

Aptima® CMV 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	2
Advertências e precauções	3
Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes	6
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 em separado	14
Materiais opcionais	15
Procedimento de teste no Panther System	15
Notas sobre o procedimento	22
Controlo de qualidade	23
Calibração do ensaio	23
Controlos negativo e positivo	23
Calibrador interno/controlo interno	23
Interpretação dos resultados	24
Limitações	25
Desempenho	26
Limite de deteção utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS	26
Limite de deteção em vários genótipos do CMV	28
Intervalo linear	29
Linearidade em vários genótipos do CMV	31
Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS	33
Determinação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do CMV	36
Reprodutibilidade	40
Substâncias potencialmente interferentes	41
Especificidade	42
Especificidade analítica	43
Correlação de métodos	44
Contaminação por transferência	45
Bibliografia	46

Informações gerais

Utilização prevista

O Aptima CMV Quant Assay é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* para a quantificação do DNA do citomegalovírus humano em plasma EDTA e sangue total humanos no Panther System totalmente automatizado.

O Aptima CMV Quant Assay destina-se a ser utilizado como auxílio ao diagnóstico e ao tratamento de doentes com transplantes de órgãos sólidos e doentes com transplantes de células estaminais hematopoiéticas.

O Aptima CMV Quant Assay não se destina a ser utilizado como um ensaio de rastreio à presença de CMV no sangue ou derivados do sangue.

Resumo e explicação do teste

O CMV humano é um vírus de DNA de cadeia dupla linear, ubíquo de 240 kb que pertence à família dos herpesvírus. Dependendo da população estudada e da região geográfica, a seroprevalência do CMV varia entre 45 e 100% em todo o mundo.^{1,2} Em anfitriões imunocompetentes, a infecção por CMV é geralmente assintomática e autolimitada. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, tais como recetores de transplantes e indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana, o CMV é uma causa importante de morbidade e de mortalidade.

À semelhança de outros herpesvírus, após a infecção primária, o CMV estabelece uma infecção latente vitalícia que pode reativar-se esporadicamente. Em recetores de transplantes, a transferência do CMV latente no enxerto ou a reativação da infecção por CMV latente no anfitrião pode resultar numa replicação viral generalizada e na disseminação para vários órgãos que, muitas vezes, é potencialmente fatal.³

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos quantitativos são o método preferencial para a monitorização de infecção por CMV e de doença em recetores de transplantes, pois são rápidos e sensíveis.⁴ As orientações recentes recomendam, no mínimo, uma monitorização semanal da carga viral de CMV para orientar as decisões de iniciar a terapêutica anti-CMV e monitorizar a resposta à terapêutica.^{5,6,8} Geralmente, valores de carga viral mais elevados estão correlacionados com um maior risco de doença por CMV.^{4,9} Assim, a quantificação do DNA de CMV, em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores laboratoriais, é essencial para o tratamento de doentes com infecção por CMV.

Princípios do procedimento

O Aptima CMV 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 no Panther System* para quantificar o DNA de CMV, genótipos 1, 2, 3 e 4. O desenho do *primer* tem como alvo o gene UL56 altamente conservado para garantir a quantificação exata do DNA de CMV. O ensaio está padronizado de acordo com o 1.º Padrão Internacional da OMS (código NIBSC: 09/162) para o citomegalovírus humano²¹.

O Aptima CMV Quant Assay envolve três passos principais que decorrem num único tubo no Panther System: captura do alvo, amplificação do alvo por TMA e deteção dos produtos da amplificação através de sondas com marcadores fluorescentes (torches).

*Incluindo as variantes do Panther System.

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 genômico viral. Os oligonucleótidos de captura são hibridados com regiões altamente conservadas do DNA do CMV, 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 mediada por 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.

A detecção é conseguida utilizando torches de ácidos nucleicos de cadeia simples, presentes durante a amplificação do alvo, e que se hibridam especificamente com o produto da amplificação em tempo real. Cada torch tem um fluoróforo e um agente de extinção. Quando o torch não é hibridado com o produto da amplificação, o agente de extinção fica em estreita proximidade com o fluoróforo e suprime a fluorescência. Quando o torch se liga ao produto da amplificação, o agente de extinção é ainda mais afastado do fluoróforo e emite um sinal num determinado comprimento de onda quando excitado por uma fonte de luz. À medida que uma maior quantidade de torches 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 CMV. 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 CMV e do IC para cada reação e comparando-os com as informações da calibração.

Os resultados do ensaio são convertidos de cópias/mL para UI/mL utilizando uma equação do fator de conversão incorporada no software do Panther. É utilizada a mesma equação do fator de conversão para os espécimes de sangue total e de plasma. É aplicado um fator de diluição de 4 aos resultados de carga viral de CMV para os espécimes de sangue total quando o Fator de conversão de sangue total é selecionado no Panther.

Advertências e precauções

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

Relacionadas com o laboratório

- D. **PRECAUÇÃO:** Os controles 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 testado com procedimentos licenciados pela Agência dos Medicamentos e Alimentos dos EUA. Além disso, o plasma não é reativo para o DNA do CMV, 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.^{10,11,12}

- E. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima CMV Quant Assay e no manuseamento de materiais potencialmente infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- F. Use somente 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 europeus, nacionais e locais.^{10,11,12,13} 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 irrigadas com água corrente em abundância. Estas precauções são recomendadas para evitar a acumulação de depósitos em canos metálicos onde se poderiam desenvolver condições explosivas.
- K. As boas práticas padrão para os laboratórios moleculares incluem a monitorização ambiental. Para monitorizar o ambiente de um laboratório, sugere-se o seguinte procedimento:
1. Obtenha uma zaragatoa com ponta de algodão e junte-a com um Tubo de Aliquotas 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. Pressione a zaragatoa no lado do tubo de transporte para extrair o máximo de líquido possível. Elimine a zaragatoa e tape o tubo.
 7. Repita os passos para as restantes amostras em zaragatoa.
 8. Teste a zaragatoa com um ensaio molecular.

Relacionadas com os espécimes

- L. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize as Precauções universais^{10,11,12} quando executar este ensaio. Devem estabelecer-se métodos de manuseamento e eliminação adequados de acordo com os regulamentos locais.¹¹ Este procedimento só deve ser executado por pessoal devidamente qualificado na utilização do Aptima CMV Quant Assay e no manuseamento de materiais infecciosos.
- M. Mantenha as condições de armazenamento adequadas durante o transporte de espécimes, para garantir a integridade dos mesmos. A estabilidade do espécime noutras condições de transporte que não as recomendadas não foi avaliada.
- N. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento de espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desaperar 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 números de lote diferentes.
- 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 do ensaio conservados de forma incorreta. Consulte as secções *Requisitos de conservação e manuseamento de 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 ateste reagentes ou fluidos. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- T. Evite o contacto do TER 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 de perigos reflete as classificações das Fichas de dados de segurança (SDS) da União Europeia. Para obter informações sobre a comunicação de perigos específicas da sua região, consulte as respetivas SDS na Biblioteca de Fichas de dados de segurança em www.hologicds.com.

Informações de perigos para a UE	
	<p>Controlos do kit CMV <i>Plasma humano 95-100%</i> <i>Azida de sódio < 1%</i></p>
	<p>ADVERTÊNCIA H312 - Nocivo em contacto com a pele H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros EUH032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos P273 - Evitar a libertação para o ambiente P280 - Usar proteção ocular/proteção facial</p>
	<p>Reagente estimulador do alvo (TER) <i>Monodrato de hidróxido de lítio a 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): 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. Continue a enxaguar P310 - Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.</p>

Requisitos de conservação e manuseamento de 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 qCMV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição da amplificação qCMV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente enzimático qCMV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição enzimática qCMV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente promotor qCMV	2 °C a 8 °C		
Solução de reconstituição do reagente promotor qCMV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
Reagente de captura do alvo qCMV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias ^a
qCMV PCAL (calibrador positivo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar num período de 24 horas
qCMV NC CONTROL – (controlo negativo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar num período de 24 horas
qCMV LPC CONTROL + (controlo positivo baixo)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar num período de 24 horas
qCMV HPC CONTROL + (controlo positivo alto)	-15 °C a -35 °C	15 °C a 30 °C	Frasco de utilização única Utilizar num período de 24 horas
Reagente estimulador do alvo qCMV	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. Os reagentes conservados dentro do Panther System têm 96 horas de estabilidade. Os reagentes podem ser carregados no Panther System até 8 vezes. O Panther System registra 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 liofilizado e o reagente promotor reconstituído são fotossensíveis. Proteja estes reagentes da luz durante a sua conservação e a preparação para utilização.
- F. O reagente estimulador do alvo qCMV 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. Respeite as precauções universais.

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

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

Para preparar o plasma, podem utilizar-se espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou de plástico:

- Tubos com anticoagulantes EDTA
- Tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPTs)

A. Colheita de espécimes

1. Plasma: 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 dos glóbulos vermelhos aglomerados seguindo as instruções do fabricante do tubo utilizado. O plasma pode ser testado no Panther System, num tubo primário, ou transferido para um tubo secundário, como, por exemplo, um Tubo de Alíquotas de Espécime Aptima (SAT). Para obter o volume de amostra de 500 µL, o volume mínimo de plasma para os tubos de colheita primários é de até 1200 µL. Para os tubos secundários, o volume mínimo é de 700 µL para obter o volume de amostra de 500 µL. 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 amostra Aptima (SAT)	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13x100 mm	0,5 mL
13x100 mm com gel	0,3 mL
16x100 mm com gel	0,7 mL

Se não for testado imediatamente, o plasma pode ser conservado de acordo com as especificações a seguir descritas. Se for transferido para um tubo secundário, o plasma pode ser congelado a -20 °C ou -70 °C. Não exceda 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Não congele espécimes de plasma em tubos de colheita primários EDTA.

2. O sangue total tem de ser processado utilizando tubos com diluente de sangue total pré-cheios antes de ser testado no Panther System. Não exceda 3 ciclos de congelamento/descongelamento em amostras de sangue total não processadas.

B. Condições de conservação de espécimes

1. Espécimes de plasma EDTA

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 durante até 24 horas,
- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário de 2 °C a 8 °C durante até 5 dias ou
- No tubo secundário a -20 °C ou -70 °C durante até 60 dias.

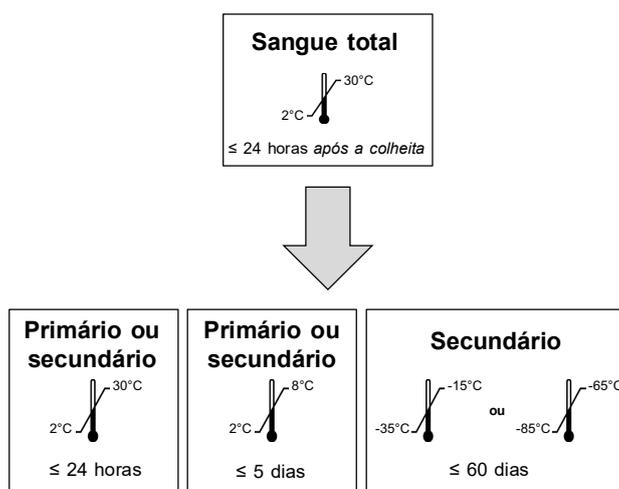


Figura 1. Condições de conservação para tubos EDTA

2. Espécimes em 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 de 2 °C a 30 °C até um máximo de 24 horas,
- No PPT de 2 °C a 8 °C até um máximo de 5 dias ou
- No PPT a -20 °C ou -70 °C durante até 60 dias.

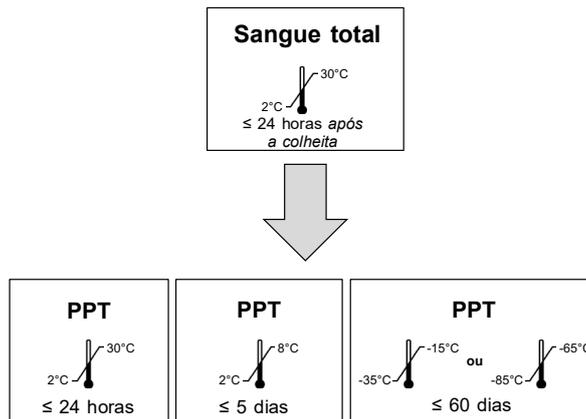


Figura 2. Condições de conservação dos PPTs

3. Espécimes de sangue total

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C até 36 horas após a colheita do espécime. O sangue total colhido pode ser conservado numa das seguintes condições:

- No tubo de colheita primário de 2 °C a 8 °C até um máximo de 5 dias,
- No tubo de colheita primário a -20 °C ou -70 °C durante até 60 dias.

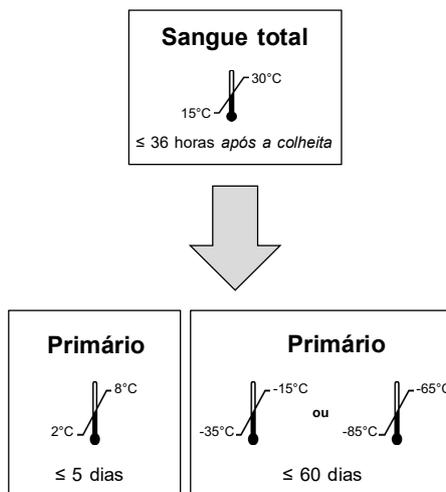


Figura 3. Condições de conservação para espécimes de sangue total

Amostras dentro do Panther System

As amostras de plasma e de sangue total processado 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 expedidos de acordo com os regulamentos de transporte locais, nacionais e internacionais em vigor.

Panther System

Os reagentes do Aptima CMV 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

Kit de Aptima CMV Quant Assay, 100 testes (código de produto PRD-05074)
(1 caixa de ensaio, 1 kit de calibrador, 1 kit de controlos e 1 caixa de reagente estimulador do alvo)

Caixa do Aptima CMV Quant Assay

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

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

Kit de calibradores Aptima CMV Quant (Cód. produto PRD-05075)

(conservar a uma temperatura entre -15 °C e -35 °C após a receção)

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

Kit de controlos Aptima CMV Quant (Cód. produto PRD-05076)
(conservar a uma temperatura entre -15 °C e -35 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
NC	Controlo negativo qCMV <i>Plasma humano desfibrinado CMV negativo com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
LPC	Controlo positivo baixo qCMV <i>CMV 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 qCMV <i>CMV 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 CMV Quant
(conservar a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C após a receção)

Símbolo	Componente	Quantidade
TER	Reagente estimulador do alvo qCMV <i>Uma solução concentrada com hidróxido de lítio.</i>	1 x 46,0 mL

Materiais necessários, mas disponíveis em separado

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

Material	Cód. produto
Panther® System	—
Kit de execução Panther para ensaios em tempo real (apenas em tempo real)	PRD-03455 (5000 testes)
<i>Kit de fluidos Aptima® Assay (também conhecido como Kit de fluidos universais) contém solução de lavagem Aptima, tampão para o fluido de desativação Aptima e reagente de óleo Aptima</i>	303014 (1000 testes)
<i>Unidades multitubos (MTUs)</i>	104772-02
<i>Kit de sacos de resíduos Panther</i>	902731
<i>Tampa do recipiente de resíduos Panther</i>	504405
ou Kit de execução Panther System <i>(para executar ensaios TMA em paralelo com ensaios TMA em tempo real) contém MTUs, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, Auto Detect e fluidos de ensaio</i>	303096 (5000 testes)
Tubos com diluente de sangue total (apenas para o processamento de espécimes de sangue total)	PRD-06783 (100 tubos pré-cheios por embalagem)
Pontas, condutoras de 1000 µL, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Luvas sem pó descartáveis	—
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas rígidas de substituição Hologic (tampa de tubo de utilização única para o processamento de sangue total)	PRD-06720
Tampas de substituição para reagentes <i>Frascos de reconstrução de reagente de amplificação, enzimático e promotor</i>	CL0041 (100 tampas)
<i>Frasco de TCR</i>	CL0040 (100 tampas)
<i>Frasco de TER</i>	903302 (100 tampas)
Coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico	—
Toalhetes que não larguem pelos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubos de colheita primários (EDTA e PPT): <i>13 mm x 100 mm</i> <i>13 mm x 75 mm</i> <i>16 mm x 100 mm</i>	—
Centrífuga	—
Misturador vórtex	—

Materiais opcionais

Material	Cód. produto
Opções de tubo secundário:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Tubos de Alíquotas de Espécime Aptima (SATs) (100 por embalagem)	503762
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) tampa para SAT	504415
Diluyente de espécimes Aptima	303563
Kit de diluyente de espécimes Aptima contém diluyente de espécimes Aptima, 100 SATs e 100 tampas	303593
Pipetas de transferência	—
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/Panther Fusion System adequado 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 uma solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxague com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada com capas limpas e absorventes, indicadas para bancadas de laboratórios, com forro de plástico.
2. Limpe uma superfície de trabalho separada onde as amostras serão preparadas. Siga o procedimento supramencionado (passo A.1).
3. Limpe os pipetadores. Siga o procedimento 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 de calibrador e controlo podem ser colocados num dispositivo de agitação de tubos por oscilação para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

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

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

C. Reconstituição/preparação dos reagentes de um novo kit

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

1. Para preparar o reagente de captura do alvo (TCR), proceda da seguinte forma:
 - a. Remova o TCR da conservação (2 °C a 8 °C). Verifique o número de lote no frasco de TCR para se certificar de que corresponde ao número de lote da folha de códigos 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 frasco 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 4, 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 4, 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 4, passo 3).
 - vi. Recolha os frascos montados e gire-os durante pelo menos 10 segundos (Figura 4, passo 4).
 - vii. Aguarde pelo menos 30 minutos para que o reagente liofilizado se dissolva.

- viii. Depois de o reagente liofilizado se dissolver, 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 4, passo 5).
- d. Remova cuidadosamente o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 4, passo 6).
- e. Volte a colocar a tampa do frasco. Grave as iniciais do operador e a data de reconstituição na etiqueta (Figura 4, 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.

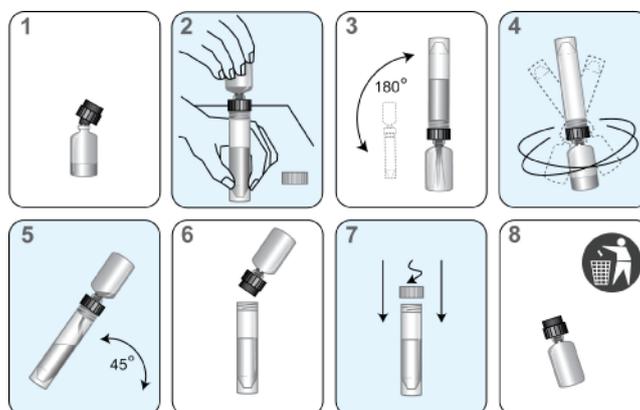


Figura 4. Processo de reconstituição dos reagentes

3. Remova o reagente estimulador do alvo qCMV da conservação (15 °C a 30 °C). Registre 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.

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

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

E. Manuseamento de espécimes de plasma

1. Certifique-se de que os espécimes processados em tubos primários ou os espécimes não diluídos em tubos secundários são conservados corretamente de acordo com *Colheita e conservação de espécimes*.
2. Certifique-se de que os espécimes congelados são totalmente descongelados. Coloque no vórtex 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 primário contém até 1200 µL de espécime ou de que cada tubo secundário contém, pelo menos, 700 µL de espécime. Consulte a tabela fornecida em *Colheita de espécimes* para identificar os requisitos de volume morto para cada tipo de tubo primário e secundário.
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 neste passo.

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

F. Manuseamento de espécimes de sangue total

1. Certifique-se de que os espécimes processados em tubos primários são conservados corretamente de acordo com *Colheita e conservação de espécimes*.
2. Certifique-se de que os espécimes congelados são totalmente descongelados.
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. Inverta suavemente os tubos de sangue total pelo menos 3 vezes, ou misture suavemente num dispositivo de agitação de tubos, até que o sangue esteja homogéneo.
5. Antes do processamento da amostra, efetue o procedimento seguinte em cada espécime.
 - a. O sangue dos tubos primários deve ser bem misturado por inversão e a amostra deve ser imediatamente transferida para o tubo que contém o diluente de sangue total.
 - b. Adicione 500 µL de espécime de sangue total ao tubo com diluente de sangue total pré-cheio.
 - c. Volte a tapar e coloque a amostra no vórtex durante pelo menos 5 segundos.

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

G. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* e das *Notas sobre o procedimento*. Certifique-se de

que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.

2. Carregue as amostras no respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibrador e controlos):
 - a. Desaperte a tampa de um tubo de amostra, mas não a remova já.

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

- b. Carregue o tubo de amostra no respetivo suporte.
 - c. Repita os passos 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. A existência de bolhas no tubo compromete a deteção de nível do Panther System.
 - 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.

H. Preparação do sistema - Aplicar o fator de conversão de espécimes de sangue total

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Panther System Operator's Manual* (Manual de instruções do Panther System).
2. Carregue o suporte de espécimes.
3. Aplique o Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total) aos pedidos de teste de ensaio para os espécimes de sangue total.

Nota: *O Fator de conversão de sangue total pode ser aplicado a todo um suporte ou a um único pedido de teste.*

Para aplicar o Fator de conversão de sangue total a todo um suporte de espécimes de sangue total:

- a. No ecrã *Sample Rack Bay* (Zona dos suportes de amostras), faça duplo clique no suporte relevante. É apresentado o ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras) relativo ao suporte selecionado.
- b. Selecione **Dilute All (Diluir todos)**.

Aparece a janela Dilution Factor (Fator de diluição).

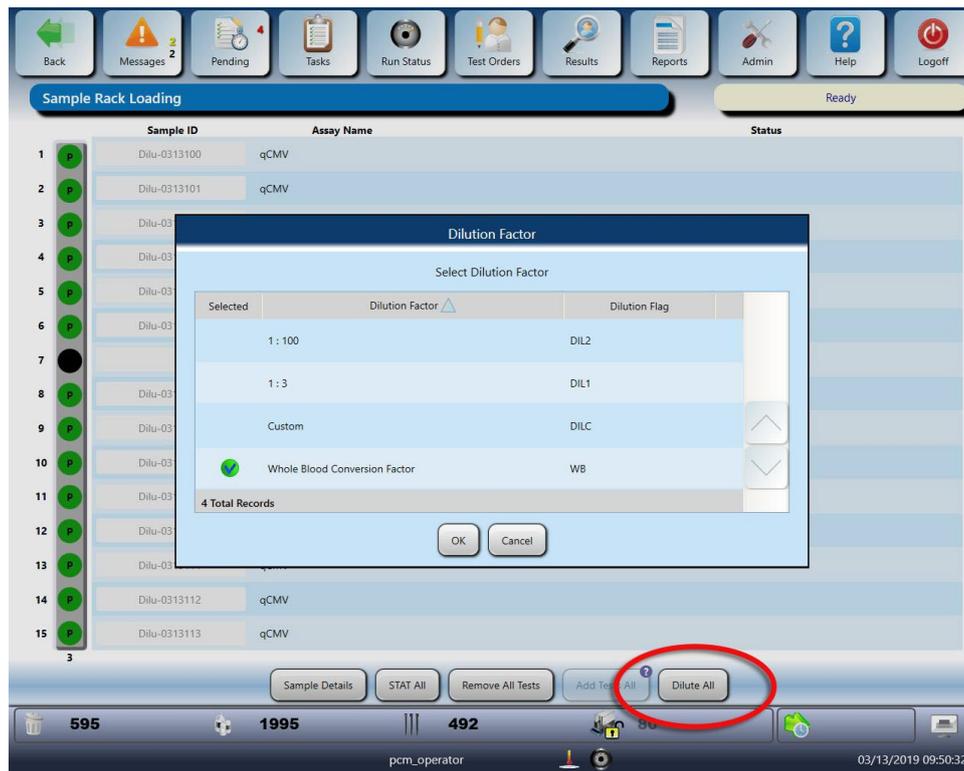


Figura 5. A janela Dilution Factor (Fator de diluição) no ecrã Sample Rack Loading (Carregamento do suporte de amostras)

- c. Selecione **Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total)**.
- d. Selecione **OK**.
Aparece uma janela *Set Dilution Factor for Rack* (Definir fator de diluição para suporte).
- e. Selecione **Yes (Sim)** para aplicar o sinalizador de Fator de conversão de sangue total a todo o suporte de espécimes de sangue total.

Para aplicar o Fator de conversão de sangue total a um único pedido de teste (por exemplo, à quarta amostra no suporte; consulte a imagem abaixo):

- a. No ecrã *Sample Rack Bay* (Zona dos suportes de amostras), faça duplo clique no suporte carregado com o(s) espécime(s) relevante(s).
Aparece o ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras) relativo ao suporte selecionado.
- b. No ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras), faça duplo clique no espécime relevante.
Aparece o ecrã *Sample Details* (Detalhes da amostra) com os pedidos de teste atuais para o espécime selecionado.
- c. Selecione o pedido de teste relevante no painel *Test Orders* (Pedidos de teste).
- d. Selecione **Apply Dilution (Aplicar diluição)**

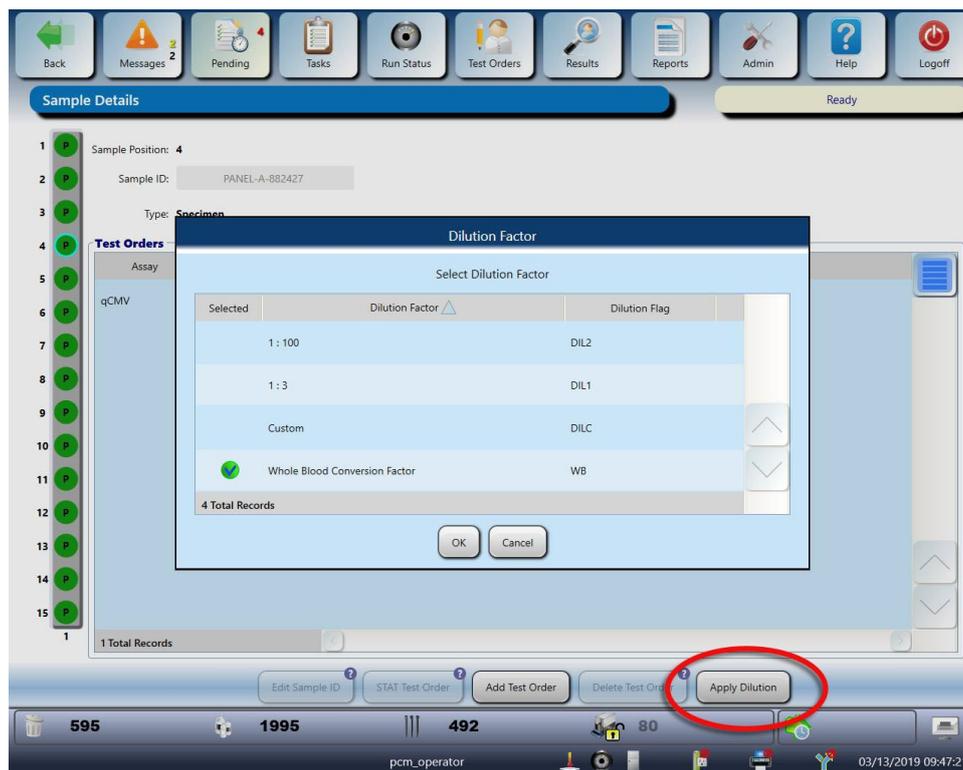


Figura 6. A janela *Dilution Factor* (Fator de diluição) no ecrã *Sample Details* (Detalhes da amostra)

- e. Selecione **Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total)**.
 - f. Selecione **OK** para aplicar o sinalizador de Fator de conversão de sangue total a todos os pedidos de teste selecionados.
4. Se for necessário, o Fator de sangue total pode ser removido dos pedidos de teste antes do início do processamento.

Para eliminar o Fator de conversão de sangue total de todo um suporte:

1. No ecrã *Sample Rack Bay* (Zona dos suportes de amostras), faça duplo clique no suporte relevante.
É apresentado o ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras) relativo ao suporte selecionado.
2. Selecione **Dilute All (Diluir todos)**.
3. Na janela *Dilution Factor* (Fator de diluição), desmarque **Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total)**.
4. Selecione **OK**.
Aparece uma janela *Set Dilution Factor for Rack* (Definir fator de diluição para suporte).
5. Selecione **Yes (Sim)** para eliminar o Fator de conversão de sangue total de todo um suporte.

Para eliminar os pedidos de teste de ensaio do Fator de conversão de sangue total:

1. No ecrã *Sample Rack Bay* (Zona dos suportes de amostras), faça duplo clique no suporte carregado com o(s) espécime(s) relevante(s).
Aparece o ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras) relativo ao suporte selecionado.
2. No ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras), faça duplo clique no espécime relevante.
Aparece o ecrã *Sample Details* (Detalhes da amostra) com os pedidos de teste atuais para o espécime selecionado.
3. Selecione o pedido de teste relevante no painel *Test Orders* (Pedidos de teste).
4. Selecione **Apply Dilution (Aplicar diluição)**.
5. Na janela *Dilution Factor* (Fator de diluição), desmarque o **Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total)**.
6. Selecione **OK** para eliminar o Fator de conversão de sangue total do pedido de teste.

Notas sobre o procedimento

A. Calibrador e controlos

1. O calibrador positivo qCMV, o controlo positivo baixo qCMV, o controlo positivo alto qCMV e os tubos de controlo negativo qCMV 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 ser processados pelo sistema.
 - b. Os resultados válidos para os controlos e calibrador são registados no sistema.
2. Quando os tubos de calibrador e controlos tiverem sido pipetados e estiverem a ser processados pelo kit de reagente do Aptima CMV Quant Assay, os espécimes podem ser testados com o kit reconstituído associado até um máximo de 24 horas, **a não ser que:**
 - a. Os resultados do calibrador ou do controlo sejam inválidos.
 - b. O respetivo kit de reagente de ensaio seja retirado do sistema.
 - c. O respetivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. O calibrador e cada tubo de controlo só podem ser usados uma única vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez podem dar origem a erros de processamento.

B. Pó das luvas

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

Controlo de qualidade

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

Os espécimes com resultados inválidos devem voltar a ser testados para ser obtido um resultado válido.

Calibração do ensaio

Para gerar resultados válidos, é necessário concluir uma calibração do ensaio. Um calibrador positivo único é executado em triplicado de cada vez que um kit de reagente é carregado no 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, deve ser testado um conjunto de controlos de ensaio. Deve ser testada uma réplica do controlo negativo, uma do controlo positivo baixo e outra do controlo positivo alto sempre que um kit de reagente for carregado no 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. Se algum dos controlos tiver um resultado inválido, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras de uma execução invalidada devem ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

Calibrador interno/controlo interno

Cada amostra contém um calibrador interno/controlo interno (IC). Durante o processamento, os critérios de aceitação do IC são automaticamente verificados pelo software do 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 os processos com precisão, quando os procedimentos são feitos de acordo com as instruções fornecidas neste folheto informativo e no *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System*.

Interpretação dos resultados

O Panther System determina automaticamente a concentração de DNA do CMV para espécimes e controlos mediante a comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de DNA do CMV são apresentadas em UI/mL e \log_{10} UI/mL. A interpretação de resultados é fornecida na Tabela 1 e na Tabela 2.

Tabela 1: Interpretação de resultados do plasma

Resultado do Aptima CMV Quant Assay apresentado		Interpretação
UI/mL	Valor \log_{10}	
Não detetado	Não detetado	DNA do CMV não detetado.
< 53 detetado	< 1,72	Foi detetado DNA do CMV, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLoQ).
53 a 10 000 000	1,72 a 7,00	A concentração de DNA do CMV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLoQ e o ULoQ UI/mL.
> 10 000 000	> 7,00	A concentração de DNA do CMV situa-se acima do limite superior de quantificação (ULoQ).
Inválido ^a	Inválido ^a	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

^aOs resultados inválidos são apresentados em letra de cor azul.

Tabela 2: Interpretação de resultados do sangue total

Resultado do Aptima CMV Quant Assay apresentado		Interpretação
UI/mL	Valor \log_{10}	
Não detetado	Não detetado	DNA do CMV não detetado.
< 176 detetado	< 2,24	Foi detetado DNA do CMV, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLoQ).
176 a 10 000 000	2,24 a 7,00	A concentração de DNA do CMV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLoQ e o ULoQ UI/mL.
> 10 000 000	> 7,00	A concentração de DNA do CMV situa-se acima do limite superior de quantificação (ULoQ).
Inválido ^a	Inválido ^a	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

^aOs resultados inválidos são apresentados em letra de cor azul.

Limitações

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

Desempenho

Limite de detecção utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS

O limite de detecção (LoD) do ensaio é definido como a concentração de DNA do CMV que é detetada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹⁴

Limite de detecção utilizando os Padrões da OMS no plasma

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS (código NIBSC 09/162) para CMV²¹ diluído em plasma humano CMV negativo. 60 réplicas de cada diluição foram testadas com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 180 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 3 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Aptima CMV Quant Assay utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS é 40,7 UI/mL para o plasma.

Tabela 3: Limite de detecção para o plasma utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/mL)
10%	1,9
20%	2,9
30%	4,0
40%	5,3
50%	6,9
60%	9,1
70%	12,2
80%	17,1
90%	27,5
95%	40,7

Limite de detecção utilizando os Padrões da OMS no sangue total

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS para CMV diluído em sangue total CMV negativo. 60 réplicas de cada diluição foram testadas com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 180 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 4 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Aptima CMV Quant Assay utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS é 131,0 UI/mL para o sangue total.

Tabela 4: Limite de detecção para o sangue total utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/mL)
10%	8,8
20%	13,2
30%	17,7
40%	22,7
50%	28,7
60%	36,2
70%	46,5
80%	62,4
90%	93,7
95%	131,0

Limite de detecção em vários genótipos do CMV

Limite de detecção em vários genótipos do CMV no plasma

Foi verificado o LoD para três genótipos diferentes com base na sequência da glicoproteína B⁷ (gB-2, gB-3 e gB-4) testando várias concentrações do CMV próximas do LoD estabelecido para o plasma utilizando o Padrão da OMS (genótipo gB-1). Os testes foram realizados com 30 réplicas por membro do painel por lote de reagente utilizando dois lotes de reagentes Aptima CMV Quant. O LoD mais elevado verificado nos três genótipos foi de 40 UI/mL utilizando ambos os lotes de reagentes.

Tabela 5: Limite de detecção em vários genótipos do CMV no plasma

Genótipo	Concentração (UI/mL)
gB-2	40
gB-3	40
gB-4	35

O LoD global no plasma é de 40,7 UI/mL.

Limite de detecção em vários genótipos do CMV no sangue total

Foi verificado o LoD para três genótipos da glicoproteína B (gB-2, gB-3 e gB-4) testando várias concentrações do CMV próximas do LoD estabelecido para o sangue total utilizando o Padrão da OMS para o CMV (genótipo gB-1). Os testes foram realizados com 30 réplicas por membro do painel por lote de reagente utilizando dois lotes de reagentes Aptima CMV Quant. O LoD mais elevado verificado nos três genótipos foi de 150 UI/mL utilizando ambos os lotes de reagentes.

Tabela 6: Limite de detecção em vários genótipos do CMV no sangue total

Genótipo	Concentração (UI/mL)
gB-2	150
gB-3	150
gB-4	130

O LoD global no sangue total é de 150 UI/mL.

Intervalo linear

Intervalo linear no plasma

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do CMV diluído em plasma humano CMV negativo, de acordo com a norma CLSI EP06-A.¹⁵ A concentração dos painéis variou entre 1,62 log UI/mL e 7,30 log UI/mL. O Aptima CMV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 7 log UI/mL conforme mostrado na Figura 7.

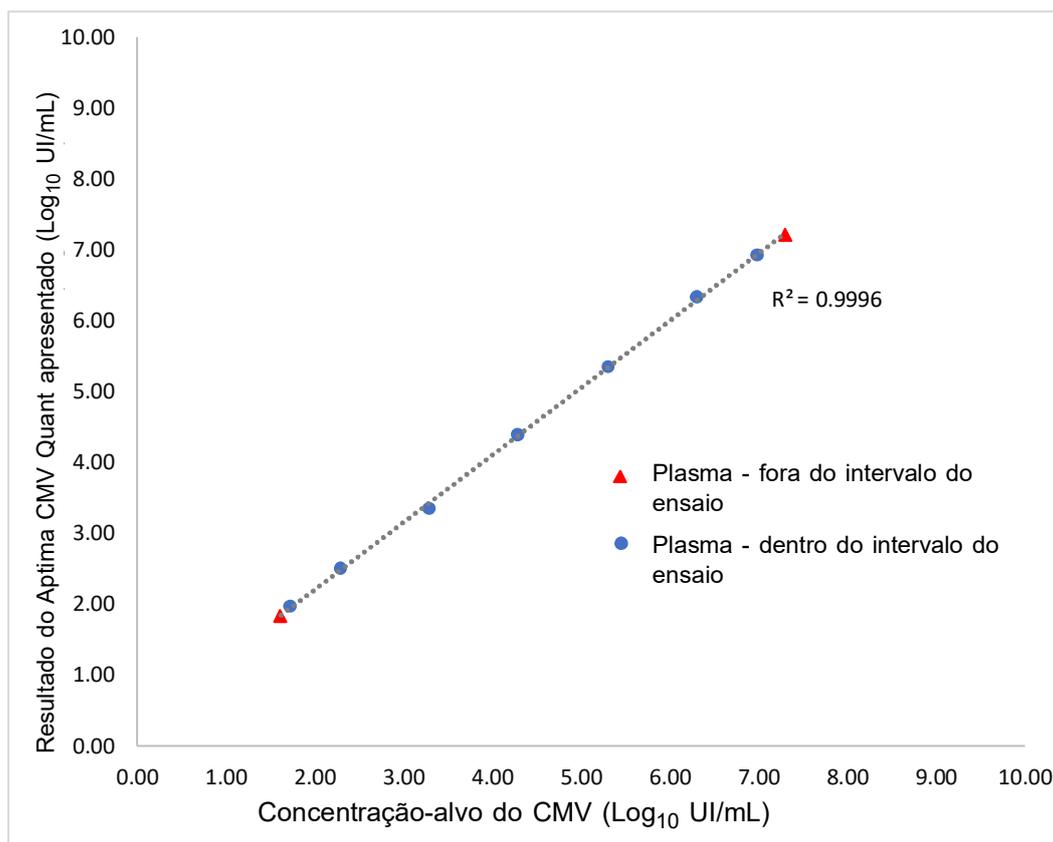


Figura 7. Linearidade no plasma

Intervalo linear no sangue total

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do CMV diluído em sangue total humano CMV negativo, de acordo com a norma CLSI EP06-A.¹⁵ A concentração dos painéis variou entre 2,15 log UI/mL e 7,3 log UI/mL para o sangue total. O Aptima CMV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 7 log UI/mL conforme mostrado na Figura 8.

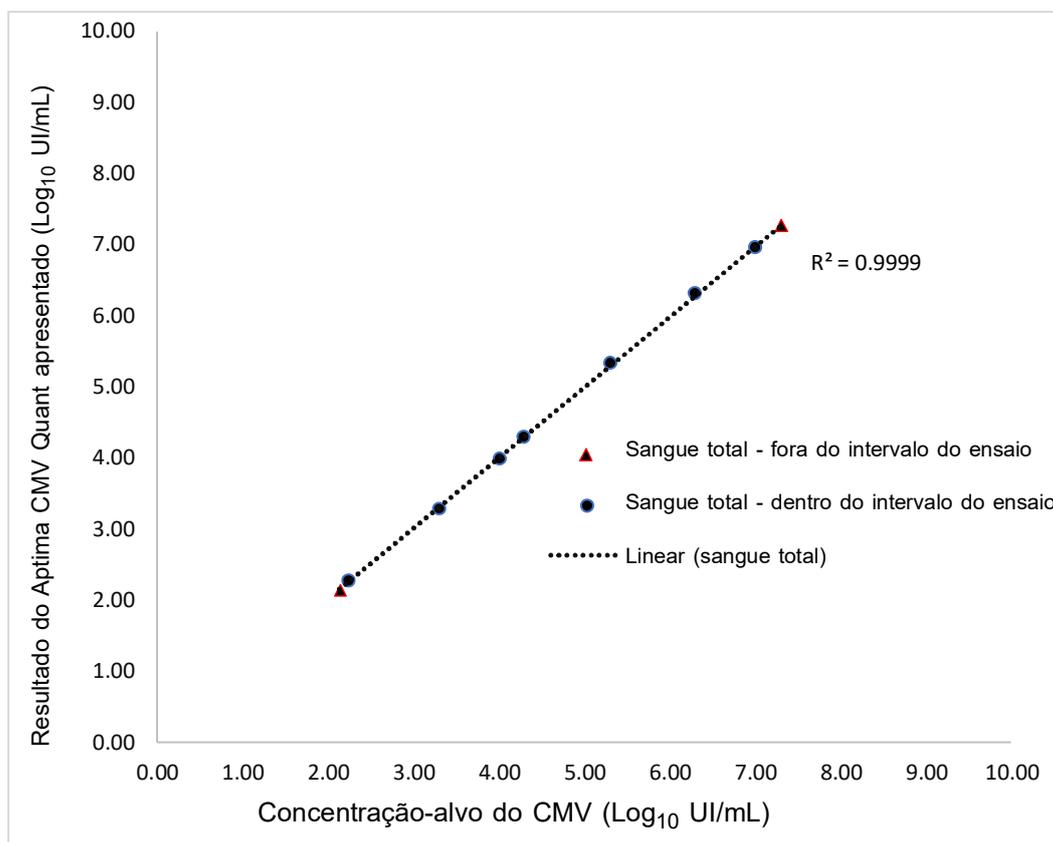


Figura 8. Linearidade no sangue total

Linearidade em vários genótipos do CMV

Linearidade em vários genótipos do CMV no plasma

Foi verificada a linearidade para os genótipos da glicoproteína gB-2, gB-3 e gB-4 testando painéis de CMV diluído em plasma CMV negativo a concentrações que variam de 1,72 log UI/mL a 7,00 log UI/mL. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo para todos os genótipos testados, conforme mostrado na Figura 9.

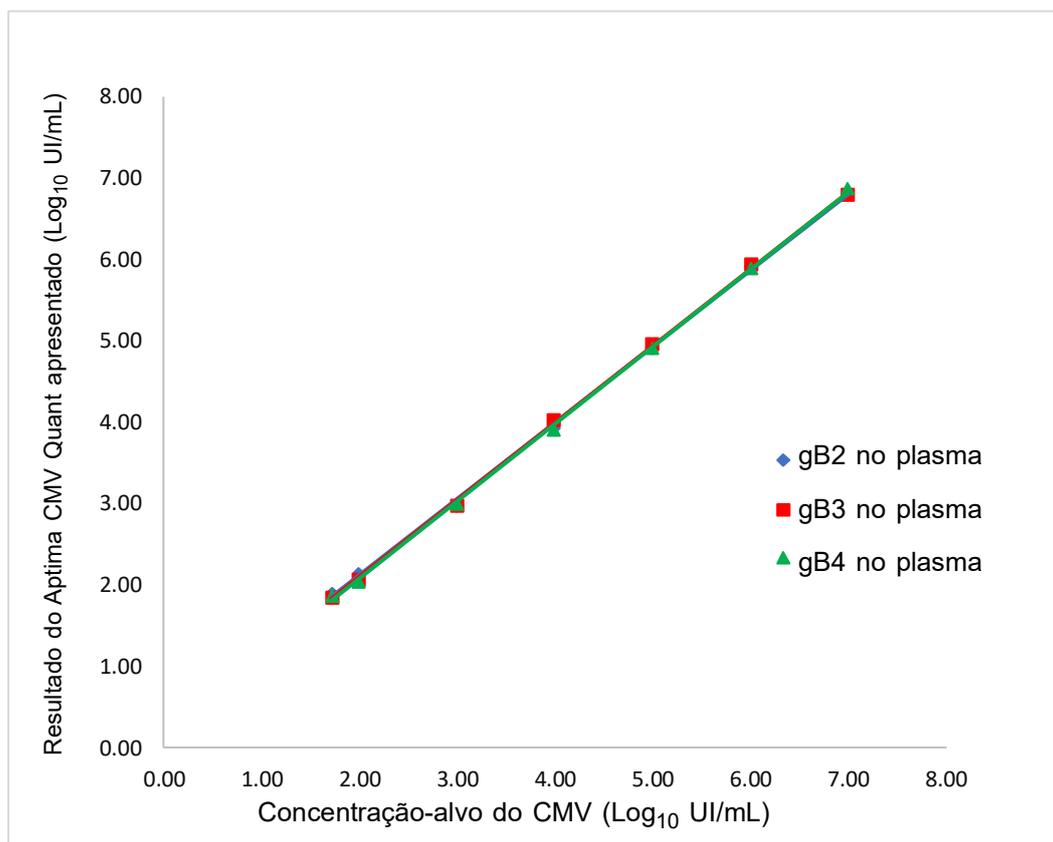


Figura 9. Linearidade nos genótipos do CMV gB-2, gB-3 e gB-4 no plasma

Linearidade em vários genótipos do CMV no sangue total

Foi verificada a resposta linear para os genótipos da glicoproteína gB-2, gB-3 e gB-4 testando painéis de CMV diluído em sangue total CMV negativo a concentrações que variam de 2,25 log UI/mL a 7,00 log UI/mL. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo para os três genótipos testados, conforme mostrado na Figura 10.

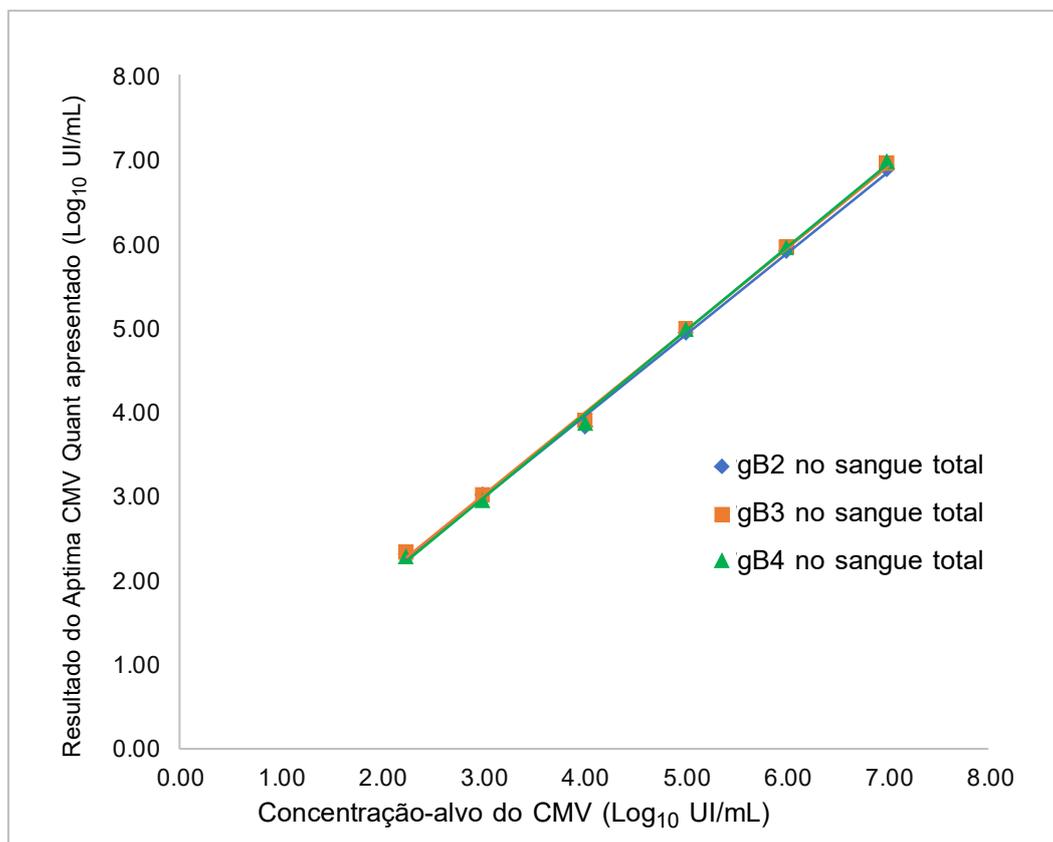


Figura 10. Linearidade nos genótipos do CMV gB-2, gB-3 e gB-4 no sangue total

Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS

O limite inferior de quantificação (LLoQ) é definido como a concentração mais baixa na qual o DNA do CMV é quantificado com fiabilidade dentro de um erro total, de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹⁴ O erro total foi calculado utilizando o modelo de Westgard: Erro Total (ET) = |Desvio sistemático| + 2DP. Para garantir a exatidão das medições, o erro total do Aptima CMV Quant Assay foi definido para 1 log UI/mL (ou seja, no LLoQ, uma diferença superior a 1 log UI/mL entre duas medições é estatisticamente significativa).

Limite inferior de quantificação utilizando o Padrão da OMS no plasma

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS (código NIBSC 09/162) para DNA de CMV diluído em plasma humano CMV negativo. 60 réplicas de cada diluição foram testadas com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 180 réplicas por diluição. Os resultados do LLoQ para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 7. Os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção $\geq 95\%$ estão resumidos na Tabela 8. O LLoQ gerado com o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV no plasma é 53 UI/mL.

Tabela 7: Determinação do LLoQ utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV diluído em plasma

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)
1	60	56	1,48	1,64	0,36	0,16	0,87
	60	59	1,54	1,72	0,29	0,18	0,76
	60	59	1,60	1,74	0,28	0,14	0,70
	60	59	1,70	1,85	0,19	0,15	0,53
2	60	56	1,48	1,56	0,29	0,09	0,67
	60	58	1,54	1,61	0,27	0,07	0,60
	60	58	1,60	1,69	0,28	0,09	0,64
3	60	60	1,70	1,83	0,24	0,14	0,62
	60	56	1,48	1,67	0,26	0,19	0,71
	60	58	1,54	1,67	0,24	0,13	0,60
	60	60	1,60	1,78	0,19	0,18	0,55
	60	60	1,70	1,87	0,22	0,17	0,61

DP=desvio padrão

Os membros do painel coincidentes com o objetivo de exatidão (ET ≤ 1) e detecção $\geq 95\%$ para os lotes de reagentes 1, 2 e 3 estão sombreados.

Tabela 8: Resumo do LLoQ para o plasma utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Lote de reagente	(UI/mL)	(log UI/mL)
1	53	1,72
2	41	1,61
3	47	1,67

Limite inferior de quantificação utilizando o Padrão da OMS no sangue total

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS para DNA de CMV diluído em sangue total humano CMV negativo. 60 réplicas de cada diluição foram testadas com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 180 réplicas por diluição. Os resultados para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 9. Os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção $\geq 95\%$ estão resumidos na Tabela 10. O LLoQ gerado com o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV no sangue total é 176 UI/mL.

Tabela 9: Determinação do LLoQ utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV diluído em sangue total

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)
1	60	58	2,11	2,06	0,47	0,06	1,00
	60	59	2,16	2,04	0,51	0,12	1,14
	60	60	2,20	2,14	0,44	0,06	0,94
	60	59	2,24	2,28	0,26	0,04	0,56
2	60	60	2,11	2,02	0,42	0,09	0,93
	60	60	2,16	2,12	0,26	0,04	0,56
	60	59	2,20	2,14	0,30	0,07	0,67
	60	60	2,24	2,26	0,26	0,02	0,53
3	60	59	2,11	2,25	0,43	0,13	1,00
	60	59	2,16	2,34	0,27	0,18	0,72
	60	60	2,20	2,38	0,30	0,17	0,77
	60	60	2,24	2,39	0,30	0,15	0,74

DP=desvio padrão

Os membros do painel coincidentes com o objetivo de exatidão (ET ≤ 1) e detecção $\geq 95\%$ para os lotes de reagentes 1, 2 e 3 estão sombreados.

Tabela 10: Resumo do LLoQ para o sangue total utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Lote de reagente	(UI/mL)	(log UI/mL)
1	138	2,14
2	106	2,02
3	176	2,25

Determinação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do CMV

Limite inferior de quantificação em vários genótipos no plasma

Foi verificado o LLoQ estabelecido utilizando o Padrão da OMS testando diluições dos genótipos do CMV gB-2, gB-3 e gB-4 em plasma humano CMV negativo. 60 réplicas de cada membro do painel foram testadas com um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Tabela 11. O LLoQ calculado para os genótipos gB-2, gB-3 e gB-4 do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção $\geq 95\%$ está resumido na Tabela 12. O LLoQ global para o plasma neste ensaio é de 53 UI/mL.

Tabela 11: Determinação do LLoQ em vários genótipos no plasma

Genótipo	N	N detetado	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)
gB-2	60	56	1,48	1,38	0,41	0,10	0,92
	60	58	1,54	1,39	0,39	0,16	0,95
	60	56	1,60	1,49	0,38	0,11	0,87
	60	58	1,65	1,70	0,24	0,04	0,51
	60	57	1,70	1,54	0,32	0,16	0,80
gB-3	60	55	1,48	1,27	0,38	0,20	0,97
	60	55	1,54	1,27	0,40	0,27	1,07
	60	53	1,60	1,31	0,47	0,29	1,23
	60	56	1,65	1,46	0,34	0,20	0,88
	60	55	1,70	1,57	0,29	0,13	0,71
gB-4	60	58	1,48	1,38	0,39	0,09	0,88
	60	59	1,54	1,51	0,33	0,03	0,69
	60	57	1,60	1,66	0,36	0,06	0,79
	60	59	1,65	1,66	0,29	0,01	0,59
	60	60	1,70	1,70	0,24	0,00	0,48

DP=desvio padrão

Os membros do painel coincidentes com o objetivo de exatidão ($ET \leq 1$) e detecção $\geq 95\%$ para os lotes de reagentes 1, 2 e 3 estão sombreados.

Tabela 12: Resumo do LLoQ em vários genótipos no plasma

Genótipo	LLoQ	
	(UI/mL)	(log UI/mL)
gB-2	50	1,70
gB-3	35	1,55
gB-4	24	1,38

Limite inferior de quantificação em vários genótipos no sangue total

Foi verificado o LLoQ estabelecido utilizando o Padrão da OMS testando diluições dos genótipos do CMV gB-2, gB-3 e gB-4 em sangue total humano CMV negativo. 60 réplicas de cada membro do painel foram testadas com um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Tabela 13. O LLoQ para os genótipos gB-2, gB-3 e gB-4 do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção $\geq 95\%$ está resumido na Tabela 14. O LLoQ global para o sangue total neste ensaio é de 176 UI/mL.

Tabela 13: Determinação do LLoQ em vários genótipos no sangue total

Genótipo	N	N detetado	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)	(log UI/mL)
gB-2	60	56	2,08	1,77	0,43	0,30	1,16
	60	56	2,15	1,87	0,39	0,27	1,06
	60	56	2,20	1,80	0,59	0,40	1,58
	60	58	2,26	1,97	0,41	0,28	1,11
	60	59	2,30	2,06	0,50	0,24	1,24
	60	57	2,34	2,01	0,52	0,33	1,38
	60	59	2,38	2,11	0,36	0,27	1,00
	60	60	2,41	2,19	0,30	0,23	0,84
gB-3	60	46	2,08	1,73	0,59	0,35	1,53
	60	54	2,15	1,78	0,50	0,36	1,37
	60	54	2,20	1,87	0,50	0,33	1,34
	60	58	2,26	2,02	0,52	0,23	1,27
	60	58	2,30	2,02	0,32	0,28	0,92
gB-4	60	55	2,08	1,78	0,53	0,30	1,37
	60	57	2,15	1,97	0,40	0,18	0,97
	60	58	2,20	2,09	0,39	0,12	0,89

DP=desvio padrão

Tabela 14: Resumo do LLoQ em vários genótipos no sangue total

Genótipo	LLoQ	
	(UI/mL)	(log UI/mL)
gB-2	129	2,11
gB-3	104	2,02
gB-4	93	1,97

Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS

Durante o desenvolvimento e o fabrico do produto, foi utilizada uma série de padrões secundários com concentrações conhecidas para estabelecer a rastreabilidade ao padrão da OMS. O padrão da OMS para o CMV foi diluído e testado juntamente com os padrões secundários, bem como controlos do ensaio e calibradores utilizados no Aptima CMV Quant Assay para avaliar a rastreabilidade de acordo com a norma CLSI EP32-R.¹⁶ A concentração dos padrões secundários variou entre 1,80 e 6,60 log₁₀ UI/mL.

Rastreabilidade ao Padrão da OMS utilizando plasma

As concentrações testadas para o padrão da OMS para o CMV foram entre 2,18 e 4,70 log₁₀ UI/mL. Os painéis de plasma da OMS, os padrões secundários, os controlos do ensaio e os calibradores do ensaio recuperaram conforme esperado, em todo o intervalo linear do ensaio, como se pode observar na Figura 11.

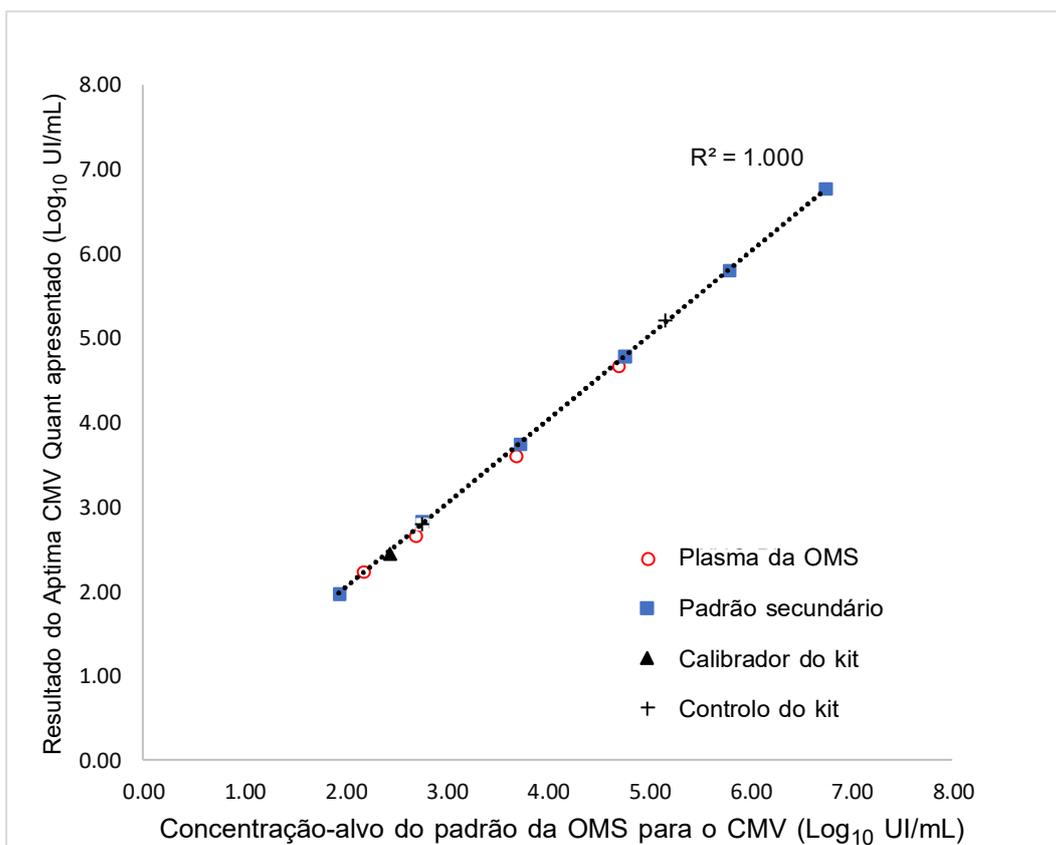


Figura 11. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º Padrão da OMS para o CMV e as concentrações apresentadas no Aptima CMV Quant Assay (Padrão da OMS diluído em plasma)

Rastreabilidade ao Padrão da OMS utilizando sangue total

As concentrações testadas para o padrão da OMS para o CMV em sangue total foram entre 2,70 e 4,70 log₁₀ UI/mL. Os painéis de sangue total com padrões da OMS, os padrões secundários, os controlos do ensaio e os calibradores do ensaio recuperaram conforme esperado, em todo o intervalo linear do ensaio, como se pode observar na Figura 12.

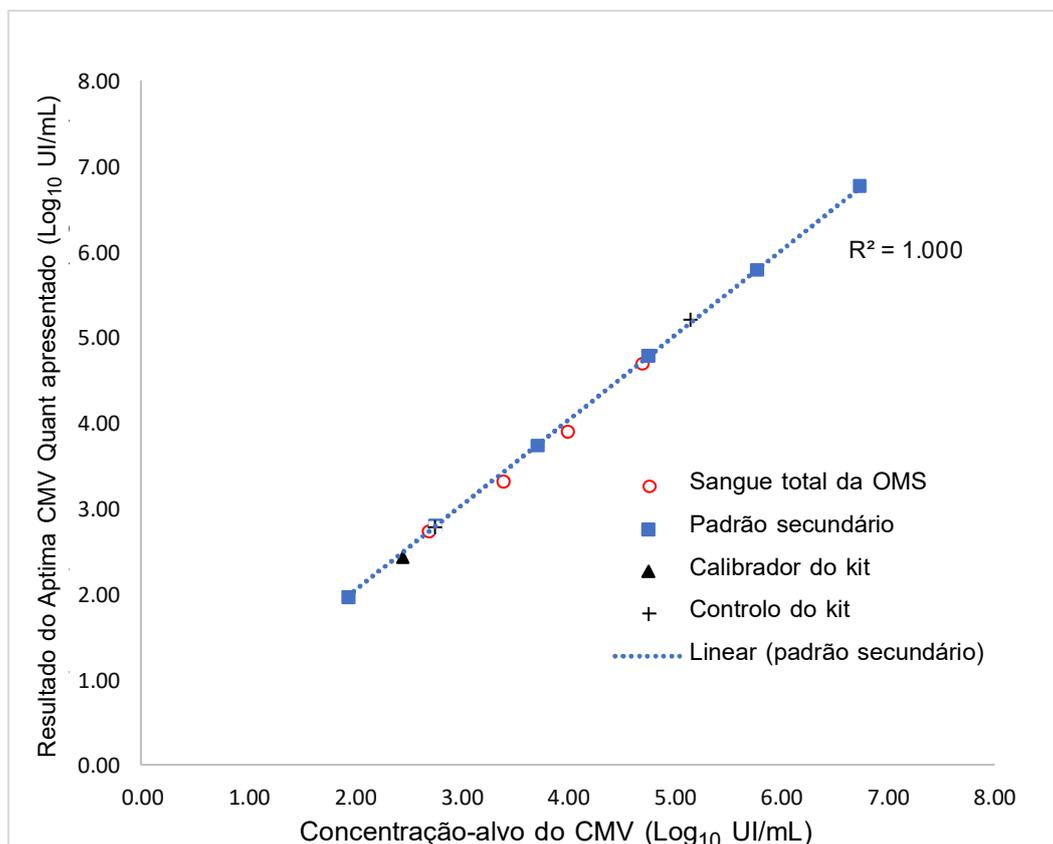


Figura 12. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º Padrão da OMS para o CMV e as concentrações apresentadas no Aptima CMV Quant Assay (Padrão da OMS diluído em sangue total)

Reprodutibilidade

Plasma

Para avaliar a reprodutibilidade, foi constituído um painel de 6 membros diluindo espécimes clínicos CMV positivos ou CMV em cultura em plasma CMV 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. Cada operador realizou duas execuções por dia e cada membro do painel foi testado em duplicado em cada execução. O estudo foi desenhado e analisado seguindo as recomendações da norma CLSI EP-05-A3.¹⁷

A Tabela 15 mostra a reprodutibilidade dos resultados do ensaio (em log UI/mL) entre instrumentos, operadores, lotes de reagentes, execuções, dias, dentro das execuções e globais. A variabilidade total ficou a dever-se principalmente à variabilidade dentro das execuções (por exemplo, erro aleatório).

Tabela 15: Reprodutibilidade do Aptima CMV Quant Assay no plasma

N	Concentração média (log UI/mL)	Inter-lote DP	Inter-instrumentos DP	Inter-operador DP	Inter-dia DP	Inter-execução DP	Intra-execução DP	Total DP
108	2,28	0,02	0,04	0,00	0,00	0,06	0,16	0,18
108	2,82	0,06	0,00	0,00	0,04	0,07	0,11	0,14
108	3,49	0,07	0,00	0,01	0,06	0,06	0,11	0,15
108	4,53	0,04	0,02	0,04	0,00	0,07	0,07	0,11
108	5,57	0,06	0,00	<0,001	0,04	0,02	0,09	0,12
108	6,67	0,06	0,03	0,00	0,00	0,00	0,10	0,12

DP=desvio padrão

Nota: a variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devido a esses fatores for muito pequena. Quando tal sucede, o DP é mostrado como 0.

Sangue total

Para avaliar a reprodutibilidade, foi constituído um painel de 6 membros diluindo espécimes clínicos CMV positivos ou contaminando com CMV em cultura sangue total CMV 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. Cada operador realizou duas execuções por dia e cada membro do painel foi testado em duplicado em cada execução.

A Tabela 16 mostra a reprodutibilidade dos resultados do ensaio (em log UI/mL) entre instrumentos, operadores, lotes, execuções, dias, dentro das execuções e globais.

A variabilidade total ficou a dever-se principalmente à variabilidade dentro das execuções (por exemplo, erro aleatório).

Tabela 16: Reprodutibilidade do Aptima CMV Quant Assay no sangue total

N	Concentração média (log UI/mL)	Inter-lote DP	Inter-instrumentos DP	Inter-operador DP	Inter-dia DP	Inter-execução DP	Intra-execução DP	Total DP
108	2,78	0,00	0,01	0,05	0,00	0,08	0,14	0,17
108	3,38	0,03	0,00	0,04	0,00	0,00	0,13	0,14
108	3,95	0,06	0,00	0,07	0,05	0,05	0,13	0,18
108	4,76	0,03	0,01	0,08	0,00	0,07	0,12	0,16
108	5,64	0,01	0,00	0,07	0,00	0,00	0,11	0,13
108	6,74	0,03	0,00	0,05	0,00	0,04	0,09	0,12

DP=desvio padrão

Nota: a variabilidade de alguns fatores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devido a esses fatores for muito pequena. Quando tal sucede, o DP é mostrado como 0.

Substâncias potencialmente interferentes

Foi avaliada a suscetibilidade do Aptima CMV Quant Assay a interferência por níveis elevados de substâncias endógenas, anticoagulantes ou fármacos geralmente prescritos a doentes transplantados. As concentrações de teste para cada uma das substâncias interferentes foram selecionadas com base em referências da literatura disponível e orientações fornecidas pelas normas CLSI EP07¹⁸ e EP37¹⁹. Foram testadas amostras de plasma CMV negativas e amostras contaminadas com CMV a uma concentração de 2,22 log UI/mL e 3,30 log UI/mL. Foi testada a hemoglobina de amostras de sangue total CMV negativas e de amostras contaminadas com CMV a uma concentração de 2,72 e 4,00 log UI/mL de DNA do CMV.

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio nas amostras de plasma na presença de albumina (60 mg/mL), hemoglobina (10 mg/mL), triglicéridos (15 mg/mL), bilirrubina não conjugada (0,4 mg/mL) ou DNA genômico humano (2 µg/mL). Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio nas amostras de sangue total na presença de 100 mg/mL de hemoglobina adicionados às amostras de sangue total.

Foram testados com o Aptima CMV Quant Assay espécimes de plasma clínicos de doentes com níveis elevados de substâncias específicas, ou de doentes com as doenças listadas na Tabela 17. Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 17: Tipos de espécimes clínicos testados

	Tipos de espécimes clínicos	Número de espécimes clínicos testados
1	Anticorpos antinucleares (ANA)	10
2	Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	10
3	Artrite reumatoide (AR)	10

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 18 em concentrações pelo menos três vezes a $C_{máx}$ de fármacos no plasma humano.

Tabela 18: Substâncias exógenas

Grupo de substâncias exógenas	Substâncias exógenas testadas
1	Cefotetano, clavulanato de potássio, ticarcilina dissódica, vancomicina
2	Piperacilina
3	Sulfametoxazol
4	Tazobactam sódico, trimetoprim, fluconazol
5	Ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, valaciclovir, aciclovir, letermovir
6	Azatioprina, ciclosporina, micofenolato de mofetil, ácido micofenólico
7	Sirolímus, tacrolímus, prednisona, everolímus
8	Citrato de sódio, EDTA, heparina

Especificidade

A especificidade foi determinada testando 780 espécimes clínicos congelados CMV negativos. A especificidade foi calculada como a porcentagem de amostras CMV negativas com resultados "Não detetado" versus o número total de amostras testadas para cada tipo de amostra.

O DNA do CMV não foi detetado em 389 amostras de plasma e em 390 amostras de sangue total. A especificidade foi de 99,7% (389/390, IC de 95%: 98,6 -100%) para plasma e 100% (390/390, IC de 95%: 99,3–100%). A especificidade combinada do Aptima CMV Quant Assay para plasma e sangue total foi de 99,9% (779/780, IC de 95%: 99,3–100%).

Tabela 19: Especificidade em espécimes de plasma e de sangue total

	Plasma	Sangue total	Plasma e sangue total
Réplicas válidas (n)	390	390	780
Não detetado	389	390	779
Especificidade	99,7%	100%	99,9%
(IC de 95%)	(98,6-100)	(99,3-100)	(99,3-100)

IC=intervalo de confiança

Especificidade analítica

A potencial reatividade cruzada com os agentes patogênicos listados na Tabela 20 foi avaliada no plasma humano CMV negativo na presença ou ausência de 2,2 log UI/mL e 3,3 log UI/mL do CMV. Os três parasitas do sangue encontrados em espécimes de sangue total foram também avaliados no sangue total CMV negativo na presença ou ausência de 2,7 log UI/mL e 4,0 log UI/mL do CMV. Os agentes patogênicos foram testados à concentração mais alta disponível. Não foi observada reatividade cruzada ou interferência.

Tabela 20: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração		Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração	
Adenovírus tipo 4	1886	TCID50/mL ^a	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1 000 000	CFU/mL
Poliomavírus BK	1 000 000	cp/mL ^b	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1 000 000	CFU/mL
Vírus Epstein-Barr	1 000 000	cp/mL	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/mL
HBV	1 000 000	UI/mL ^c	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 000 000	CFU/mL
HCV	1 000 000	cp/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 000 000	CFU/mL
Vírus herpes simplex tipo 1	1 428 571	TCID50/mL	<i>Salmonella enterica serotipo Typhimurium</i>	1 000 000	CFU/mL
Vírus herpes simplex tipo 2	147 143	TCID50/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 000 000	CFU/mL
Subtipo B de HIV-1	1 000 000	cp/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 000 000	CFU/mL
Herpesvírus humano 6A	1 000 000	cp/mL	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 000 000	CFU/mL
Herpesvírus humano 7	1 428 571	TCID50/mL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/mL
Herpesvírus humano 8	1 000 000	cp/mL	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 000 000	CFU/mL
Metapneumovírus humano	192 857	TCID50/mL	<i>Aspergillus niger</i>	485 000	CFU/mL
Papilomavírus humano tipo 18	1 000 000	cp/mL	<i>Candida albicans</i>	1 000 000	CFU/mL
Vírus parainfluenza humano	944	TCID50/mL	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 000 000	CFU/mL
Vírus influenza	3857	TCID50/mL	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 000 000	células/mL
Rinovírus	7257	TCID50/mL	<i>Leishmania major</i> *	1 000 000	células/mL
Vírus varicela zoster	1 000 000	cp/mL	<i>Babesia microti</i> *	1 000 000	células/mL
Vírus Zika	29 286	TCID50/mL	<i>Plasmodium falciparum</i> *	1 000 000	células/mL
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 000 000	CFU/mL ^d	^a TCID50/mL = unidades de dose infecciosa de cultura do tecido por mL		
<i>Clostridium perfringens</i>	1 000 000	CFU/mL	^b cp/mL = cópias virais por mL		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000	CFU/mL	^c UI/mL = unidades internacionais por mL		
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 000 000	CFU/mL	^d CFU/mL = unidades formadoras de colônias por mL		
<i>Escherichia coli</i>	1 000 000	CFU/mL	*testado com tipo de amostra de sangue total		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 000 000	CFU/mL			

Correlação de métodos

Este estudo foi desenhado de acordo com a norma CLSI EP09c.¹⁹

Correlação de métodos no plasma

O desempenho do Aptima CMV Quant Assay foi avaliado em relação ao Roche cobas® CMV no cobas® 6800 System testando espécimes clínicos não diluídos de doentes CMV positivos e espécimes artificiais compostos por várias estirpes de vírus em cultura pertencentes aos quatro genótipos adicionados a plasma EDTA negativo de doadores individuais. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 160 espécimes clínicos e 115 espécimes artificiais dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 13.

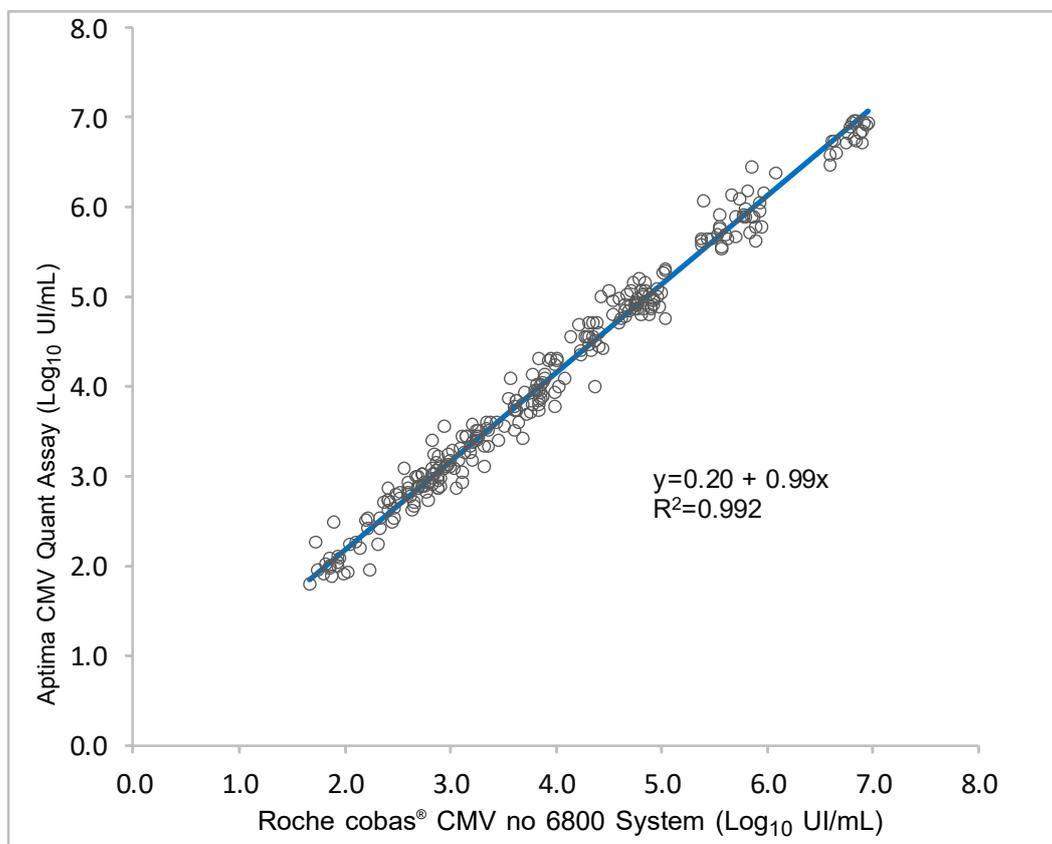


Figura 13. Correlação entre a carga viral de CMV no Aptima CMV Quant Assay e no Roche cobas® CMV Assay nos testes de amostras de plasma

Correlação de métodos no sangue total

O desempenho do Aptima CMV Quant Assay foi avaliado em relação ao Abbott CMV RealTime Assay na plataforma m2000 testando espécimes clínicos não diluídos de doentes CMV positivos e espécimes artificiais compostos por vírus em cultura adicionados a sangue total EDTA negativo de dadores individuais. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 159 espécimes clínicos e 83 espécimes artificiais dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 14.

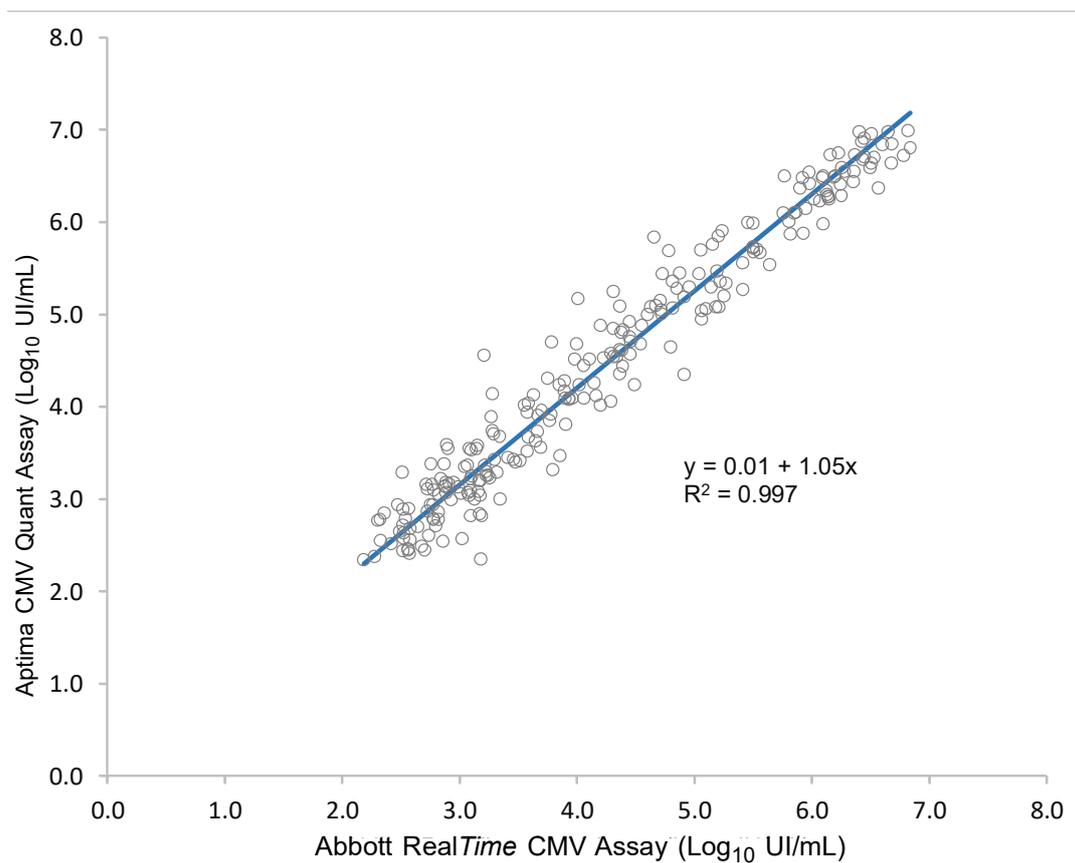


Figura 14. Correlação entre a carga viral de CMV no Aptima CMV Quant Assay e no Abbott RealTime CMV Assay nos testes de amostras de sangue total

Contaminação por transferência

Foi avaliada a contaminação por transferência no Panther System utilizando plasma como um tipo de amostra, utilizando outros ensaios de carga viral (Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, Aptima HCV Quant Assay, Aptima HBV Quant Assay). Não foi observada contaminação por transferência nos testes anteriores. Para estabelecer se o Panther System minimiza o risco de resultados falsos positivos decorrentes de contaminação por transferência no tipo de amostra de sangue total, foi realizado um estudo utilizando painéis contaminados em três Panther Systems. A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras de sangue total contaminadas com DNA do CMV de título elevado (6 log UI/mL) dispersas entre amostras CMV negativas num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de doze execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0,24% (1/423).

Bibliografia

1. **Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ.** Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-2004. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:531-540.
2. **Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB.** Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection. *Reviews in Medical Virology* 2010;20:202-213.
3. **Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH.** The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies *Cell and Mol Immunol.* 2015;12:128-138.
4. **Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al.** The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 2018;102(6):900-931.
5. **Emery VC, Sabin CA, Cope AV, et al.** Application of Viral-Load Kinetics to Identify Patients who Develop Cytomegalovirus Disease After Transplantation. *Lancet.* 2000; 10;355(9220):2032-6.
6. **Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al.** Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Predicting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 1999; 15;68(9):1305-11.
7. **Humar A, Kumar D, Gilbert C, et al.** Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes and Response to Antiviral Therapy, in Solid-Organ–Transplant Recipients with CMV Disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003;188(4):581–4,
8. **Razonable RR, Hayden RT.** Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection After Solid Organ Transplantation. *Clinical Microbiology Reviews.* 2013; 26(4):703-727.
9. **de la Cámara R.** CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2016; 20;8(1):e2016031.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
11. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
12. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
14. **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.
15. **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.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006. Metrological Traceability and Its Implementation; A Report. CLSI document EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EO05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Interference testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. **1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/162),**Merlin strain



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



Hologic BV
Da Vinciiaan 5
1930 Zaventem
Belgium

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

Hologic, Aptima e Panther são marcas comerciais e/ou marcas registradas da Hologic, Inc. e/ou respectivas 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 seguintes patentes nos EUA identificadas em www.hologic.com/patents.

© 2021 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-21334-601 Rev. 001

2021-03