

Aptima™ HBV Quant Assay

Para fins de diagnóstico *in vitro*.

Apenas para exportação pelos EUA

Informações gerais	2
Utilização prevista	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	11
Transporte de espécimes	11
Panther System	12
Reagentes e materiais fornecidos	12
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente	14
Materiais opcionais	15
Procedimento de teste no Panther System	15
Notas sobre o procedimento	20
Controlo de qualidade	21
Calibração do ensaio	21
Controlos negativo e positivo	21
Calibrador interno/controlo interno	21
Interpretação dos resultados	22
Limitações	22
Desempenho	23
Limite de deteção utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS	23
Limite de deteção em vários genótipos do HBV	24
Intervalo linear	25
Linearidade nos vários genótipos do HBV	26
Limite inferior de quantificação utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS	26
Determinação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do HBV	28
Reprodutibilidade	30
Substâncias potencialmente interferentes	31
Especificidade	33
Especificidade analítica	33
Repetibilidade de espécimes clínicos	34
Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes	35
Correlação de métodos	37
Contaminação por transferência	37
Bibliografia	38

Informações gerais

Utilização prevista

O Aptima HBV Quant Assay (Ensaio do Aptima HBV Quant) é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* para a quantificação do DNA do vírus da hepatite B (HBV) em plasma e soro humano, no Panther™ System totalmente automatizado.

O plasma pode ser preparado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), solução de anticoagulante de citrato e dextrose (ACD) e tubos de preparação de plasma (PPTs). O soro pode ser preparado em tubos de soro e tubos de separação de soro (SSTs). Os espécimes são testados utilizando o Panther System totalmente automatizado para processamento, amplificação e quantificação de amostras. Os espécimes com os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H do HBV estão validados para quantificação no ensaio.

O Aptima HBV Quant Assay é indicado para utilização como um auxiliar no controlo de pacientes com infeções crónicas do HBV que estejam a seguir uma terapia de medicamentos antivirais HBV. O ensaio pode ser utilizado para medir os níveis de DNA do HBV na linha basal e durante o tratamento para auxiliar na avaliação da resposta viral ao tratamento. Os resultados do Aptima HBV Quant Assay devem ser interpretados no contexto de todas as descobertas relevantes clínicas e laboratoriais.

O Aptima HBV Quant Assay não se destina a ser utilizado como teste de rastreio de sangue ou de produtos sanguíneos para o HBV ou como teste de diagnóstico para confirmar a presença de infeção por HBV.

Resumo e explicação do teste

O vírus da hepatite B (HBV), um de diversos vírus considerados como causadores de hepatite, está na origem da infeção crónica por HBV, cirrose hepática, cancro do fígado, insuficiência hepática e, possivelmente, morte. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica o HBV como uma das doenças infecciosas mais comuns do mundo. A prevalência da infeção por HBV e o método de transmissão variam de forma significativa por todo o mundo. Cerca de um terço da população mundial apresenta evidências serológicas de infeção passada ou presente por HBV, observando-se a presença de uma infeção crónica por HBV em mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo.^{1,2,3} A infeção por HBV resulta num maior risco de descompensação hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), com uma taxa de mortalidade de 0,5 a 1,2 milhões de mortes e 5-10% de casos de transplante hepático a nível mundial todos os anos.^{4,5} Sem um tratamento, uma intervenção e uma monitorização adequados após o diagnóstico, a incidência cumulativa de 5 anos de cirrose varia entre os 8-20%. Após o desenvolvimento de cirrose, o risco anual de carcinoma hepatocelular (CHC) é de 2-5%.⁶

O HBV possui um genoma do DNA circular, parcialmente em cadeia dupla de aproximadamente 3200 pares de bases, que codificam quatro grelhas de leitura abertas (ORF) parcialmente sobrepostas que expressam a polimerase, a superfície, o pré-core/core e as proteínas X. A ORF da polimerase sobrepõe-se às restantes 3 ORFs e codifica uma proteína chave da replicação viral, a polimerase. A ORF da superfície expressa três proteínas, essenciais para a morfogénese viral, a entrada do vírus nos hepatócitos, e que provocam a resposta imunitária do portador.⁷ Existem 8 genótipos (A-H) do HBV, os quais estão normalmente presentes em localizações geográficas distintas. Atualmente, a quantificação do DNA do HBV é utilizada para determinar que pacientes com infeção crónica devem ser tratados, para monitorizar a resposta à terapia e para avaliar reações na carga viral que possam indicar resistência aos fármacos.⁵

O Aptima HBV Quant Assay é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* que utiliza a tecnologia de amplificação mediada por transcrição (TMA) em tempo real do Panther System para quantificar o DNA do HBV, nos genótipos A, B, C, D, E, F, G e H. O Aptima HBV Quant Assay destina-se a duas regiões altamente conservadas dos genes da polimerase e de superfície (para maior tolerância a eventuais mutações). O ensaio está padronizado de acordo com o 3º Padrão Internacional da OMS para o vírus da hepatite B (código NIBSC: 10/264).

Princípios do procedimento

O Aptima HBV Quant Assay envolve três passos principais que decorrem todos num único tubo do Panther System: captura do alvo, amplificação do alvo por TMA e detecção dos produtos da amplificação (amplicon) através de sondas com marcadores fluorescentes.

Durante a captura do alvo, o DNA viral é isolado dos espécimes. O espécime é tratado com um detergente para solubilizar o invólucro viral, desnaturar as proteínas e libertar o DNA genómico viral. Os oligonucleótidos de captura são hibridados com regiões altamente conservadas do DNA do HBV, caso estejam presentes no espécime que está a ser testado. O alvo hibridado é depois capturado por micropartículas magnéticas que são separadas do espécime num campo magnético. Os passos de lavagem removem componentes estranhos do tubo de reação.


A amplificação do alvo ocorre via TMA, que é um método de amplificação de ácidos nucleicos baseado na transcrição que utiliza duas enzimas: a transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina de Moloney) e a T7 RNA polimerase. A transcriptase reversa é utilizada para criar uma cópia de DNA (com uma sequência promotora para a T7 RNA polimerase) da sequência-alvo. A T7 RNA polimerase produz várias cópias do produto da amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA. O Aptima HBV Quant Assay utiliza o método da TMA para amplificar duas regiões do genoma do HBV (o gene da polimerase e o gene de superfície). A amplificação dessas regiões é obtida através de “primers” específicos concebidos para amplificar os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H do HBV. A abordagem de região-alvo dupla e o design do “primer” direcionado para regiões altamente conservadas asseguram a quantificação precisa do DNA do HBV.

A detecção é conseguida utilizando sondas fluorescentes de ácidos nucleicos de cadeia simples, que estão presentes durante a amplificação do alvo, e que se hibridam 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 hibridada 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 da amplificação, o agente de extinção é ainda mais afastado do fluoróforo e emite um sinal num determinado comprimento de onda quando excitado por uma fonte de luz. À medida que uma maior quantidade de sondas fluorescentes se hibrida com o produto da 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 HBV. Cada reação 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 software do Panther System utilizando os sinais do HBV e do IC para cada reação e comparando-os com as informações da calibração.

Advertências e precauções

- A. Apenas para fins de diagnóstico *in vitro*.
- B. Para reduzir o risco de resultados inválidos, leia atentamente todo o folheto informativo e o *Manual de instruções do Panther System* antes de executar este ensaio.
- C. O reagente estimulador do alvo (TER) qHBV é corrosivo. Consulte “Relacionadas com o ensaio” na página 5 para ver a lista de avisos completa.

**Relacionadas com o laboratório**

-  D. **PRECAUÇÃO:** Os controlos deste ensaio contêm plasma humano. O plasma é negativo para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpos anti-HCV, anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, e antigénio HIV quando testados com procedimentos licenciados pela Agência dos Medicamentos e Alimentos dos EUA. Além disso, o plasma não é reativo para o DNA do HBV, 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.^{8,9,10}
- E. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima HBV Quant Assay e no manuseamento de materiais infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- F. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- G. Tome 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, proteção 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.
- H. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento devem ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).
- I. Elimine todos os materiais que tenham estado em contacto com espécimes e reagentes de acordo com os regulamentos nacionais, internacionais e regionais aplicáveis.^{8,9,10,11} Limpe e desinfete minuciosamente todas as superfícies de trabalho.
- J. 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.
- K. As 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 uma zaragatoa com ponta de algodão e junte-a com um Tubo de Alíquotas de Espécime Aptima (SAT).
 - 2. Identifique adequadamente cada SAT.
 - 3. Encha cada SAT com 1 ml de diluente de espécimes Aptima.

4. Para colher amostras de superfície, 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





- L. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize as Precauções universais^{8,9,10} quando executar este ensaio. Devem estabelecer-se métodos de manuseamento e de eliminação adequados, de acordo com os regulamentos nacionais, internacionais e regionais aplicáveis.¹¹ Este procedimento só deve ser executado por pessoal devidamente qualificado na utilização do Aptima HBV Quant Assay e no manuseamento de materiais infecciosos.
- M. 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.
- N. 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 estas entrarem em contacto com o espécime.

Relacionadas com o ensaio

- O. Não utilize o kit de reagentes, o calibrador, nem os controlos após o prazo de validade.
- P. Não troque, misture, nem combine reagentes do ensaio de kits com números de lote mestre diferentes. Os fluidos do ensaio podem pertencer a números de lote diferentes. Os controlos e o calibrador podem pertencer a diferentes números de lote.
- Q. Evite a contaminação microbiana ou com nuclease dos reagentes.
- R. Tape e conserve todos os reagentes do ensaio às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afetado pela utilização de reagentes conservados de forma incorreta. Consulte as secções *Requisitos de 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. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- T. Evite o contacto do reagente estimulador do alvo com a pele, os olhos e as membranas mucosas. Lave a área afetada com água em caso de contacto com este reagente. Se ocorrerem derrames deste reagente, dilua com água e siga os procedimentos adequados do local.

U. 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.


	<p>HBV VL Kit Controls <i>Azoteto de sódio 0,2%</i> <i>Human Serum 95-100%</i></p>
	<p>ATENÇÃO 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 luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial</p>
	<p>Target Enhancer Reagent <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 5-10%</i></p>
	<p>PERIGO H302 - Nocivo por ingestão H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P303 + P361 + P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche P305 + P351 + P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar P310 - Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico</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 qHBV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente de amplificação qHBV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente enzimático qHBV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente enzimático qHBV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente promotor qHBV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente promotor qHBV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente de captura do alvo qHBV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
qHBV PCAL (calibrador positivo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHBV NC CONTROL – (controlo negativo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHBV LPC CONTROL + (controlo positivo baixo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHBV HPC CONTROL + (controlo positivo alto)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
Reagente estimulador do alvo qHBV	15 °C a 30 °C	15 °C a 30 °C	30 dias ^a

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

- B. Deite fora quaisquer reagentes reconstituídos, reagente de captura do alvo (TCR) e reagente estimulador do alvo (TER) não usados, após 30 dias ou após a data de validade do lote mestre, 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 deve estar límpida, ou seja, sem turvação ou precipitados.
-  E. O reagente promotor e o reagente promotor reconstituído são fotossensíveis. Proteja estes reagentes da luz durante a conservação e a preparação para utilização.
- F. O reagente estimulador do alvo qHBV deve estar a uma temperatura situada entre 15 °C e 30 °C antes de ser utilizado.

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

- Tubos com anticoagulantes EDTA ou ACD
- Tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPTs)
- Tubos de soro
- Tubos de separação de soro (Serum Separator Tubes, SSTs)

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

A. Colheita de espécimes

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. Separe o plasma ou o soro dos glóbulos vermelhos aglomerados seguindo as instruções do fabricante do tubo utilizado. O plasma ou 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 for transferido para um tubo secundário, o plasma ou o soro pode ser congelado a -20 °C. Não exceda 3 ciclos de congelamento/descongelamento. 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

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. O plasma pode ser conservado numa das seguintes condições:

- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário de 2 °C a 30 °C até um máximo de 24 horas,
- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário de 2 °C a 8 °C até um máximo de 5 dias,
- No tubo secundário a -20 °C até um máximo de 60 dias.

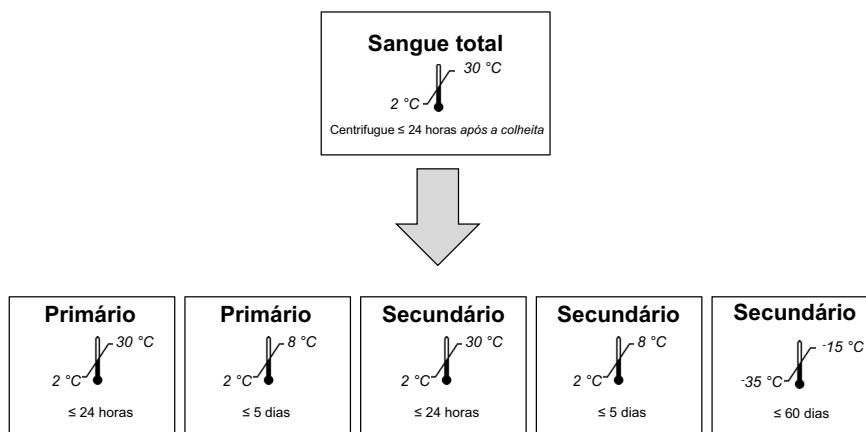


Figura 1. Condições de armazenamento dos tubos EDTA/ACD

2. Espécimes de PPT

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. O plasma pode ser conservado numa das seguintes condições:

- No PPT ou no tubo secundário de 2 °C a 30 °C até um máximo de 24 horas,
- No PPT ou no tubo secundário de 2 °C a 8 °C até um máximo de 5 dias,
- No PPT ou no tubo secundário a -20 °C até um máximo de 60 dias.

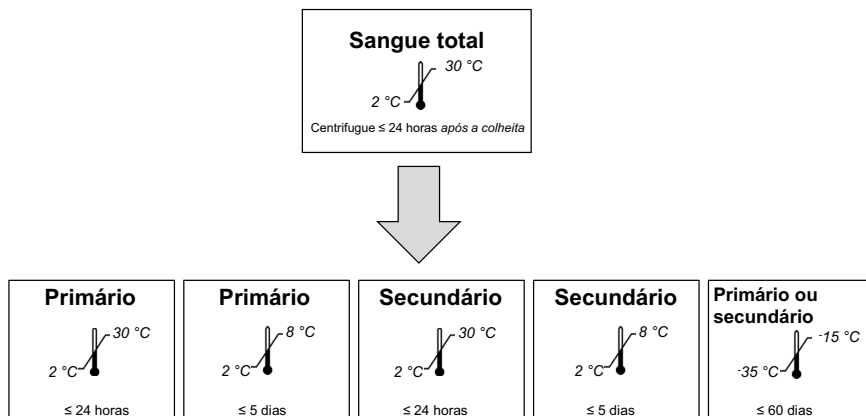


Figura 2. Condições de conservação dos PPTs

3. Espécimes no tubo de soro

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. O soro pode ser conservado numa das seguintes condições:

- No tubo de soro ou no tubo secundário de 2 °C a 30 °C até um máximo de 24 horas,
- No tubo de soro ou no tubo secundário de 2 °C a 8 °C até um máximo de até 5 dias,
- No tubo secundário a -20 °C até um máximo de 60 dias.

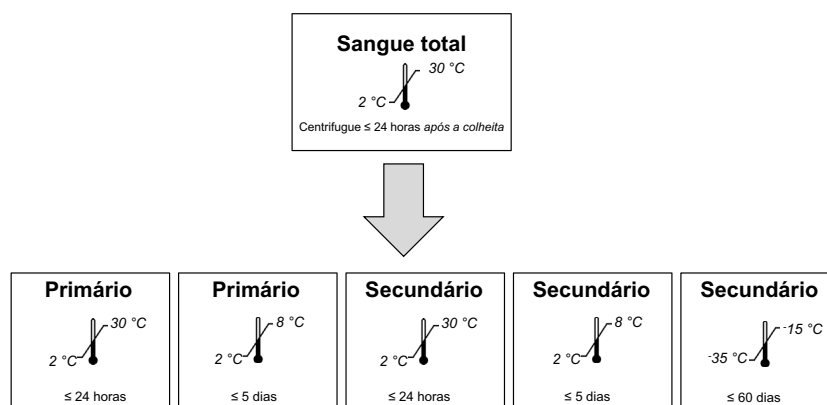


Figura 3. Condições de conservação dos tubos de soro

4. Espécimes em SST

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e deve ser centrifugado no prazo de 24 horas após a colheita do espécime. O soro pode ser conservado numa das seguintes condições:

- No SST ou no tubo secundário de 2 °C a 30 °C até um máximo de 24 horas,
- No SST ou no tubo secundário de 2 °C a 8 °C até um máximo de 5 dias,
- No SST ou no tubo secundário a -20 °C até um máximo de 60 dias.

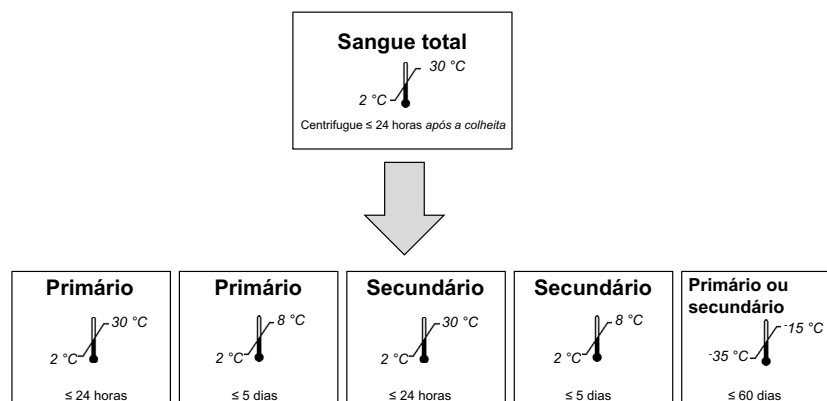


Figura 4. Condições de conservação dos SSTs

C. Conservação em congelamento de longo prazo

As amostras de plasma ou de soro podem ser armazenadas a uma temperatura situada entre -65 °C e -85 °C até um máximo de 60 dias em SATs.

D. Diluição de espécimes de plasma e soro

Os espécimes de plasma e soro podem ser diluídos no SAT ou num tubo secundário para teste no Panther System. Consulte *Procedimento de teste no Panther System*, parágrafo E "Manuseamento de espécimes", passo 6 para obter mais informações.

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

Amostras dentro do Panther System

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

Transporte de espécimes

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

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

Panther System

Os reagentes do Aptima HBV Quant Assay para o Panther System são 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.

Kit do Aptima HBV Quant Assay, 100 testes (Código de produto PRD-03424)
(1 caixa de ensaio, 1 kit de calibrador, 1 kit de controlos e 1 caixa de reagente estimulador do alvo)98

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

Caixa do Aptima HBV Quant Assay

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

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

Kit do calibrador do Aptima HBV Quant (Código de produto PRD-03425)
(conservar a uma temperatura de -15 °C a -35 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
PCAL	Calibrador positivo qHBV <i>DNA plasmidial em solução tamponada</i>	5 x 2,5 ml
	Etiqueta de código de barras do calibrador	—

Kit de controlos do Aptima HBV Quant (Código de produto PRD-03426)
(conservar a uma temperatura de -15 °C a -35 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
NC	Controlo negativo qHBV <i>Plasma humano desfibrinado HBV negativo com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 ml
LPC	Controlo positivo baixo qHBV <i>Plasma HBV positivo inativado em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 ml
HPC	Controlo positivo alto qHBV <i>Plasma HBV positivo inativado em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 ml
	Etiqueta de código de barras do controlo	—

Caixa de reagente estimulador do alvo do Aptima HBV Quant
(conservar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
TER	Reagente estimulador do alvo qHBV <i>Uma solução concentrada de solução de hidróxido de lítio</i>	1 x 46,0 ml

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 em tempo real)	PRD-03455 (5000 testes)
<i>Kit de fluidos do Aptima Assay (também conhecido como Kit de fluidos universais)</i>	303014 (1000 testes)
<i>contém solução de lavagem Aptima, tampão Aptima para o fluido de desativação e reagente de óleo Aptima</i>	
<i>Unidades Multitubos (Multi-Tube Units, MTUs)</i>	104772-02
<i>Kit de saco de resíduos Panther</i>	902731
<i>Tampa do recipiente de resíduos Panther</i>	504405
Kit de execução do Panther System	303096 (5000 testes)
<i>(para executar ensaios TMA diferidos em paralelo com ensaios TMA em tempo real)</i>	
<i>contém MTUs, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, Auto Detect e fluidos de ensaio</i>	
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 de substituição para reagentes	
<i>Frascos de reconstituição de amplificação, do reagente enzimático e do reagente promotor CL0041 (100 tampas)</i>	
<i>Frasco de TCR</i>	CL0040 (100 tampas)
<i>Frasco de TER</i>	501604 (100 tampas)
Coberturas de bancada laboratorial revestidas a plástico	—
Toalhetes que não larguem pêlos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubo de colheita primário:	
<i>13 mm x 100 mm</i>	—
<i>13 mm x 75 mm</i>	—
<i>16 mm x 100 mm</i>	—
Centrífuga	—
Misturador vortex	—

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 de Aliquotas de Espécime Aptima (SATs) (100 conjuntos)</i>	503762
Tampa para tubos de transporte (100 conjuntos) <i>tampa para SAT</i>	504415
Diluyente de espécimes Aptima	PRD-03003
Kit de diluyente de espécimes Aptima <i>contém diluyente de espécimes, 100 SATs e 100 tampas</i>	PRD-03478
Pipetas de transferência	—
Painéis disponíveis no mercado, por exemplo: <i>Painéis HBV de controlo de qualidade para diagnóstico molecular (QCMD)</i>	—
Zaragatoas com ponta de algodão	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—

Procedimento de teste no Panther System

Nota: Consulte o Manual de instruções do Panther System para obter 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 enxagúe com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada 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 de limpeza supramencionado (passo A.1).

B. Preparação do calibrador e dos controlos

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

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

Opção. Os tubos do calibrador e de 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 controles. A espuma compromete o sensor de nível do Panther System.

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

C. Reconstituição/preparação dos reagentes de um novo kit

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

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

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

- c. Antes da utilização, assegure-se de que todo o precipitado está dissolvido e que as partículas magnéticas estão em suspensão.
2. Para reconstituir o reagente de amplificação, o reagente enzimático e o reagente promotor, proceda da seguinte forma:
 - a. Remova os reagentes liofilizados e as soluções de reconstituição correspondentes da conservação (2 °C a 8 °C). Emparelhe cada solução de reconstituição com o respetivo reagente liofilizado.
 - b. Certifique-se de que a solução de reconstituição e os reagentes liofilizados têm cores de rótulo correspondentes. Verifique os números do lote na Ficha de Códigos de Barras do Lote Mestre para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados.
 - i. Abra o frasco de reagente liofilizado removendo o selo metálico e a rolha de borracha.
 - ii. Insira com firmeza a extremidade ranhurada do aro de reconstituição (preto) no frasco (Figura 5, passo 1).
 - iii. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
 - iv. Coloque o frasco da solução de reconstituição numa superfície estável (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. Remova cuidadosamente o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 6).
- e. Volte a colocar a tampa do frasco. Grave as iniciais do operador e a data de reconstituição na etiqueta (Figura 5, passo 7).
- f. Elimine o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 8).

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

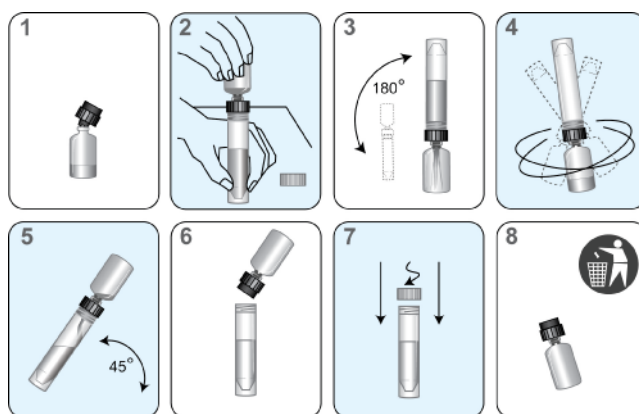


Figura 5. Processo de reconstituição de reagentes

3. Remova o reagente estimulador do alvo qHBV da conservação (15 °C a 30 °C). Registe as iniciais do operador e a data de abertura na etiqueta. Verifique o número de lote no frasco de TER para se certificar de que corresponde ao número de lote da folha do código de barras do lote mestre.
- D. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos
1. Remova os reagentes previamente preparados da conservação (2 °C a 8 °C). 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.
 2. Remova o TER da conservação (15 °C a 30 °C).
 3. No caso de TCR previamente preparado, execute o passo C.1 anterior antes de colocá-lo no sistema.
 4. Misture bem os reagentes de amplificação, enzimático e promotor girando-os e invertendo-os antes de os colocar no sistema. Evite criar espuma excessiva quando inverter os reagentes.

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 correctamente de acordo com Colheita e conservação de espécimes na página 8.
2. Certifique-se de que os espécimes congelados são totalmente descongelados. Coloque no vortex 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 *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 remova as tampas. A existência de bolhas no tubo pode comprometer a detecção de nível do Panther System.

Consulte *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 a 1:3 num SAT ou a 1:100 num tubo secundário.

Um espécime pode ser diluído num tubo secundário para teste no Panther System.

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

a. Diluição de espécimes de volume reduzido

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

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

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

b. Diluição de espécimes de titulação alta

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

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

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

Nota: *Para espécimes diluídos com concentrações puras acima do ULoQ (limite superior de quantificação), os resultados serão elaborados utilizando notação científica.*

F. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther System* e da 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 respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibrador e controlos):

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

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

- b. Carregue o tubo de amostra no respetivo suporte.
- c. Repita os passos 2.a e 2.b para cada amostra restante.
- d. Depois de as amostras terem sido carregadas no suporte de amostras, remova e elimine a tampa de cada tubo de amostra num suporte de amostras. Para evitar a contaminação, não passe uma tampa sobre quaisquer outros suportes de amostras ou tubos de amostras.
- e. Se necessário, use uma pipeta de transferência descartável e nova para remover quaisquer bolhas ou espuma.
- f. 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 de qHBV, o controlo positivo baixo de qHBV, o controlo positivo alto de qHBV e os tubos de controlo negativo de qHBV podem ser carregados em qualquer posição no suporte de amostras e em qualquer corredor da zona de amostras do Panther System. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
 - a. O calibrador e os controlos estão atualmente a serem processados pelo sistema.
 - b. Os resultados válidos para os controlos e calibrador são registados no sistema.
2. Depois dos tubos de controlo e do calibrador terem sido pipetados e estarem a ser processados pelo kit de reagente do Aptima HBV Quant Assay, os espécimes podem ser testados com o kit reconstituído associado até um máximo de 24 horas, **a não ser que:**
 - a. O calibrador ou resultados do controlo sejam inválidos.
 - b. O respetivo kit de reagente do ensaio seja removido do sistema.
 - c. O respetivo kit de reagente do ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. O calibrador e cada tubo de controlo só podem ser usados uma única vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez podem dar origem a erros de processamento.

B. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó 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 de reagente é carregado no Panther System. Depois de estabelecida, a calibração é válida durante um máximo de 24 horas. O software do Panther System alerta o operador quando uma calibração for necessária. O operador lê um coeficiente de calibração que se encontra na folha de códigos de barras do lote mestre fornecida com cada kit de reagente.

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

Controlos negativo e positivo

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

Durante o processamento, os critérios de aceitação dos controlos são automaticamente verificados pelo software do Panther System. Para gerar resultados válidos, o controlo negativo deve apresentar um resultado de “Não detetado” e os controlos positivos devem obter resultados dentro dos parâmetros predefinidos (alvo nominal do LPC: $2,7 \log_{10}$ UI/ml, alvo nominal do HPC: $4,6 \log_{10}$ UI/ml). Se algum dos controlos tiver um resultado inválido, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras de uma execução invalidada devem ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

Calibrador interno/controlo interno

Cada amostra contém um calibrador interno/controlo interno (internal control, IC). Durante o processamento, os critérios de aceitação do IC são automaticamente verificados pelo software do Panther System. Se um resultado de IC for inválido, o resultado da amostra é invalidado. É necessário repetir o teste de cada amostra com um resultado de IC inválido para obter um resultado válido.

O software do Panther System foi concebido para verificar com precisão os processos quando os procedimentos são efetuados de acordo com as instruções fornecidas neste folheto informativo e no *Manual de instruções do Panther System*.

Interpretação dos resultados

O Panther System determina automaticamente a concentração de DNA do HBV para espécimes e controlos mediante a comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de DNA do HBV são apresentadas em UI/ml e \log_{10} UI/ml. A interpretação de resultados é fornecida na Tabela 1. Se a opção de diluição for utilizada para espécimes diluídos, o Panther System calcula automaticamente a concentração do HBV para o espécime não diluído, multiplicando a concentração diluída pelo fator de diluição, e as amostras diluídas são assinaladas como diluídas.

Nota: No caso de espécimes diluídos, os resultados indicados como “Não detetados” ou “Detetado < 10” podem ser gerados pela diluição de um espécime com uma concentração superior, mas próxima do LoD (limite de deteção) 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.

Tabela 1: Interpretação de resultados

Resultado do Aptima HBV Quant Assay apresentado		Interpretação
UI/ml	Valor \log_{10} ^a	
Não detetado	Não detetado	DNA do HBV não detetado.
Detetado < 10	< 1,0	Foi detetado DNA do HBV, mas a um nível inferior ao LLoQ
10 a 1.000.000.000	1,0 a 9,0	A concentração de DNA do HBV situa-se dentro do intervalo linear de 10 a 1.000.000.000 UI/ml
> 1.000.000.000	> 9,0	A concentração de DNA do HBV está acima do ULoQ (limite superior de quantificação)
Inválido ^b	Inválido ^b	Houve um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

^a O valor é truncado para duas casas decimais.

^b Os resultados inválidos são apresentados em letra de cor azul.

Nota: Para espécimes diluídos com concentrações puras acima do ULoQ (limite superior de quantificação), os resultados serão elaborados utilizando notação científica.

Limitações

- A utilização deste ensaio está limitada a pessoal que tenha recebido formação relativa ao procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto informativo pode levar a resultados erróneos.
- A fiabilidade dos resultados depende da colheita, transporte, conservação e processamento de espécimes adequados.
- Apesar de ser raro, poderão ocorrer mutações em regiões altamente conservadas do genoma viral abrangido pelos “primers” e/ou sondas do Aptima HBV Quant Assay, que poderão resultar na subquantificação do vírus ou na falha de deteção do vírus.

Desempenho**Limite de detecção utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS**

O limite de detecção (LoD) do ensaio é definido como a concentração de DNA do HBV que é detectada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹²

O LoD foi determinado através do teste de painéis de acordo com o 3º Padrão Internacional da OMS para o DNA do vírus da hepatite B (NIBSC 10/264) diluído em plasma e soro humano HBV negativo. Testaram-se um mínimo de 36 réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 108 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 2 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Aptima HBV Quant Assay utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS é 5,58 UI/ml para o plasma e de 4,29 UI/ml para o soro.

Tabela 2: Limite de detecção utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS para o HBV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)	
	Plasma	Soro
10%	0,16	0,19
20%	0,27	0,30
30%	0,39	0,42
40%	0,55	0,56
50%	0,75	0,73
60%	1,02	0,96
70%	1,42	1,29
80%	2,09	1,81
90%	3,58	2,91
95%	5,58	4,29

Limite de detecção em vários genótipos do HBV

O LoD foi determinado através do teste de diluições de espécimes clínicos HBV positivos para os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H em plasma e soro humano HBV negativo. As concentrações foram determinadas utilizando o ensaio do comparador com a marca CE e licenciado pela Health Canada. Testaram-se um mínimo de 24 réplicas de cada membro do painel com cada um dos dois lotes de reagentes, para um mínimo de 48 réplicas por membro do painel. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos de 50% e 95%. Os valores de LoD mostrados na Tabela 3 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado.

Tabela 3: Limite de detecção em vários genótipos do HBV utilizando espécimes clínicos

Genótipo	Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)	
		Plasma	Soro
A	50%	0,48	0,88
	95%	3,05	3,95
B	50%	0,59	0,69
	95%	3,00	4,97
C	50%	0,79	0,93
	95%	5,32	4,78
D	50%	0,82	1,37
	95%	4,61	7,29
E	50%	0,93	1,01
	95%	4,80	4,90
F	50%	0,75	0,69
	95%	3,13	3,30
G	50%	0,52	0,62
	95%	2,86	3,05
H	50%	1,05	1,36
	95%	6,44	6,31

Intervalo linear

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do DNA do HBV diluído em soro e plasma humano HBV negativo, de acordo com a norma CLSI EP06-A.¹³

A concentração dos painéis variou entre 0,86 log UI/ml e 9,26 log UI/ml. O Aptima HBV Quant Assay demonstrou linearidade no intervalo testado, com um limite superior de quantificação (ULoQ) de 9 log UI/ml, conforme mostrado na Figura 6.

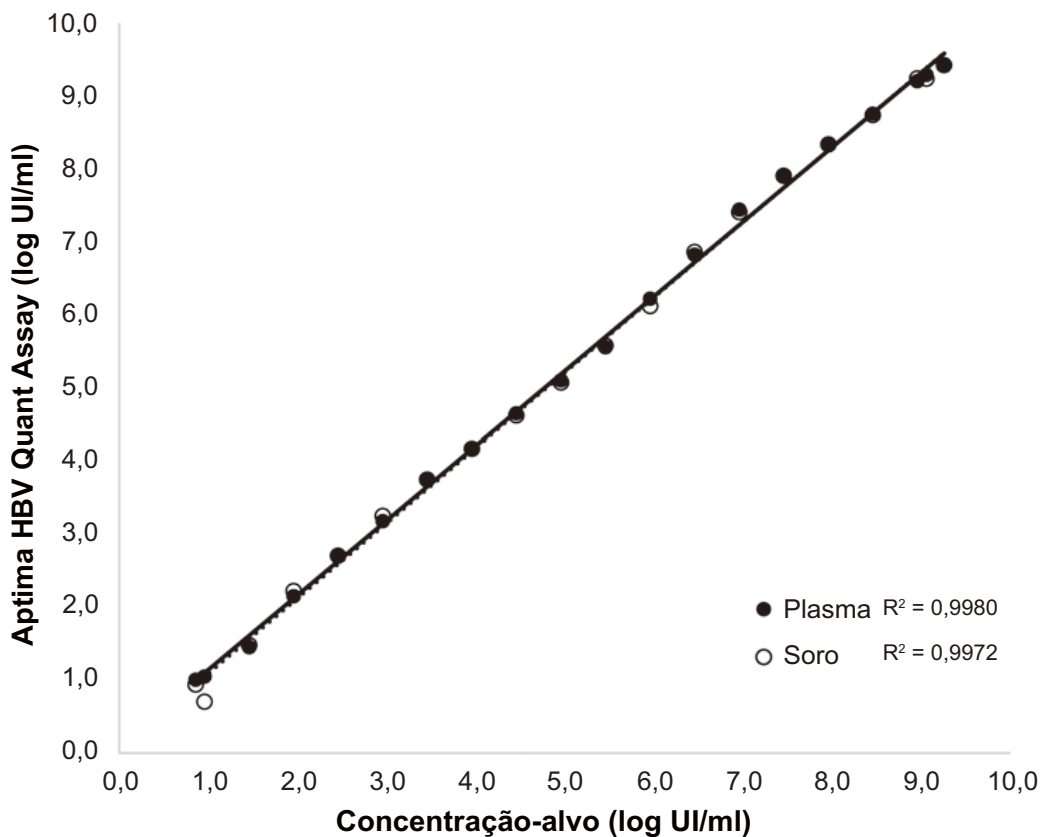


Figura 6. Linearidade no plasma e soro

Linearidade nos vários genótipos do HBV

A resposta linear para os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H foi confirmada através do teste de painéis de DNA do HBV diluídos em tampão, em concentrações situadas entre 1,44 log UI/ml e 8,44 log UI/ml. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo testado para todos os genótipos testados, conforme mostrado na Figura 7.

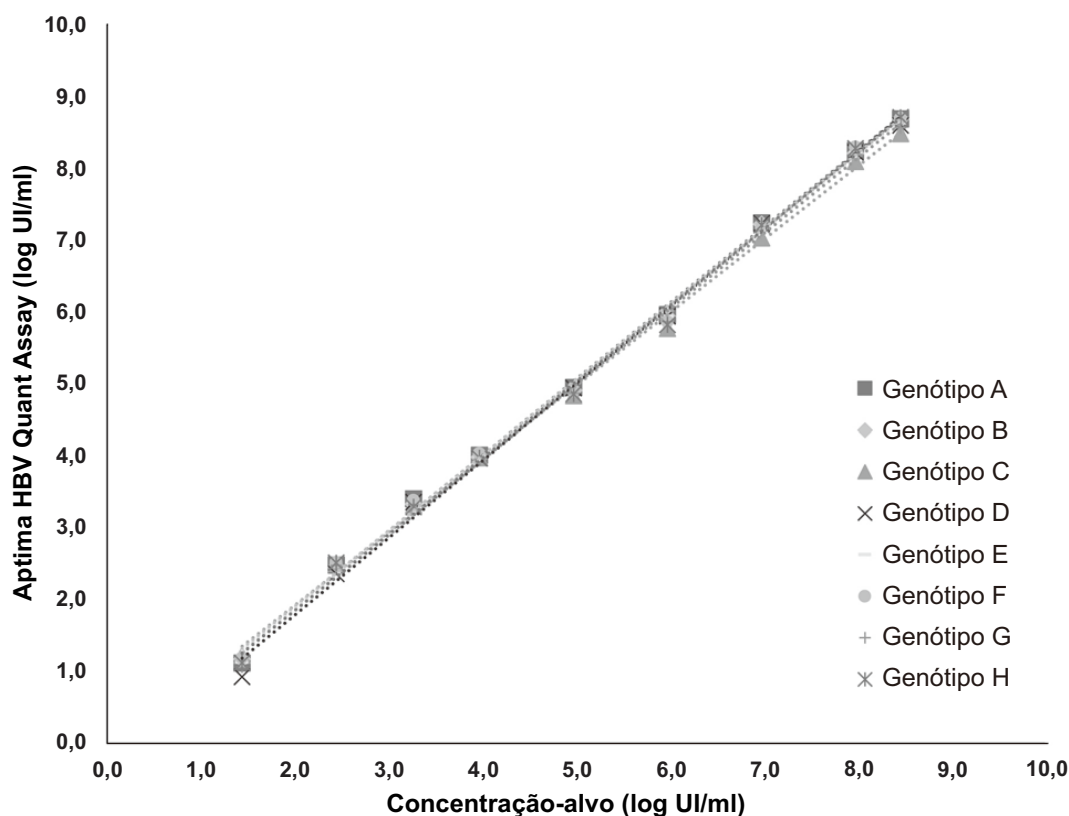


Figura 7. Linearidade nos genótipos A a H do HBV

Limite inferior de quantificação utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS

O limite inferior de quantificação (LLoQ) é definido como a concentração mais baixa na qual o DNA do HBV é quantificado com fiabilidade dentro de um erro total, de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹² O erro total foi calculado utilizando dois métodos: Erro analítico total (EAT) = |desvio sistemático| + 2 DP e Erro total (ET) = SQRT(2) x 2 DP. Para garantir a exatidão e a precisão das medições, o erro total do Aptima HBV Quant Assay foi definido para 1 log UI/ml (ou seja, no LLoQ, a diferença entre duas medições superior a 1 log UI/ml é estatisticamente significativa).

O LLoQ foi determinado através do teste de painéis de acordo com o 3º Padrão Internacional da OMS para o DNA do vírus da hepatite B (NIBSC 10/264)¹⁴ diluído em plasma e soro humano HBV negativo. Testaram-se um mínimo de 45 réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 135 réplicas por diluição. Os resultados do lote de reagente com a concentração mais alta de acordo com os requisitos de ET e EAT são apresentados na Tabela 6. O LLoQ calculado para o 3º Padrão Internacional da OMS para o vírus da Hepatite B é de 4,80 UI/ml no plasma e de 6,34 UI/ml no soro.

Tabela 4: Determinação do LLoQ utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS para o HBV diluído em plasma

Lote de reagente	Concentração-alvo		Aptima HBV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado	EAT calculado
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	7	0,85	0,63	0,27	0,22	0,75	0,75
	8	0,90	0,68	0,28	0,22	0,78	0,77
	9	0,95	0,79	0,25	0,17	0,70	0,66
2	7	0,85	0,48	0,20	0,37	0,57	0,77
	8	0,90	0,47	0,18	0,44	0,51	0,79
	9	0,95	0,61	0,19	0,34	0,54	0,73
3	7	0,85	0,53	0,21	0,32	0,59	0,74
	8	0,90	0,52	0,21	0,38	0,61	0,81
	9	0,95	0,70	0,23	0,25	0,65	0,71

DP=desvio padrão

Tabela 5: Determinação do LLoQ utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS para o HBV diluído em soro

Lote de reagente	Concentração-alvo		Aptima HBV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado	EAT calculado
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
1	7	0,85	0,77	0,38	0,08	1,06	0,83
	8	0,90	0,80	0,31	0,10	0,88	0,72
	9	0,95	0,91	0,27	0,05	0,77	0,59
2	7	0,85	0,57	0,20	0,28	0,57	0,68
	8	0,90	0,70	0,22	0,20	0,63	0,64
	9	0,95	0,69	0,23	0,27	0,66	0,73
3	7	0,85	0,65	0,24	0,20	0,67	0,67
	8	0,90	0,65	0,24	0,25	0,68	0,73
	9	0,95	0,67	0,22	0,28	0,63	0,73

DP=desvio padrão

Tabela 6: Resumo do LLoQ calculado utilizando o 3º Padrão Internacional da OMS para o HBV

Lote de reagente	LLoQ do plasma		LLoQ do soro	
	(log UI/ml)	(UI/ml)	(log UI/ml)	(UI/ml)
1	0,68	4,80	0,80	6,34
2	0,61	4,09	0,57	3,72
3	0,52	3,34	0,65	4,51

DP=desvio padrão

Determinação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do HBV

O LLoQ foi determinado através do teste de diluições de espécimes clínicos HBV positivos para os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H em plasma e soro humano HBV negativo. Testaram-se um mínimo de 36 réplicas de cada membro do painel com cada um dos dois lotes de reagentes, para um mínimo de 72 réplicas por membro do painel. Os resultados do lote de reagentes com a concentração mais alta que cumpre o objetivo de exatidão ($ET \leq 1 \log \text{ UI/ml}$ e $EAT \leq 1 \log \text{ UI/ml}$) com uma detecção de 100% são apresentados na Tabela 7 para o plasma e na Tabela 8 para o soro. Os resultados da concentração mais baixa que cumpriu o objetivo de exatidão com uma detecção de 100% são apresentados a sombreado em ambas as tabelas e são resumidos na Tabela 9. O LLoQ calculado para os genótipos A, B, C, D, E, F, G e H no plasma e no soro é resumido na Tabela 9. Estes dados estabelecem o LLoQ global para o ensaio como sendo de 10 UI/ml.

Tabela 7: Determinação do LLoQ em vários genótipos no plasma

Genótipo	Concentração-alvo		Aptima HBV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado	EAT calculado
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
A	7	0,85	0,86	0,71	0,02	2,01	1,44
	8	0,90	0,76	0,34	0,14	0,96	0,82
	9	0,95	0,95	0,27	0,01	0,76	0,55
B	7	0,85	0,85	0,36	0,01	1,01	0,72
	8	0,90	0,93	0,24	0,03	0,67	0,51
	9	0,95	0,94	0,23	0,01	0,64	0,46
C	7	0,85	0,62	0,22	0,23	0,62	0,67
	8	0,90	0,65	0,25	0,25	0,70	0,75
	9	0,95	0,70	0,21	0,26	0,59	0,67
D	8	0,90	0,47	0,19	0,43	0,53	0,81
	9	0,95	0,58	0,17	0,38	0,48	0,72
	10	1,00	0,64	0,24	0,36	0,69	0,85
E	7	0,85	0,59	0,19	0,25	0,53	0,63
	8	0,90	0,59	0,23	0,31	0,66	0,78
	9	0,95	0,68	0,28	0,27	0,80	0,83
F	7	0,85	0,92	0,26	0,07	0,74	0,59
	8	0,90	1,09	0,29	0,18	0,83	0,77
	9	0,95	1,04	0,31	0,09	0,89	0,72
G	7	0,85	0,81	0,27	0,04	0,75	0,57
	8	0,90	0,91	0,26	0,01	0,72	0,52
	9	0,95	0,83	0,26	0,12	0,74	0,64
H	7	0,85	0,65	0,25	0,19	0,71	0,69
	8	0,90	0,67	0,24	0,23	0,68	0,71
	9	0,95	0,62	0,21	0,33	0,59	0,75

DP=desvio padrão

Tabela 8: Determinação do LLoQ em vários genótipos no soro

Genótipo	Concentração-alvo		Aptima HBV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado	EAT calculado
	(UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)	(log UI/ml)
A	7	0,85	0,67	0,28	0,18	0,79	0,74
	8	0,90	0,80	0,34	0,10	0,96	0,78
	9	0,95	0,83	0,26	0,12	0,74	0,65
B	7	0,85	0,56	0,19	0,29	0,54	0,67
	8	0,90	0,71	0,22	0,20	0,62	0,63
	9	0,95	0,59	0,21	0,36	0,59	0,78
C	7	0,85	0,64	0,27	0,20	0,77	0,75
	8	0,90	0,75	0,25	0,15	0,70	0,64
	9	0,95	0,79	0,21	0,16	0,58	0,57
D	8	0,90	0,42	0,14	0,48	0,40	0,76
	9	0,95	0,47	0,18	0,49	0,51	0,84
	10	1,00	0,60	0,23	0,40	0,64	0,85
E	7	0,85	0,56	0,24	0,29	0,69	0,78
	8	0,90	0,63	0,18	0,27	0,50	0,63
	9	0,95	0,67	0,25	0,28	0,70	0,78
F	7	0,85	0,88	0,21	0,03	0,60	0,46
	8	0,90	0,90	0,29	0,01	0,81	0,58
	9	0,95	0,98	0,24	0,02	0,67	0,49
G	7	0,85	0,82	0,24	0,03	0,67	0,50
	8	0,90	0,90	0,25	0,01	0,70	0,50
	9	0,95	1,01	0,23	0,05	0,64	0,51
H	8	0,90	0,69	0,29	0,21	0,81	0,78
	9	0,95	0,77	0,26	0,19	0,74	0,71
	10	1,00	0,78	0,28	0,22	0,80	0,79

DP=desvio padrão

Tabela 9: Resumo do LLoQ em vários genótipos no plasma e no soro

Genótipo	LLoQ do plasma		LLoQ do soro	
	(log UI/ml)	(UI/ml)	(log UI/ml)	(UI/ml)
A	0,95	8,90	0,83	6,79
B	0,93	8,60	0,56	3,59
C	0,62	4,14	0,64	4,38
D	0,64	4,32	0,60	4,01
E	0,59	3,91	0,56	3,60
F	0,92	8,25	0,88	7,56
G	0,81	6,42	0,82	6,55
H	0,62	4,20	0,78	6,01

Reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade, fez-se um painel de 28 membros através da diluição de espécimes clínicos HBV positivos (genótipos A e C) ou da adição de DNA do HBV (genótipos A e C) a plasma e soro HBV negativo. O painel foi testado por três operadores, utilizando três lotes de reagentes em três Panther Systems ao longo de 20 ou mais dias de teste.

A Tabela 10 e a Tabela 11 mostram a reprodutibilidade dos resultados do ensaio (em log UI/ml) entre instrumentos, entre operadores, entre lotes, entre execuções, dentro das execuções e globais. A variabilidade total ficou a dever-se principalmente à variabilidade dentro das execuções (por exemplo, erro aleatório).

Tabela 10: Reprodutibilidade do Aptima HBV Quant Assay para o genótipo A

Matriz	N	Concentração média (log UI/ml)	Entre operadores		Entre instrumentos		Entre lotes		Entre execuções		Intra-execução		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Plasma	161	1,24	0,02	1,96	0,02	1,75	0,10	7,88	0,02	1,50	0,21	16,80	0,23	18,80
Plasma	162	1,97	0,01	0,75	0,01	0,71	0,08	3,84	0,02	0,76	0,14	7,36	0,17	8,40
Plasma	162	3,23	0,01	0,29	0,01	0,24	0,04	1,39	0,01	0,22	0,08	2,47	0,09	2,87
Plasma	162	4,14	0,03	0,76	0,01	0,28	0,04	0,90	0,01	0,15	0,06	1,38	0,08	1,84
Plasma	162	5,75	0,02	0,39	0,01	0,20	0,06	0,97	0,01	0,13	0,09	1,51	0,11	1,85
Plasma	162	6,98	0,05	0,79	0,03	0,48	0,06	0,91	0,01	0,11	0,09	1,35	0,13	1,87
Plasma	162	7,69	0,03	0,38	0,02	0,23	0,01	0,15	0,01	0,12	0,10	1,30	0,11	1,39
Soro	160	1,17	0,02	1,93	0,02	1,71	0,06	5,54	0,02	1,64	0,20	17,07	0,21	18,21
Soro	162	1,82	0,02	1,15	0,01	0,79	0,10	5,43	0,01	0,72	0,15	8,13	0,18	9,90
Soro	162	3,16	0,01	0,26	0,02	0,62	0,09	2,78	0,02	0,59	0,11	3,38	0,14	4,47
Soro	162	4,06	0,01	0,19	0,01	0,22	0,04	0,99	0,01	0,15	0,07	1,68	0,08	1,98
Soro	162	5,60	0,02	0,36	0,01	0,24	0,06	1,15	0,01	0,22	0,13	2,40	0,15	2,70
Soro	162	6,30	0,03	0,49	0,03	0,42	0,01	0,17	0,01	0,16	0,11	1,77	0,12	1,90
Soro	162	7,48	0,05	0,62	0,03	0,36	0,02	0,25	0,02	0,23	0,08	1,09	0,10	1,35

CV=coeficiente de variação, DP=desvio padrão

Nota: A variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade derivada desses fatores for muito pequena. Quando tal sucede, o DP e o CV são mostrados como 0.

Tabela 11: Reprodutibilidade do Aptima HBV Quant Assay para o genótipo C

Matriz	N	Concentração média (log UI/ml)	Entre operadores		Entre instrumentos		Entre lotes		Entre execuções		Intra-execução		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Plasma	161	1,28	0,02	1,73	0,02	1,40	0,07	5,39	0,02	1,28	0,18	14,32	0,20	15,52
Plasma	162	1,98	0,02	0,79	0,01	0,68	0,08	4,02	0,01	0,61	0,14	6,91	0,16	8,08
Plasma	162	3,23	0,01	0,31	0,01	0,39	0,05	1,49	0,01	0,18	0,06	1,97	0,08	2,52
Plasma	162	4,13	0,01	0,18	0,01	0,29	0,04	0,90	0,01	0,15	0,07	1,69	0,08	1,95
Plasma	162	5,78	0,01	0,14	0,02	0,41	0,06	1,04	0,01	0,16	0,10	1,70	0,12	2,05
Plasma	162	6,83	0,01	0,20	0,03	0,42	0,03	0,42	0,01	0,08	0,06	0,93	0,08	1,13
Plasma	162	7,75	0,03	0,33	0,02	0,19	0,02	0,24	0,01	0,08	0,07	0,94	0,08	1,04
Soro	160	1,20	0,02	1,54	0,02	1,55	0,05	4,24	0,02	1,78	0,18	14,74	0,19	15,59
Soro	162	1,90	0,02	1,20	0,02	0,87	0,05	2,73	0,01	0,72	0,15	8,10	0,17	8,71
Soro	162	3,19	0,03	0,93	0,03	0,92	0,05	1,68	0,00	0,05	0,07	2,34	0,10	3,16
Soro	162	4,04	0,01	0,14	0,01	0,31	0,04	0,94	0,00	0,12	0,05	1,30	0,07	1,64
Soro	162	5,69	0,01	0,16	0,02	0,36	0,05	0,88	0,01	0,13	0,09	1,50	0,10	1,78
Soro	162	6,32	0,04	0,64	0,03	0,45	0,04	0,66	0,01	0,14	0,10	1,57	0,12	1,87
Soro	162	7,23	0,04	0,55	0,02	0,25	0,05	0,68	0,01	0,13	0,10	1,42	0,12	1,69

CV=coeficiente de variação, DP=desvio padrão

Nota: A variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade derivada desses fatores for muito pequena. Quando tal sucede, o DP e o CV são mostrados como 0.

Substâncias potencialmente interferentes

Foi avaliada a suscetibilidade do Aptima HBV Quant Assay à interferência por níveis elevados de substâncias endógenas ou fármacos frequentemente receitados a indivíduos infectados pelo HBV. Foram testadas amostras de plasma HBV negativas e amostras às quais foi adicionado analito com HBV para uma concentração de 4,3 log UI/ml de DNA do HBV.

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

Foram testados com o Aptima HBV Quant Assay espécimes de plasma clínicos de pacientes com níveis elevados de substâncias definidas, ou de pacientes com as doenças listadas na Tabela 12. Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 12: Tipos de espécimes clínicos testados

Tipos de espécimes clínicos	
1	Anticorpo antinuclear (ANA)
2	Fator reumatóide (FR)
3	Cirrose alcoólica (CA)
4	Hepatite alcoólica
5	Hepatite não alcoólica
6	Hepatite autoimune

7	Alanina-aminotransferase (ALT) elevada
8	Carcinoma hepatocelular (CHC)
9	Esclerose múltipla (EM)
10	Lúpus eritematoso sistêmico (LES)
11	Hiperglobulinemia
12	Artrite reumatóide (AR)
13	Anticorpos anti-Jo1 (JO-1)
14	Mieloma múltiplo (MM)
15	Hemolisada (hemoglobina elevada)
16	Ictérica (bilirrubina elevada)
17	Lipêmica (lípidos elevados)
18	Proteínas elevadas
19	Anticorpos anti-HBV (vacinados)
20	Anticorpos anti-HCV
21	Anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 13 em concentrações pelo menos três vezes a $C_{máx}$ (plasma humano).

Tabela 13: Substâncias exógenas

Grupo de substâncias exógenas	Substâncias exógenas testadas
1	Saquinavir, ritonavir, amprenavir, indinavir, lopinavir, mesilato de nelfinavir
2	Claritromicina, cloridrato de valganciclovir, efavirenz, nevirapina
3	Paroxetina HCl, enfuvirtida, zidovudina, didanosina, sulfato de abacavir
4	Ribavirina, entecavir, dipivoxilo de adefovir, fumarato disoproxílico de tenofovir, lamivudina, ganciclovir, aciclovir
5	Estavudina, ciprofloxacina, fluoxetina, azitromicina, valaciclovir, sertralina, zalcitabina
6	Interferão alfa-2a, interferão alfa-2b, interferão alfa-2b peguilado

Especificidade

A especificidade foi determinada utilizando 292 espécimes clínicos frescos e 747 negativos congelados do HBV. No total, foram testados 521 espécimes de plasma e 518 de soro.

A especificidade foi calculada como a porcentagem das amostras do HBV negativas com os resultados de "Não detetado". O DNA do HBV não foi detetado em 1038 amostras.

A especificidade foi de 99,9% (1038/1039, IC de 95%: 99,5 -100%).

Tabela 14: Especificidade nos espécimes clínicos de plasma e soro

	Plasma fresco	Plasma congelado	Plasma total	Soro fresco	Soro congelado	Soro total	Combinado
Réplicas válidas (n)	145	376	521	147	371	518	1.039
Não detetado	145	376	521	147	370	517	1.038
Especificidade (IC de 95%)	100% (97,4-100)	100% (99,0-100)	100% (99,3-100)	100% (97,5-100)	99,7% (98,5-100)	99,8% (98,9-100)	99,9% (99,5-100)

IC=intervalo de confiança

Especificidade analítica

A potencial reatividade cruzada com os agentes patogênicos listados na Tabela 15 foi avaliada no plasma humano do HBV negativo na presença ou ausência de 4,3 log UI/ml de DNA do HBV. Não foi observada qualquer reatividade cruzada ou interferência no plasma bacteriologicamente contaminado ou nos espécimes de sujeitos infetados com outros agentes patogênicos sanguíneos ou naqueles anteriormente vacinados com as vacinas do HBV e da gripe.

Tabela 15: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Microorganismo/Agente patogénico	Origem	Microorganismo/Agente patogénico	Origem
Vírus da hepatite C	Espécime clínico	Herpesvírus humano tipo 8	Fluido de cultura
Vírus da hepatite A	Espécime clínico	Vírus da encefalite Japonês	Fluido ascítico
C/ vacina do HBV	Espécime clínico	Vírus da encefalite de Murray Valley	Lisado celular
HIV-1 e -2	Espécime clínico	Vírus da encefalite de St. Louis	Fluido de cultura
Vírus linfotrópico de célula T humano - tipo 1 e 2	Espécime clínico	Vírus Vaccinia	Lisado celular
Parvovírus B19	Espécime clínico	Vírus da febre amarela	Fluido de cultura
Citomegalovírus	Espécime clínico	<i>Candida albicans</i>	Cultura
Vírus do Dengue tipo 1-4	Espécime clínico	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Cultura
Vírus Epstein-Barr	Espécime clínico	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Cultura
C/ vacina da gripe	Espécime clínico	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Cultura
Papilomavírus humano	Espécime clínico	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Cultura

Tabela 15: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Vírus herpes simplex 1 e 2	Espécime clínico	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cultura
Vírus da rubéola	Espécime clínico	<i>Propionibacterium acnes</i>	Cultura
Vírus varicela zóster	Espécime clínico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura
Vírus do Nilo Ocidental	Espécime clínico	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura
Poliomavírus humano BK	Lisado celular	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultura
Herpesvírus humano 6B	Fluido de cultura	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Cultura

Repetibilidade de espécimes clínicos

A repetibilidade foi avaliada testando três réplicas dos espécimes clínicos de soro e plasma do HBV positivo infetados naturalmente. A concentração média e o desvio padrão das amostras de plasma e soro testadas são mostradas nas Tabelas 16 e 17 respectivamente.

Tabela 16: Repetibilidade de espécimes clínicos de plasma

Espécime de plasma	Concentração média (log UI/ml)	DP
1	2,08	0,09
2	2,98	0,01
3	2,45	0,09
4	2,32	0,06
5	2,58	0,08
6	3,60	0,06
7	3,45	0,04
8	3,95	0,04
9	3,81	0,05
10	4,26	0,03
11	5,65	0,07
12	6,32	0,06
13	6,79	0,06
14	7,40	0,05
15	8,17	0,02

DP=desvio padrão

Tabela 17: Repetibilidade de espécimes clínicos de soro

Espécime de soro	Concentração média (log UI/ml)	DP
1	1,93	0,17
2	2,29	0,09
3	2,78	0,05
4	1,98	0,06
5	2,53	0,07
6	3,53	0,06
7	3,38	0,03
8	3,77	0,02
9	3,45	0,17
10	4,26	0,04
11	6,31	0,02
12	5,45	0,04
13	5,74	0,08
14	7,44	0,04
15	8,47	0,03

DP=desvio padrão

Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes

Para avaliar a recuperação de DNA do HBV nas amostras diluídas com o diluente de espécimes Aptima, as amostras de plasma e soro que abrangeram o intervalo linear foram diluídas numa relação de 1:3 com o diluente de espécimes Aptima. Além disso, os espécimes clínicos de titulação alta infectados naturalmente e as amostras às quais foi adicionado DNA do HBV com concentrações superiores ao ULoQ foram diluídos numa relação de 1:100 com o diluente de espécimes Aptima. Cada amostra foi testada não diluída e diluída (1:3 ou 1:100) em triplicado. As diferenças entre a concentração média apresentada (fator de diluição aplicado ao resultado da amostra diluída) e a concentração não diluída média são mostradas na Tabela 18 para o plasma e na Tabela 19 para o soro. As concentrações da amostra foram recuperadas com precisão nas amostras diluídas.

Tabela 18: Diluição de amostras com o diluente de espécimes Aptima no plasma

Diluição	Concentração não diluída média (log UI/ml)	Concentração média apresentada ^a (log UI/ml)	Diferença (log UI/ml)
1:3	2,08	1,71	-0,37
	2,98	3,02	0,04
	2,45	2,30	-0,15
	2,32	2,06	-0,26
	2,58	2,46	-0,12
	3,60	3,62	0,02
	3,45	3,36	-0,09
	3,95	3,91	-0,04
	3,81	3,72	-0,09
	4,26	4,24	-0,02
	5,65	5,50	-0,15
	6,32	6,08	-0,24
	6,79	6,40	-0,39
	7,40	7,06	-0,34
8,17	8,05	-0,12	
1:100	8,17	7,82	-0,35
	> 9,00 ^b (10,20 ^c)	10,40	0,20

^a A concentração apresentada é o valor calculado após a aplicação do fator de diluição.

^b Espécime ao qual foi adicionado um analito.

^c Valor da concentração-alvo, superior ao ULoQ.

Tabela 19: Diluição de amostras com o diluente de espécimes Aptima no soro

Diluição	Concentração não diluída média (log UI/ml)	Concentração média apresentada ^a (log UI/ml)	Diferença (log UI/ml)
1:3	1,93	1,50	-0,43
	2,29	2,00	-0,29
	2,78	2,45	-0,33
	1,98	1,50	-0,48
	2,53	2,23	-0,30
	3,53	3,59	0,06
	3,38	3,21	-0,17
	3,77	3,68	-0,09
	3,45	3,35	-0,10
	4,26	4,16	-0,10
	6,31	5,98	-0,33
	5,45	5,24	-0,21
	5,74	5,62	-0,12
	7,44	7,19	-0,25
1:100	8,47	8,31	-0,16
	8,47	8,19	-0,28
	> 9,00 ^b (10,20 ^c)	10,43	0,23

^a A concentração apresentada é o valor calculado após a aplicação do fator de diluição.

^b Espécime ao qual foi adicionado um analito.

^c Valor da concentração-alvo, superior ao ULoQ.

Correlação de métodos

O desempenho do Aptima HBV Quant Assay foi avaliado contra um ensaio de comparação com marca CE e licenciado pela Health Canada, através do teste de espécimes clínicos não diluídos de pacientes infectados com HBV. Para a regressão linear, foi utilizado um total de 614 espécimes clínicos com um intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 8.

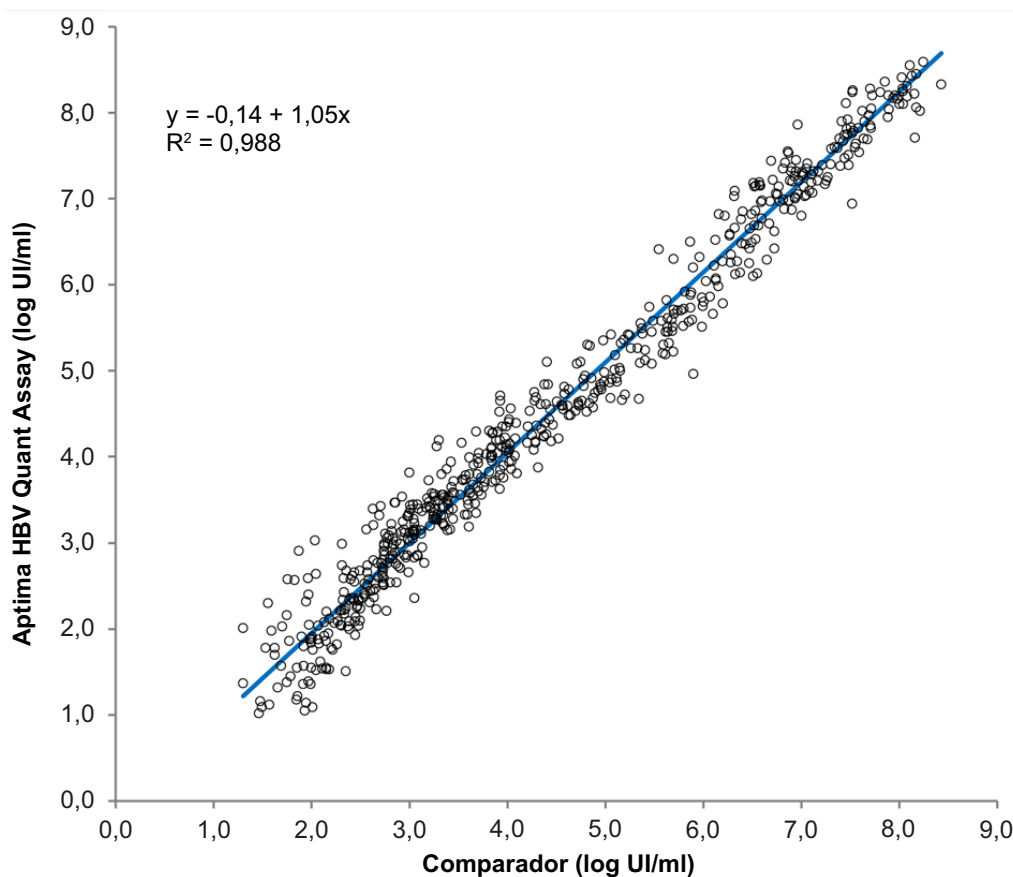


Figura 8. Correlação entre o Aptima HBV Quant Assay e o ensaio de comparação

Contaminação por transferência

Para estabelecer se 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 três Panther Systems. A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras de plasma com adição de DNA do HBV de titulação elevada (8 log UI/ml) dispersas entre amostras HBV negativas num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de quinze execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0,0% (0/705).

Bibliografia

1. **Lok AS, McMahon BJ.** AASLD Practice Guideline Update. Chronic Hepatitis B: Update 2009. Hepatology. 2009; 50(3):661-662;1-36.
2. **Aspinall EJ, Hawkins G, Fraser A, Hutchinson SJ, Goldberg D.** Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. Occupational Medicine 2011; 61(8):531-540.
3. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Early Identification and Linkage to Care of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection - Three U.S. Sites, 2012-2014. May 9, 2014, 63(18); 399-401.
4. **Liaw YF, Chu CM.** Hepatitis B virus infection. Lancet. 2009; 373(9663):582-92.
5. **European Association for the Study of the Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology 2012; 57:167-185.
6. **International Agency for Research on Cancer.** Hepatitis B Virus. IARC Monographs 2012; 100B: 93-133.
7. **Price, J.** An Update on Hepatitis B, D, and E Viruses. Topics in Antiviral Medicine 2014; 21(5): 157-163.
8. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
9. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
10. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
12. **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.
13. **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.
14. **NIBSC - Confidence in Biological Medicines.** 2014. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency. 3rd WHO International Standard for Hepatitis B Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques, NIBSC code: 10/264, Potters Bar, Hertfordshire, ENG.



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

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

Para mais informações sobre contactos, visite www.hologic.com.



Hologic BV
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Hologic, Aptima e Panther são marcas comerciais e/ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respetivas subsidiárias nos Estados Unidos e/ou noutros países. Quaisquer outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo pertencem aos respetivos proprietários.

Este produto pode estar abrangido por uma ou mais das patentes dos EUA identificadas em www.hologic.com/patents.

© 2016-2020 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.
AW-13182-601 Rev. 007
2020-12