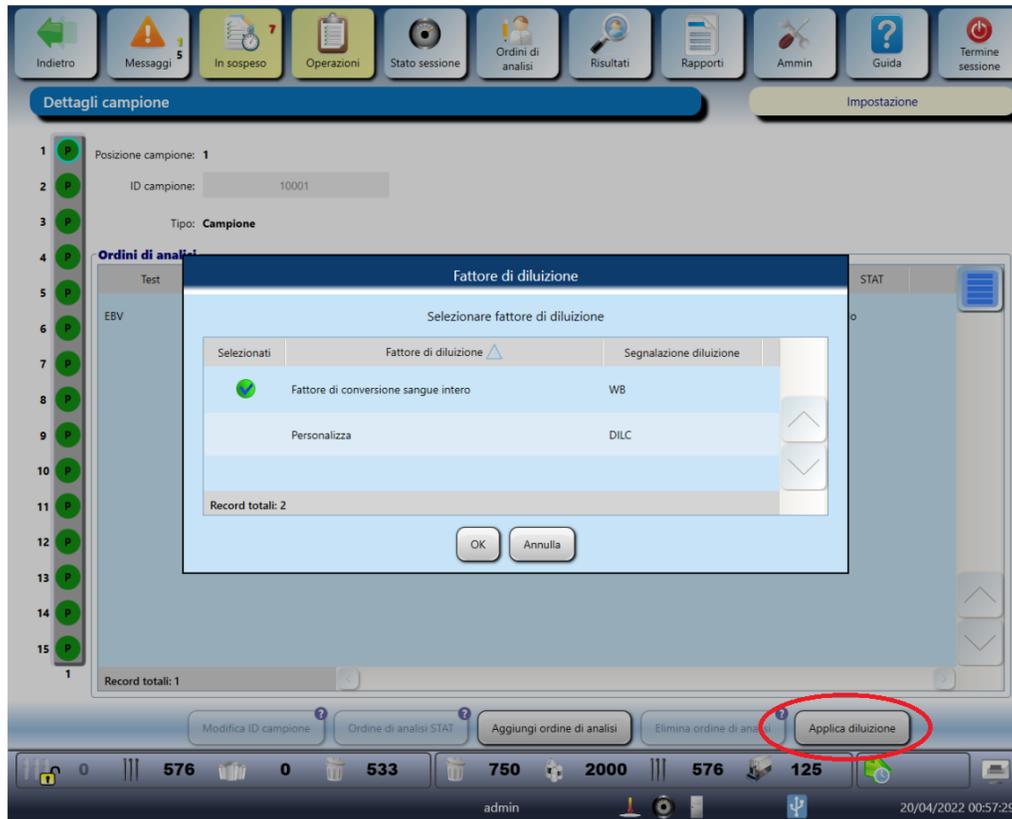


Figura 2. Finestra Dilution Factor (Fattore di diluizione) della schermata Sample Details (Dettagli campione) (esempio)

- e. Selezionare **Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero)**.
f. Selezionare **OK** per applicare la segnalazione Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero) a tutti gli ordini di analisi selezionati.
4. Se necessario, il fattore sangue intero può essere rimosso dagli ordini di analisi prima dell'inizio del trattamento.

Per eliminare il fattore di conversione del sangue intero da un'intera rastrelliera:

1. Nella schermata *Sample Rack Bay* (Scomparto rastrelliera campioni) fare doppio clic sulla rastrelliera caricata d'interesse.

Viene visualizzata la schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) relativa alla rastrelliera selezionata.

2. Selezionare **Dilute All (Diluisce tutto)**.

3. Nella finestra *Dilution Factor* (Fattore di diluizione), deselezionare **Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero)**.
4. Selezionare **OK**.

Viene visualizzata una finestra *Set Dilution Factor for Rack* (Imposta fattore di diluizione per la rastrelliera).

5. Selezionare **Yes (Sì)** per eliminare il fattore di conversione del sangue intero da un'intera rastrelliera.

Per eliminare gli ordini di analisi dei test del fattore di conversione del sangue intero:

1. Nella schermata *Sample Rack Bay* (Scomparto rastrelliera campioni), fare doppio clic sulla rastrelliera caricata con i campioni biologici d'interesse.

Viene visualizzata la schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) relativa alla rastrelliera di campioni selezionata.

2. Nella schermata *Sample Rack Loading* (Caricamento rastrelliera campioni) fare doppio clic sul campione biologico d'interesse.

Viene visualizzata la schermata *Sample Details* (Dettagli campione) con gli ordini di analisi correnti per il campione biologico selezionato.

3. Selezionare l'ordine di analisi di interesse dal pannello *Test Orders* (Ordini di analisi).
4. Selezionare **Apply Dilution (Applica diluizione)**.
5. Nella finestra *Dilution Factor* (Fattore di diluizione), deselezionare **Whole Blood Conversion Factor (Fattore di conversione sangue intero)**.
6. Selezionare **OK** per eliminare il fattore di conversione del sangue intero dall'ordine di analisi.

Note procedurali

A. Calibratori e controlli

1. I calibratori qEBV (5 provette), il controllo positivo basso EBV–BKV (LPC), il controllo positivo alto EBV–BKV (HPC) e il controllo negativo trapianto (NC III) possono essere caricati in qualsiasi posizione nella rastrelliera dei campioni e in qualsiasi corsia dello scomparto campioni sul Panther Fusion System. Il pipettaggio del calibratore e del controllo inizierà quando i campioni di EBV saranno stati caricati nel sistema. Il pipettaggio dei campioni inizierà una volta soddisfatte le due seguenti condizioni:
 - a. I calibratori e i controlli sono in fase di trattamento sul sistema.
 - b. I risultati validi dei calibratori e dei controlli sono stati registrati nel sistema.
2. Dopo che il calibratore e le provette di controllo sono state pipettati e trattati per il test EBV Quant Assay Panther Fusion, i campioni biologici possono essere analizzati. I risultati della calibrazione sono validi per 60 giorni e i risultati del controllo sono validi per un massimo di 30 giorni (frequenza configurata da un amministratore) **a meno che**:
 - a. I risultati del calibratore non siano validi.
 - b. I risultati del controllo non siano validi.
 - c. L'operatore richieda di eseguire nuovi controlli/calibratori nel software del Panther Fusion System.
3. È necessaria una calibrazione per ogni nuovo lotto di cartuccia del test caricato sul Panther Fusion System prima di utilizzarlo per il trattamento dei campioni.
4. Ciascuna provetta di calibratore e controllo può essere utilizzata solo una volta.

Controllo della qualità

Calibrazione del test

Per generare risultati validi è necessario completare la calibrazione del test. I cinque calibratori positivi vengono eseguiti in triplicato ogni volta che un nuovo lotto di cartucce di test viene caricato sul Panther Fusion System. Una volta stabilita, la calibrazione del test è valida per un periodo massimo di 60 giorni. Il software del Panther Fusion System avvisa l'operatore quando è necessario eseguire la calibrazione.

Durante il trattamento, il software Panther Fusion verifica automaticamente la validità della curva di calibrazione. Se la calibrazione non supera i controlli di validità, il Panther Fusion System invalida automaticamente tutti i campioni interessati e richiederà l'esecuzione di una nuova serie di calibratori di test prima di pipettare eventuali campioni aggiuntivi.

Per impostazione predefinita, il test tratterà i campioni come plasma non diluito. Per trattare campioni di sangue intero, è necessario selezionare la diluizione del fattore di conversione del sangue intero dall'interfaccia utente dello strumento.

Controlli positivi e negativi

Per generare risultati validi è necessario analizzare una serie di controlli del test. Un replicato di NC III (controllo negativo per trapianto), LPC (controllo positivo basso) e HPC (controllo positivo elevato) deve essere testato ogni volta che un nuovo lotto di cartucce di test viene caricato sul Panther Fusion System o quando l'attuale serie di controlli validi per un lotto di cartucce attivo è scaduta.

Il Panther Fusion System è configurato in modo che richieda analisi di controlli del test a un intervallo specificato dall'amministratore di un massimo di 30 giorni. Il software sul Panther Fusion System avvisa l'operatore quando sono necessari controlli del test e non avvia nuovi test finché i controlli del test non vengono caricati e non hanno iniziato il trattamento.

Durante il trattamento, i criteri per l'accettabilità dei controlli del test vengono verificati automaticamente dal Panther Fusion System. Per generare risultati validi, i controlli del test devono superare una serie di verifiche di validità eseguite dal Panther Fusion System.

Se i controlli del test superano tutte le verifiche di validità, sono considerati validi per l'intervallo di tempo specificato dall'amministratore. Quando l'intervallo di tempo è trascorso, il Panther Fusion System contrassegna i controlli del test come scaduti e verrà richiesta una nuova serie di controlli del test prima di pipettare nuovi campioni.

Se uno qualsiasi dei controlli del test non supera i controlli di validità, il Panther Fusion System invalida automaticamente i campioni interessati e sarà necessaria una nuova serie di controlli del test prima di pipettare eventuali campioni aggiuntivi.

Controllo interno

Durante il processo di estrazione viene aggiunto un controllo interno a ciascun campione. Durante il trattamento, i criteri di accettabilità del controllo interno vengono verificati automaticamente dal software del Panther Fusion System. Il rilevamento del controllo interno non è richiesto per campioni positivi a EBV. Il controllo interno deve essere rilevato in tutti i campioni negativi per i target EBV; i campioni che non soddisfano tali criteri saranno segnalati come non validi. Ogni campione con un risultato non valido deve essere rianalizzato.

Il software del Panther Fusion System è progettato per verificare in maniera accurata i processi quando le procedure vengono eseguite rispettando le istruzioni fornite nel presente foglietto illustrativo e nel *Manuale per l'operatore del Panther/Panther Fusion System*.

Interpretazione dei risultati

Il Panther Fusion System determina automaticamente la concentrazione del DNA di EBV nei campioni biologici e nei controlli mettendo a confronto i risultati con una curva di calibrazione. Le concentrazioni di DNA di EBV sono riportate in IU/mL e \log_{10} IU/mL. L'interpretazione dei risultati è inclusa nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

Tabella 2: Interpretazione dei risultati del plasma

Risultati del test EBV Quant Assay riportati		
IU/mL	Valore \log_{10}	Interpretazione
Non rilevato	Non rilevato	DNA EBV non rilevato.
< 120 rilevate	< 2,08	Il DNA di EBV è stato rilevato ma a un livello inferiore al limite inferiore di quantificazione (LLoQ).
Da 120 a 1,50E09	Da 2,08 a 9,18	La concentrazione di DNA di EBV rientra nell'intervallo quantitativo compreso tra LLoQ e ULoQ IU/mL.
> 1,50E09	> 9,18	La concentrazione di DNA di EBV è superiore al limite superiore di quantificazione (ULoQ).
Non valido ^a	Non valido ^a	Si è verificato un errore nella generazione del risultato. Il campione biologico deve essere rianalizzato.

^a I risultati non validi vengono visualizzati in caratteri di colore blu.

Tabella 3: Interpretazione dei risultati di sangue intero

Risultati del test EBV Quant Assay riportati		
IU/mL	Valore \log_{10}	Interpretazione
Non rilevato	Non rilevato	DNA EBV non rilevato.
< 350 rilevate	< 2,54	Il DNA di EBV è stato rilevato ma a un livello inferiore al limite inferiore di quantificazione (LLoQ).
Da 350 a 6,0E09	Da 2,54 a 9,78	La concentrazione di DNA di EBV rientra nell'intervallo quantitativo compreso tra LLoQ e ULoQ IU/mL.
> 6,0E09	> 9,78	La concentrazione di DNA di EBV è superiore al limite superiore di quantificazione (ULoQ).
Non valido ^a	Non valido ^a	Si è verificato un errore nella generazione del risultato. Il campione biologico deve essere rianalizzato.

^a I risultati non validi vengono visualizzati in caratteri di colore blu.

Limiti

- A. L'utilizzo di questo test va limitato al personale addestrato per questa procedura. La mancata osservanza delle istruzioni fornite può determinare risultati erranei.
- B. L'affidabilità dei risultati è subordinata alla raccolta, al trasporto, alla conservazione e al trattamento adeguati del campione biologico.
- C. Evitare la contaminazione aderendo alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure specificate nel presente foglietto illustrativo.
- D. Sebbene siano rare, le mutazioni all'interno delle regioni altamente conservate del genoma virale coperto dai primer e/o le sonde nel test EBV Quant Assay Panther Fusion possono comportare una quantificazione inferiore o il mancato rilevamento del virus.
- E. I risultati negativi non precludono infezioni da EBV e non devono essere utilizzati come unica base per il trattamento o per prendere altre decisioni sulla gestione.
- F. Un risultato positivo indica il rilevamento di acido nucleico dal virus pertinente. L'acido nucleico potrebbe persistere anche dopo che il virus non è più trattabile.

Prestazioni

Limite di rilevamento utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS

Si definisce limite di rilevamento (LoD) del test la concentrazione di DNA di EBV rilevata con una probabilità del 95% o superiore in conformità alle linee guida CLSI EP17-A2.⁸

Limite di rilevamento utilizzando gli standard OMS nel plasma

Il valore LoD è stato determinato analizzando i pannelli del primo standard internazionale dell'OMS (codice NIBSC 09/260) per EBV diluito in plasma umano negativo al EBV. Venti (20) replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagente per un totale di 60 replicati per diluizione. È stata eseguita l'analisi Probit per generare i limiti di rilevamento previsti. I valori LoD mostrati nella Tabella 4 sono i risultati del lotto di reagente con il limite di rilevamento previsto più alto. Il LoD relativo al test EBV Quant Assay Panther Fusion utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS è pari a 54,1 IU/mL per il plasma.

Tabella 4: Limite di rilevamento per plasma utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS per EBV

Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (IU/mL)
10%	1,5
20%	2,4
30%	3,6
40%	5,1
50%	7,2
60%	10,2
70%	14,8
80%	22,4
90%	38,0
95%	54,1

Limite di rilevamento utilizzando gli standard OMS nel sangue intero

Il valore LoD è stato determinato analizzando i pannelli del primo standard internazionale dell'OMS per EBV diluito in sangue intero negativo a EBV. Venti (20) replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagente per un totale di 60 replicati per diluizione. È stata eseguita l'analisi Probit per generare i limiti di rilevamento previsti. I valori LoD mostrati nella Tabella 5 sono i risultati del lotto di reagente con il limite di rilevamento previsto più alto. Il valore LoD relativo al test EBV Quant Assay Panther Fusion utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS è pari a 200,9 IU/mL per il sangue intero.

Tabella 5: Limite di rilevamento per sangue intero utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS per EBV

Limite di rilevamento previsto	Concentrazione (IU/mL)
10%	4,9
20%	6,7
30%	9,1
40%	12,6
50%	17,8
60%	26,1
70%	40,2
80%	67,0
90%	129,6
95%	200,9

Range lineare

Range lineare nel plasma

Il range lineare è stato stabilito analizzando pannelli di EBV diluito in plasma umano negativo a EBV in conformità alle linee guida CLSI EP06-A.⁹ La concentrazione dei pannelli era compresa tra 1,98 log IU/mL e 9,26 log IU/mL. Il test EBV Quant Assay Panther Fusion ha dimostrato la linearità nel range analizzato. Il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del test è pari a 9,18 log IU/mL come illustrato nella Figura 3.

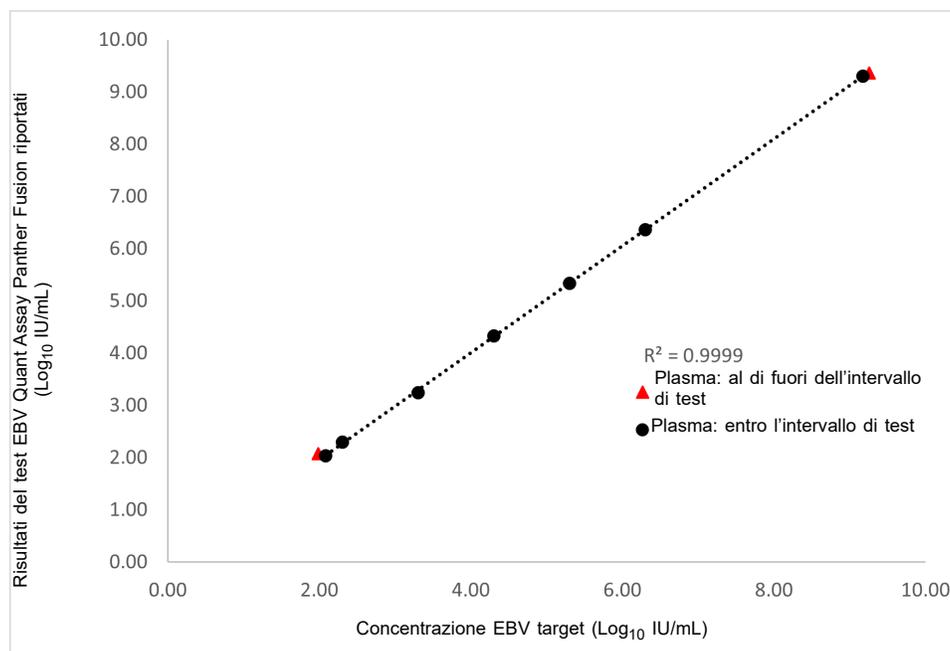


Figura 3. Linearità nel plasma

Range lineare nel sangue intero

Il range lineare è stato stabilito analizzando pannelli di EBV diluito in sangue intero umano negativo al EBV in conformità alle linee guida CLSI EP06-A⁹. La concentrazione dei pannelli era compresa tra 2,45 log IU/mL e 9,86 log IU/mL. Il test EBV Quant Assay Panther Fusion ha dimostrato la linearità nel range analizzato. Il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del test è pari a 9,78 log IU/mL come illustrato nella Figura 4.

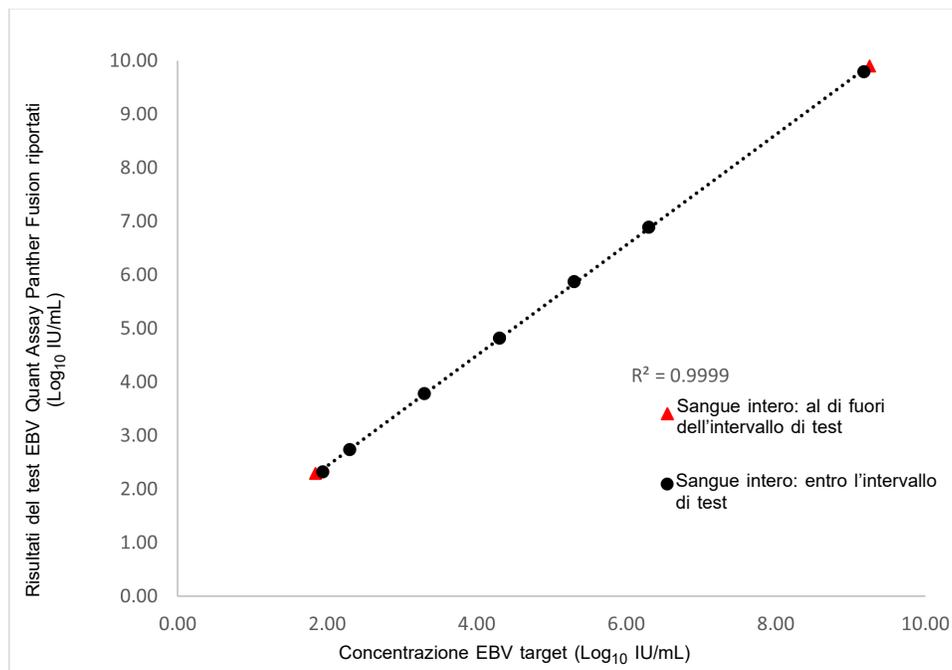


Figura 4. Linearità nel sangue intero

Limite inferiore di quantificazione utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS

Si definisce limite inferiore di quantificazione (LLoQ) la concentrazione più bassa alla quale EBV viene quantificato in modo affidabile, in conformità alle linee guida CLSI EP17-A2.⁸ L'errore totale è stato stimato utilizzando il modello Westgard: Errore totale (TE) = |bias| + 2 DS. Per garantire la precisione e l'accuratezza delle misurazioni, l'errore totale del test EBV Quant Assay Panther Fusion è stato stabilito a 1,2 log IU/mL, con un bias di conferma e una DS, rispettivamente ≤ 0,5 log IU/mL e ≤ 0,35 log IU/mL.

Limite inferiore di quantificazione utilizzando lo standard OMS nel plasma

Il valore LLoQ è stato determinato analizzando i pannelli del primo standard internazionale dell'OMS (codice NIBSC 09/260) per EBV diluito in plasma umano negativo a EBV. Venti (20) replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagente per un totale di 60 replicati per diluizione. Nella Tabella 6, vengono visualizzati i risultati LLoQ per i tre lotti di reagente. Il LLoQ generato con il primo standard internazionale dell'OMS per EBV nel plasma è pari a IU/mL 120 IU/mL (2,08 log IU/mL).

Tabella 6: Determinazione di LLoQ utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS per EBV diluito nel plasma

Lotto di reagente	N	N. rilevato	Concentrazione target (log IU/mL)	Test EBV		Bias (log IU/mL)	TE calcolato (log IU/mL)
				Quant Assay (log IU/mL)	DS (log IU/mL)		
1	20	20	1,93	2,06	0,21	0,2	0,6
	20	20	2,08	2,33	0,21	0,3	0,7
	20	20	2,18	2,45	0,13	0,3	0,5
	20	20	2,26	2,44	0,15	0,2	0,5
2	20	20	1,93	1,61	0,30	0,3	0,9
	20	20	2,08	1,79	0,23	0,3	0,8
	20	20	2,18	2,00	0,18	0,2	0,6
	20	20	2,26	2,09	0,17	0,2	0,5
3	20	20	1,93	1,75	0,20	0,2	0,6
	20	20	2,08	1,88	0,25	0,2	0,7
	20	20	2,18	2,09	0,12	0,1	0,4
	20	20	2,26	2,04	0,15	0,2	0,5

DS=deviazione standard $\leq 0,35$ (log IU/mL).

|Bias|=bias di conferma $\leq 0,5$ (log IU/mL).

La diluizione corrispondente alla concentrazione LLoQ e testata su ciascun lotto di reagente è evidenziata in grigio.

Limite inferiore di quantificazione utilizzando lo standard OMS nel sangue intero

Il valore LLoQ è stato determinato analizzando i pannelli del primo standard internazionale dell'OMS (codice NIBSC 09/260) per EBV diluito in plasma umano intero negativo a EBV. Venti (20) replicati di ciascuna diluizione sono stati analizzati con ciascuno dei tre lotti di reagente per un totale di 60 replicati per diluizione. Nella Tabella 7, vengono visualizzati i risultati LLoQ per i tre lotti di reagente. Il valore LLoQ generato con il primo standard internazionale dell'OMS per EBV nel sangue intero è pari a IU/ml 350 IU/mL (2,54 log IU/mL).

Tabella 7: Determinazione di LLoQ utilizzando il primo standard internazionale dell'OMS per EBV diluito nel sangue intero

Lotto di reagente	N	N. rilevato	Concentrazione target (log IU/mL)	Test EBV			TE calcolato (log IU/mL)
				Quant Assay (log IU/mL)	DS (log IU/mL)	Bias (log IU/mL)	
1	20	18	2,40	2,48	0,30	0,3	0,9
	20	20	2,48	2,40	0,33	0,3	0,9
	20	20	2,54	2,50	0,30	0,2	0,8
	20	20	2,62	2,51	0,34	0,3	1,0
2	20	19	2,40	1,94	0,39	0,5	1,2
	20	20	2,48	1,94	0,36	0,5	1,3
	20	20	2,54	2,06	0,26	0,5	1,0
	20	19	2,62	2,16	0,19	0,5	0,9
3	20	20	2,40	1,84	0,48	0,60	1,5
	20	19	2,48	1,90	0,32	0,60	1,2
	20	20	2,54	2,12	0,26	0,40	0,9
	20	20	2,62	2,25	0,29	0,40	1,0

DS=deviazione standard $\leq 0,35$ (log IU/mL).

|Bias|=bias di conferma $\leq 0,5$ (log IU/mL).

La diluizione corrispondente alla concentrazione LLoQ e testata su ciascun lotto di reagente è evidenziata in grigio.

Conferma del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) nei genotipi di EBV

Limite inferiore di quantificazione nei genotipi nel plasma

Il valore LLoQ stabilito utilizzando lo standard OMS è stato valutato testando i genotipi EBV 1 (Raji, Akata e B95-8) e 2 (AG876, P3H1 e Jijoye) addizionati a 3x LLoQ nel plasma umano negativo a EBV. Tre (3) replicati di ciascun elemento del pannello sono stati analizzati con un lotto di reagente. I risultati sono illustrati nella Tabella 8.

Tabella 8: Conferma del valore LLoQ nei genotipi nel plasma

Isolata (genotipo)	N	N. rilevato	Concentrazione target (log IU/mL)	Test EBV		
				Quant Assay (log IU/mL)	DS (log IU/mL)	Bias (log IU/mL)
Raji (genotipo 1)	3	3	2,56	2,84	0,12	0,3
Akata (genotipo 1)	3	3	2,56	2,95	0,11	0,4
B95-8 (genotipo 1)	3	3	2,56	2,59	0,08	0,1
AG876 (genotipo 2)	3	3	2,56	2,72	0,23	0,2
P3H1 (genotipo 2)	3	3	2,56	2,91	0,07	0,4
Jijoye (genotipo 2)	3	3	2,56	2,75	0,16	0,2

DS = deviazione standard.

Limite inferiore di quantificazione nei genotipi nel sangue intero

Il valore LLoQ stabilito utilizzando lo standard dell'OMS è stato valutato testando i genotipi EBV 1 (Raji, Akata e B95-8) e 2 (isolati AG876, P3H1 e Jijoye) addizionati a 3x LLoQ nel sangue intero umano negativo a EBV. Tre (3) replicati di ciascun elemento del pannello sono stati analizzati con un lotto di reagente. I risultati sono illustrati nella Tabella 9.

Tabella 9: Conferma del valore LLoQ nei genotipi nel sangue intero

Isolata (genotipo)	N	N. rilevato	Concentrazione target (log IU/mL)	Test EBV		
				Quant Assay (log IU/mL)	DS (log IU/mL)	Bias (log IU/mL)
Raji (genotipo 1)	3	3	3,02	3,12	0,06	0,1
Akata (genotipo 1)	3	3	3,02	2,95	0,05	0,1
B95-8 (genotipo 1)	3	3	3,02	3,09	0,11	0,1
AG876 (genotipo 2)	3	3	3,02	3,14	0,08	0,1
P3H1 (genotipo 2)	3	3	3,02	3,45	0,10	0,4
Jijoye (genotipo 2)	3	3	3,02	3,01	0,24	0,2

DS = deviazione standard.

Riconducibilità al primo standard internazionale dell'OMS

Durante lo sviluppo e la produzione del prodotto è stata impiegata una serie di standard secondari con concentrazioni note con l'obiettivo di stabilire la riconducibilità allo standard dell'OMS. Il primo standard dell'OMS per EBV è stato diluito e analizzato insieme agli standard secondari, nonché ai controlli del test e ai calibratori utilizzati nel test EBV Quant Assay Panther Fusion al fine di valutare la riconducibilità in conformità alle linee guida CLSI EP32-R¹⁰. La concentrazione degli standard secondari era compresa tra 2,30 e 6,30 log₁₀ IU/mL.

Riconducibilità allo standard dell'OMS utilizzando il plasma

Le concentrazioni analizzate per il primo standard dell'OMS per EBV erano comprese tra 2,26 e 4,70 log₁₀ IU/mL. I pannelli di plasma, gli standard secondari, i controlli e i calibratori del test dell'OMS sono stati recuperati come previsto nel range lineare del test, come è visibile nella Figura 5.

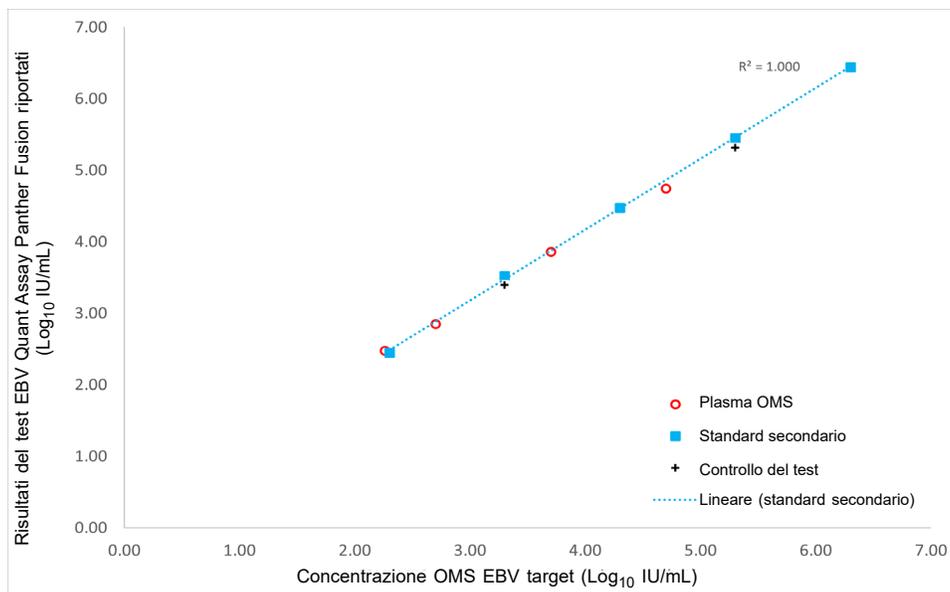


Figura 5. Riconducibilità tra le concentrazioni target del primo standard dell'OMS per EBV e le concentrazioni segnalate nel test EBV Quant Assay Panther Fusion (standard dell'OMS diluito nel plasma)

Riconducibilità allo standard dell'OMS utilizzando il sangue intero

Le concentrazioni analizzate per il primo standard dell'OMS per EBV nel sangue intero erano comprese tra 2,72 e 5,30 log₁₀ IU/mL. I pannelli di sangue intero, gli standard secondari, i controlli e i calibratori del test secondo l'OMS sono stati recuperati come previsto nel range lineare del test, come è visibile nella Figura 6.

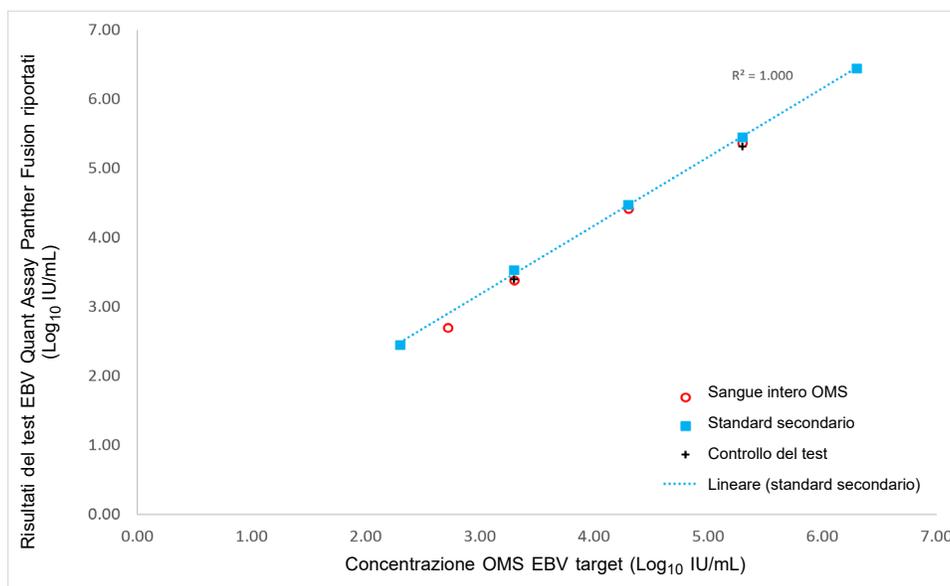


Figura 6. Riconducibilità tra le concentrazioni target del primo standard dell'OMS per EBV e le concentrazioni segnalate nel test EBV Quant Assay Panther Fusion (standard dell'OMS diluito nel sangue intero)

Precisione interna del laboratorio

Per valutare la precisione all'interno del laboratorio, è stato realizzato un pannello positivo a 3 membri diluendo il DNA di EBV in sangue intero negativo per EBV. Il pannello positivo e un campione di sangue intero negativo sono stati testati da 2 operatori utilizzando 3 lotti di reagenti su 3 Panther Fusion System in 6 giorni di test non consecutivi. Ciascun operatore ha eseguito due (2) sessioni analitiche al giorno e ciascun elemento del pannello è stato analizzato in triplicato in ciascuna sessione analitica. Lo studio è stato disegnato e analizzato secondo le raccomandazioni delle linee guida CLSI EP-05-A3¹¹.

La Tabella 10 illustra la riproducibilità dei risultati del test (in log IU/mL) per il pannello positivo tra strumenti, operatori, lotti di cartucce, sessioni analitiche, giorni, tra diverse sessioni analitiche e complessiva. La variabilità totale era principalmente dovuta alla variabilità tra i lotti. Tutti i replicati del campione negativo erano negativi.

Tabella 10: Riproducibilità del test EBV Quant Assay Panther Fusion nel sangue intero

N	Concentrazione media (log IU/mL)	Tra lotti	Tra strumenti	Tra operatori	Nello stesso giorno	Nella stessa sessione	Tra sessioni	Totale
		DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS
52	2,96	0,17	0,04	0,05	0,06	0,12	0,13	0,20
52	4,00	0,15	0,02	0,04	0,04	0,10	0,06	0,15
52	5,03	0,15	0,01	0,05	0,03	0,13	0,04	0,13

DS = deviazione standard.

Su N=54, due (2) replicati di ciascun pannello non erano validi e non erano stati testati nuovamente a causa del volume insufficiente.

Sostanze potenzialmente interferenti

La suscettibilità del test EBV Quant Assay Panther Fusion all'interferenza da parte di livelli elevati di sostanze endogene, anticoagulanti e farmaci comunemente prescritti ai pazienti sottoposti a trapianto è stata valutata in matrici negative a EBV in presenza o assenza di 2,56 log IU/mL e 3,02 log IU/mL di EBV rispettivamente nel plasma e nel sangue intero. Le concentrazioni di prova per ciascuna delle sostanze interferenti sono state selezionate sulla base dei riferimenti bibliografici disponibili e delle linee guida CLSI EP07¹² e EP37¹³.

Non è stata osservata alcuna interferenza nell'accuratezza della quantificazione del test nei campioni di plasma o di sangue intero in presenza di potenziali sostanze endogene elencate in Tabella 11.

Tabella 11: Sostanze endogene

Sostanza potenzialmente interferente	Numero di replicati	Concentrazione del test
Albumina	3	375 mg/dL
Bilirubina coniugata	3	40 mg/dL
Emoglobina	3	1.000 mg/dL
Eparina	3	0,66 mg/dL
DNA del genoma umano	3	0,2 mg/mL
Trigliceridi	3	3,45 mg/dL
Bilirubina non coniugata	3	0,40 mg/dL

Non è stata osservata alcuna interferenza nell'accuratezza della quantificazione del test in presenza di potenziali sostanze interferenti elencate in Tabella 12.

Tabella 12: Sostanze esogene

Sostanza potenzialmente interferente	Numero di replicati	Concentrazione del test
Aciclovir	3	6,6 mg/dL
Azatioprina	3	0,258 mg/dL
Cefotetano	3	71,1 mg/dL
Cidofovir	3	12,4 mg/dL
Potassio clavulanato	3	1,47 mg/mL
Ciclosporina	3	0,180 mg/dL
EDTA	3	0,099 mg/dL
Everolimus	3	0,0183 mg/dL
Fluconazolo	3	2,55 mg/dL
Foscarnet	3	108 mg/dL
Ganciclovir	3	3,96 mg/dL
Letermovir	3	3,9 mg/dL
Micofenolato mofetile	3	18,1 mg/dL
Acido micofenolico	3	18,1 mg/dL
Piperacillina	3	110 mg/dL
Prednisone	3	0,0099 mg/dL
Sirolimus	3	0,0213 mg/dL
Citrato di sodio	3	3.200 mg/dL
Sulfametossazolo	3	35,7 mg/dL
Tacrolimus	3	0,0144 mg/dL
Tazobactam sodico	3	10,2 mg/dL
Tenofovir disoproxil fumarato	3	0,0978 mg/dL
Sale disodico di ticarcillina	3	151 mg/dL
Trimetoprim	3	4,2 mg/dL
Valaciclovir	3	3,83 mg/dL
Valganciclovir	3	4,83 mg/dL
Vancomicina	3	12 mg/dL

Specificità analitica

La potenziale reattività crociata con i patogeni elencati nella Tabella 13 è stata valutata in matrici negative a EBV in presenza o assenza di 2,56 log IU/mL e 3,02 log IU/mL di EBV rispettivamente nel plasma e nel sangue intero. I patogeni sono stati analizzati alla massima concentrazione disponibile. Non è stata osservata alcuna reattività crociata o interferenza nell'accuratezza della quantificazione.

Tabella 13: Patogeni analizzati per la specificità analitica

Microrganismo/Patogeno	Concentrazione	Microrganismo/Patogeno	Concentrazione
ADV-4	1,00E+04 TCID ₅₀ /mL	Virus parainfluenzale umano	1,00E+05 IU/mL
<i>Aspergillus niger</i>	1,00E+06 CFU/mL	Influenza A	1,00E+05 IU/mL
BKV	5,00E+06 cp/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+06 cp/mL
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/mL	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,00E+06 IFU/mL	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CCU/mL
<i>Clostridium perfringens</i>	1,00E+06 cp/mL	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,00E+06 cp/mL
CMV	1,00E+05 cp/mL	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,00E+06 CFU/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E+06 CFU/mL	Rhinovirus	1,00E+06 cp/mL
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00E+06 CFU/mL	<i>Salmonella enterica</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Escherichia coli</i>	1,00E+06 CFU/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,00E+06 CFU/mL
HBV	1,00E+05 IU/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/mL
HCV	1,00E+04 IU/mL	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,00E+06 CFU/mL
HIV-1	1,00E+05 IU/mL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
HPV-18 (cellule HeLa infettate)	1,00E+05 cellule/mL	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/mL
Virus dell'herpes umano 6	1,00E+05 cp/mL	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,00E+05 trofozoiti/mL
Virus dell'herpes umano 7	1,00E+03 TCID ₅₀ /mL	Virus varicella Zoster	1,00E+05 cp/mL
Virus dell'herpes umano 8	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,00E+06 CFU/mL
Metapneumovirus umano	1,00E+03 IU/mL	Virus Zika	1,00E+05 TCID ₅₀ /mL

CCU/mL = unità modificanti colonie per mL.

CFU/mL = unità formanti colonie per mL.

cp/mL = copie per mL.

IFU/mL = unità formanti inclusioni per mL.

IU/mL = unità internazionali per mL.

TCID₅₀/mL = unità di dose infettiva delle colture tissutali per mL.

Correlazione fra metodi

Questo studio è stato progettato in conformità alle linee guida CLSI EP09c¹⁴.

Correlazione fra metodi con plasma

Le prestazioni del test EBV Quant Assay Panther Fusion sono state valutate rispetto a un test di confronto testando campioni raccolti retrospettivamente e campioni artificiali che coprivano l'intero range lineare. Per la regressione di Deming è stato utilizzato un totale di 121 campioni biologici nell'ambito del range lineare comune a entrambi i test, come mostrato nella Figura 7.

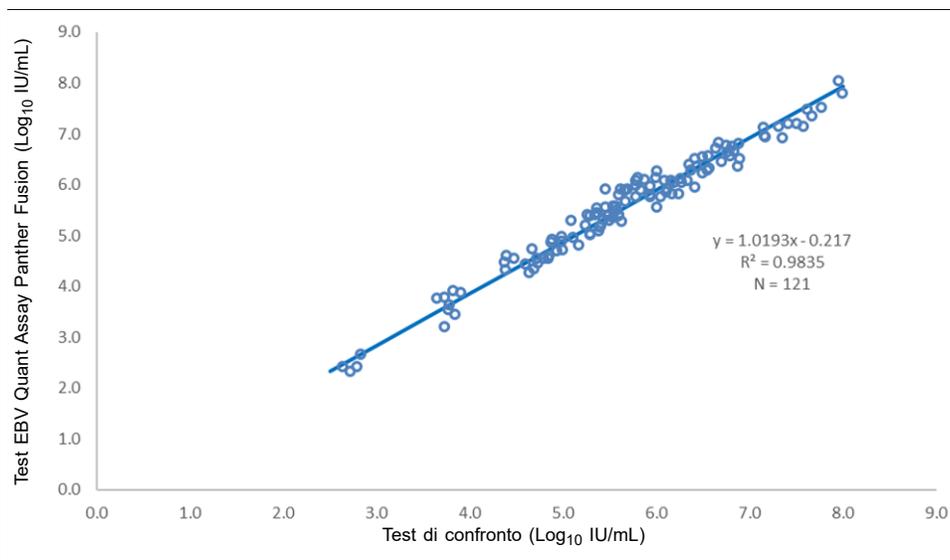


Figura 7. Correlazione tra la carica virale di EBV nel test EBV Quant Assay Panther Fusion e un test di confronto su campioni di plasma del test

Correlazione fra metodi con sangue intero

Le prestazioni del test EBV Quant Assay sono state valutate rispetto a un test di confronto testando campioni raccolti retrospettivamente e campioni artificiali che coprivano l'intero range lineare. Per la regressione di Deming è stato utilizzato un totale di 147 campioni biologici nell'ambito del range lineare comune a entrambi i test, come mostrato nella Figura 8.

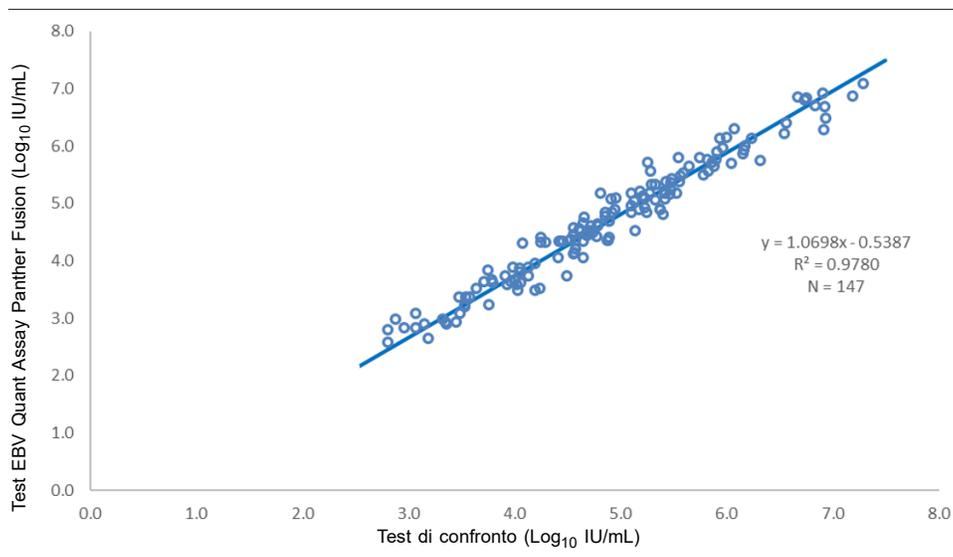


Figura 8. Correlazione tra la carica virale di EBV nel test EBV Quant Assay Panther Fusion e un test di confronto su campioni di sangue intero del test

Contaminazione/Contaminazione crociata

La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando campioni STM a cui è stato aggiunto EBV ad alto titolo ($1,5E+09$ IU/mL) disseminati fra campioni negativi a EBV in una disposizione a scacchiera. L'analisi è stata eseguita nel corso di 5 sessioni analitiche. Il tasso generale di contaminazione crociata era dello 0,67% (1/150).

Bibliografia

1. Tzellos S, Farrell PJ. 2012. Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease. *Pathogens*. 1(2):156–174. doi.org/10.3390/pathogens1020156
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. (2016). <https://www.cdc.gov/epsteinbarr/about-mono.html>
3. Kimura H, Kwong Y-L. 2019. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front. Oncol.* 9:62.
4. Nijland, ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, ten Berge JJM. 2016 *Transplantation Direct* 2016;2: e48 doi: 10.1097/TXD.0000000000000557
5. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al , on behalf of the Sixth European Conference on Infections in Leukemia, a joint venture of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), the Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), the International Immunocompromised Host Society (IHS) and the European Leukemia Net (ELN). 2016 Management of Epstein-Barr Virus Infections and Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) Guidelines. *Haematologica*. 107(7):803-811. doi:10.3324/haematol.2016.144428
6. Primo standard internazionale dell'OMS per il virus di Epstein-Barr per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NIBSC 09/260, versione 4.0).
7. Clinical & Laboratory Standards Institute. Documento M29. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Sito Web del CLSI <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29/> (4 aprile 2022)
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidelines – Second Edition. Documento CLSI EP17-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelines. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2006. Metrological Traceability and Its Implementation; A Report. CLSI document EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Interference Testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Recapiti



Diagenode S.A.
3, Rue du Bois Saint Jean
4102 Seraing, Belgium



UK Responsible Person:
Hologic Ltd.
Oaks Business Park, Crewe Road
Wythenshawe, Manchester, M23 9HZ
United Kingdom

Indirizzo sponsor australiano:
Hologic (Australia & New Zealand) Pty Ltd
Macquarie Park, NSW 2113

Per l'indirizzo e-mail e il numero di telefono dell'Assistenza tecnica e del servizio di assistenza clienti specifici del paese, visitare l'indirizzo www.hologic.com/support.

Hologic, Aptima, Panther, Panther Fusion e i relativi loghi sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri Paesi.

Quasar è un marchio commerciale registrato ed è concesso in licenza da Biosearch Technologies, Inc.

Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.

Questo prodotto potrebbe essere protetto da uno o più brevetti USA identificati nel sito www.hologic.com/patents.

©2022 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.

AW-26019-701 Rev. 001
2022-05