

BKV Quant Assay (Panther Fusion™)

Para efeitos de diagnóstico *in vitro*

Apenas para exportação pelos EUA

ÍNDICE

Informações gerais	2
Utilização prevista	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	2
Advertências e precauções	4
Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes	6
Colheita, processamento e conservação de espécimes	7
Amostras dentro do Panther Fusion System	9
Transporte de espécimes	9
Panther Fusion System	10
Reagentes e materiais fornecidos	10
Materiais necessários, mas disponíveis em separado	11
Materiais opcionais	12
Procedimento de teste no Panther Fusion System	12
Notas sobre o procedimento	17
Controlo de qualidade	18
Calibração do ensaio	18
Controlos negativo e positivo	18
Controlo interno	19
Interpretação de resultados	20
Limitações	21
Desempenho	22
Limite de deteção utilizando o 1.º padrão internacional da OMS	22
Intervalo linear	23
Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º padrão internacional da OMS	24
Confirmação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do BKV	26
Rastreabilidade ao 1.º padrão internacional da OMS	27
Precisão no laboratório	28
Substâncias potencialmente interferentes	29
Especificidade analítica	31
Correlação de métodos	32
Contaminação por transferência/cruzada	33
Bibliografia	34
Informações de contacto	35

Informações gerais

Utilização prevista

O Panther Fusion™ BKV Quant Assay é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* de PCR em tempo real (RT-PCR) totalmente automatizado para a quantificação do DNA de vírus BK (BKV) humano em amostras de plasma e urina humanos.

O Panther Fusion BKV 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 Panther Fusion BKV Quant Assay não se destina a ser utilizado como um ensaio de rastreio à presença de BKV no plasma ou na urina. Este ensaio foi concebido para ser usado no Panther Fusion System.

Resumo e explicação do teste

O BKV é um vírus pequeno, não-envelopado, altamente prevalente com um genoma de DNA de cadeia dupla circular fechado. O BKV é um poliomavírus humano que pertence à família dos Papovaviridae.

A exposição primária ao BKV ocorre na infância, resultando no facto de 80 a 90% dos adultos terem desenvolvido anticorpos contra o BKV. A maioria das infeções primárias por BKV é assintomática ou minimamente sintomática. Após a infeção primária, acredita-se que o vírus permanece latente no trato urinário sem manifestação da doença em indivíduos imunocompetentes.¹

A reativação viral ocorre em indivíduos imunocomprometidos e ocorre frequentemente em doentes submetidos a transplante renal e doentes com transplante de células estaminais hematopoéticas (TCEH). Nos doentes com transplante renal, a reativação do BKV está associada a nefropatia (BKVN) e estenose ureteral; a BKVN ocorre em aproximadamente 5% dos doentes com transplante renal no prazo de um ano após o transplante. A reativação do BKV é importante para os recetores de TCEH com cistite hemorrágica de início tardio, ocorrendo em 6 a 29% dos doentes no prazo de 2 meses após o transplante.²

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos a partir de espécimes de plasma e urina são um marcador laboratorial importante para o diagnóstico e a monitorização da infeção por BKV em recetores de transplantes. As orientações recentes recomendam que os doentes com transplante renal sejam rastreados regularmente quanto aos níveis de DNA de BKV no plasma após o transplante para identificar os doentes que devem ser considerados para tratamento preventivo da nefropatia. O risco de desenvolver BKVN aumenta quando são observados níveis elevados de DNA de BKV no plasma e na urina, mas também pode ocorrer em doentes com níveis de BKV inferiores.^{3,4}

Princípios do procedimento

O Panther Fusion System automatiza completamente o processamento de espécimes, incluindo a lise celular, bem como a captura, amplificação e deteção do ácido nucleico para o Panther Fusion BKV Quant Assay. O Panther Fusion BKV Quant Assay tem como alvo o gene VP2 altamente conservado para garantir uma quantificação exata do DNA de BKV. O ensaio está padronizado de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC: 14/212) para BKV.⁵

Processamento de amostras e captura de ácidos nucleicos: Um controlo interno (IC-B) é automaticamente adicionado a cada espécime através do reagente de captura Fusion B de trabalho (wFCR-B), para monitorizar a interferência durante o processamento, amplificação e deteção de espécimes, causada pela falha de reagentes ou por substâncias inibitórias. Primeiro, os espécimes são adicionados ao reagente de captura Fusion B (FCR-B) e ao reagente estimulador Fusion B (FER-B) para libertar ácido nucleico para hibridação para partículas magnéticas. As partículas da captura são depois separadas da matriz de espécime residual num campo magnético por uma série de passos de lavagem com um detergente suave. O ácido nucleico capturado é depois eluído das partículas magnéticas com um reagente de baixa força iónica (tampão de eluição Panther Fusion).

Nota: O Panther Fusion System adiciona o IC-B ao FCR-B. Depois de adicionar o IC-B ao FCR-B, este passa a ser referido como wFCR-B.

Amplificação por PCR e deteção da fluorescência: A mistura principal para PCR em dose unitária liofilizada é reconstituída com o tampão de reconstituição I Panther Fusion e, em seguida, combinada com o ácido nucleico eluído num tubo de reação. O reagente de óleo Panther Fusion é adicionado para evitar a evaporação durante a reação da PCR. A amplificação do alvo por PCR ocorre subsequentemente com os "primers" inicial e final específicos do alvo gerando um sinal de fluorescência.

O Panther Fusion System fornece um valor de Ct proporcional à concentração de BKV nas amostras dos testes. A concentração da amostra é determinada pelo software do Panther Fusion System utilizando os valores de Ct de BKV para cada reação e comparando-os à curva de calibração. Os resultados de BKV são indicados em UI/ml e \log_{10} UI/ml para os espécimes de plasma e urina. Quando o fator de conversão de urina é selecionado no software do Panther Fusion, é automaticamente aplicado um fator de diluição de 2 aos resultados da carga viral de BKV para representar o passo de diluição durante o processamento de espécimes de urina.

Os alvos e os canais usados para a sua deteção no Panther Fusion System estão resumidos na seguinte tabela:




Alvo	Gene-alvo	Canal do instrumento
BKV	VP2	ROX
Controlo interno	Não aplicável	Quasar 705

Advertências e precauções

- A. Para efeitos de diagnóstico *in vitro*.
- B. Para uso profissional.
- C. Leia atentamente todo o folheto informativo e o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* antes de executar este ensaio.
- D. O reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) é corrosivo, nocivo por ingestão e provoca queimaduras cutâneas e lesões oculares graves.
- E. Estes procedimentos só devem ser executados por pessoal com a respetiva formação profissional na utilização deste ensaio e no manuseamento de materiais potencialmente infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente, respeitando os procedimentos locais apropriados.
- F. Os espécimes podem ser infecciosos. Respeite as precauções universais quando realizar este ensaio. A administração do laboratório deve estabelecer métodos adequados de manuseamento e eliminação. Este procedimento de diagnóstico só pode ser feito por pessoal com a formação profissional adequada em manuseamento de materiais infecciosos.⁶
- 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 descartáveis e isentas de pó, proteção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes. Lave muito bem as mãos depois de manusear espécimes e reagentes.
- H. Use somente os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- I. 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).
- J. Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com espécimes e reagentes, e faça-o de acordo com os regulamentos locais, nacionais e internacionais aplicáveis.
- K. Mantenha as condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes, para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime noutras condições de transporte que não as recomendadas não foi avaliada.
- L. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento de espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desapertar ou destapar espécimes. Os espécimes podem conter níveis extremamente elevados de vírus ou outros organismos. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e elimine os materiais usados sem passá-los por cima de quaisquer recipientes abertos. Mude de luvas se estas entrarem em contacto com espécimes.
- M. Não use os reagentes, calibradores ou controlos depois da respetiva data de expiração. Não utilize o tubo de transporte de espécimes Aptima™ após a respetiva data de expiração.
- N. Conserve os componentes de ensaio nas condições de conservação recomendadas. Consulte *Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes e Procedimento de teste no Panther Fusion System* para obter mais informações.

- O. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos de ensaio. Não reabasteça reagentes ou fluidos; o Panther Fusion System verifica os níveis de reagente.
- P. Evite a contaminação microbiana ou com nuclease dos reagentes.
- Q. Os requisitos de controlo de qualidade devem ser respeitados em conformidade com os regulamentos locais e/ou nacionais, ou requisitos de certificação, e os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório.
- R. Não use o cartucho de ensaio se a bolsa de conservação perder o selo, ou se a película do cartucho de ensaio não estiver intacta. Contacte o Suporte Técnico da Hologic em qualquer um dos casos.
- S. Não utilize os pacotes de fluidos se o selo de alumínio não estiver intacto. Contacte o Suporte Técnico da Hologic caso isto aconteça.
- T. Manuseie os cartuchos de ensaio com cuidado. Não deixe que os cartuchos de ensaio caiam ou invertam. Evite a exposição prolongada à luz ambiente.
- U. Alguns reagentes deste kit estão marcados com símbolos de risco e segurança.

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

Informações de perigos para a UE	
	<p>Cartucho do Panther Fusion BKV Quant Assay ALFA-CICLODEXTRINA 20-25%</p> <p>— —</p> <p>H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros P273 - Evitar a libertação para o ambiente P280 - Usar proteção ocular/proteção facial</p>
	<p>Óleo Panther Fusion POLIDIMETILSILOXANO, 100%</p> <p>ADVERTÊNCIA H315 - Provoca irritação cutânea H319 - Provoca irritação ocular grave</p>
	<p>Reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) MONOIDRATO DE HIDRÓXIDO DE LÍTIO a 5-10%</p> <p>PERIGO H302 - Nocivo por ingestão H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves</p>
	<p>P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de 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 de reagentes

A. A seguinte tabela fornece os requisitos de conservação e manuseamento para este ensaio.

Reagente	Conservação fechada	Estabilidade a bordo/aberta ¹	Conservação aberta
Cartucho do Panther Fusion BKV Quant Assay	2 °C a 8 °C	60 dias	2 °C a 8 °C ²
Reagente de captura B Panther Fusion (FCR-B)	15 °C a 30 °C	30 dias	15 °C a 30 °C
Reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B)	15 °C a 30 °C	30 dias	15 °C a 30 °C
Controlo interno B Panther Fusion (IC-B)	2 °C a 8 °C	(Em wFCR-B)	Não aplicável
Tampão de eluição Panther Fusion	15 °C a 30 °C	60 dias	15 °C a 30 °C
Óleo Panther Fusion	15 °C a 30 °C	60 dias	15 °C a 30 °C
Tampão de reconstituição I Panther Fusion	15 °C a 30 °C	60 dias	15 °C a 30 °C
Calibradores Panther Fusion BKV Quant (1-5)	-15 °C a -35 °C	Frasco de utilização única	Não aplicável – de utilização única
Controlo positivo alto Panther Fusion EBV–BKV Quant	-15 °C a -35 °C	Frasco de utilização única	Não aplicável – de utilização única
Controlo positivo baixo Panther Fusion EBV–BKV Quant	-15 °C a -35 °C	Frasco de utilização única	Não aplicável – de utilização única
Controlo negativo de transplante Panther Fusion (III)	-15 °C a -35 °C	Frasco de utilização única	Não aplicável – de utilização única

Quando os reagentes forem removidos do Panther Fusion System, devolva-os imediatamente às respetivas temperaturas de conservação.

¹ A estabilidade dentro do instrumento começa no momento em que o reagente é colocado no Panther Fusion System, para o cartucho do Panther Fusion BKV Quant Assay, FCR-B, FER-B e IC-B. A estabilidade dentro do instrumento para o tampão de reconstituição I Panther Fusion, tampão de eluição Panther Fusion e reagente de óleo Panther Fusion começa quando o conjunto de reagentes é utilizado pela primeira vez.

² Se for retirado do Panther Fusion System, conserve o cartucho de ensaio num recipiente hermético, com dessecante, à temperatura de conservação recomendada.

B. O reagente de captura de trabalho B Panther Fusion (wFCR-B) e o reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) são estáveis durante 60 dias quando tapados e conservados a 15 °C a 30 °C. Não refrigere.

C. Elimine quaisquer reagentes não usados que tenham ultrapassado a sua estabilidade.

D. Evite a contaminação cruzada durante o manuseamento e conservação de reagentes.

E. **Não congele os reagentes.**

F. **Não volte a congelar os controlos nem os calibradores.**

Colheita, processamento e conservação de espécimes

Espécimes – Material clínico recolhido do paciente e colocado num sistema de transporte adequado. Para o Panther Fusion BKV Quant Assay isto inclui espécimes de urina colhidos num recipiente primário, os espécimes de plasma em tubos com anticoagulantes EDTA ou tubos de preparação de plasma (PPTs).

Amostras – Representa um termo mais genérico para descrever qualquer material a ser testado no Panther Fusion System, incluindo espécimes, espécimes processados transferidos para um tubo de transporte de espécimes de urina, calibradores e controlos.

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

Nota: *Tome cuidado para evitar a contaminação cruzada durante as etapas de manuseamento de espécimes. 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.*

A. Colheita de espécimes

1. Para preparar plasma, podem ser utilizados espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou plástico:
 - Tubos com anticoagulantes EDTA
 - Tubos de preparação de plasma (PPTs)
2. Os espécimes de urina devem ser colhidos num copo.
 - a. Após a colheita, os espécimes de urina do recipiente de colheita primário devem ser transferidos no prazo de uma hora a 30 °C para o tubo de transporte de espécimes de urina Aptima.
 - b. Antes de os espécimes de urina poderem ser testados, a urina no copo primário deve ser bem misturada por inversão antes da transferência para o tubo de transporte de espécimes de urina Aptima com meio de transporte de urina.

B. Processamento de espécimes

1. Processamento de espécimes de 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. O plasma pode ser preparado a partir de tubos com EDTA ou tubos primários PPT. Separe o plasma dos glóbulos vermelhos aglomerados seguindo as instruções do fabricante do tubo utilizado. O plasma pode ser testado no sistema Panther Fusion, num tubo primário, ou transferido para um tubo secundário, como, por exemplo, um tubo de alíquotas de espécime Aptima (SAT).

Para assegurar um volume da amostra adequado, consulte a tabela seguinte:

Tabela 1: Volume mínimo de amostra

Tubo (tamanho e tipo)	Volume mínimo para 1 réplica
Tubo de alíquotas de amostra Aptima (SAT)	0,6 ml
12x75 mm	0,9 ml
13x100 mm	0,9 ml
13x100 mm com gel	0,7 ml
16x100 mm com gel	1,1 ml

Se não for testado imediatamente, o plasma pode ser conservado de acordo com as *Condições de conservação de espécimes*.

Se for transferido para um tubo secundário, o plasma pode ser congelado a -20 °C ou -70 °C.

Não congele espécimes de plasma em tubos de colheita primários EDTA.

2. Processamento de espécimes de urina:

- a. Transfira 2000 µL de urina no prazo de uma hora a 30 °C para um tubo de transporte de espécimes de urina Aptima antes de serem testados no sistema Panther Fusion (consulte *Manuseamento de espécimes de urina* para obter informações sobre o manuseamento de espécimes).
- b. Volte a tapar e misture suavemente a amostra durante pelo menos 5 segundos.

C. Condições de conservação de espécimes

Os espécimes podem ser conservados numa das seguintes condições:

1. Estabilidade do plasma

- Os espécimes não processados são estáveis durante 24 horas de 2 °C a 30 °C após a centrifugação.
- Os espécimes não processados são estáveis durante 5 dias de 2 °C a 8 °C após a centrifugação.
- Os espécimes não processados e processados são estáveis durante 60 dias a -20 °C ou -70 °C após centrifugação.
- Os espécimes congelados também são estáveis até ao limite de três ciclos de congelação/descongelação.

2. Estabilidade de espécimes de urina

- Os espécimes não processados são estáveis durante 6 horas de 2 °C a 8 °C.
- Os espécimes processados são estáveis durante 24 horas de 2 °C a 30 °C.
- Os espécimes processados são estáveis durante 5 dias de 2 °C a 8 °C.
- Os espécimes processados são estáveis durante 60 dias a -20 °C ou -70 °C.
- Os espécimes congelados também são estáveis até ao limite de três ciclos de congelação/descongelação.

Amostras dentro do Panther Fusion System

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

Transporte de espécimes

Mantenha as condições de conservação de espécimes durante o transporte, conforme descrito em *Colheita, processamento e conservação de espécimes*.

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

Panther Fusion System

O Panther Fusion System é um sistema de testes de ácidos nucleicos integrado, com todos os passos completamente automatizados para a realização de ensaios Panther Fusion, desde o processamento de amostras até à amplificação, detecção e redução de dados.

Reagentes e materiais fornecidos

Embalagem do ensaio

Componentes	Referência	Conservação
Calibradores do Panther Fusion BKV Quant Assay		
PCAL 1 qBKV, 3 por caixa	PRD-07234	-15 °C a -35 °C
PCAL 2 qBKV, 3 por caixa		
PCAL 3 qBKV, 3 por caixa		
PCAL 4 qBKV, 3 por caixa		
PCAL 5 qBKV, 3 por caixa		
Controlos do Panther Fusion EBV–BKV Quant Assay		
HPC, Tubo de controlo positivo alto, 5 por caixa	PRD-07158	-15 °C a -35 °C
LPC, Tubo de controlo positivo baixo, 5 por caixa		
NC III, Tubo de controlo negativo de transplante, 5 por caixa		
Cartucho do Panther Fusion BKV Quant Assay 96 testes		
Cartucho do Panther Fusion qBKV Assay, 12 testes, 8 por caixa	PRD-07232	2 °C a 8 °C
Controlo interno B Panther Fusion 960 testes		
Tubo de controlo interno B Panther Fusion, 4 por caixa	PRD-06234	2 °C a 8 °C
Reagente de extração B Panther Fusion 960 testes		
Frasco de reagente de captura B Panther Fusion, 240 testes, 4 por caixa	PRD-06232	15 °C a 30 °C
Frasco de reagente estimulador B Panther Fusion, 240 testes, 4 por caixa		
Tampão de eluição Panther Fusion, 2400 testes		
Embalagem do tampão de eluição Panther Fusion, 1200 testes, 2 por caixa	PRD-04334	15 °C a 30 °C
Tampão de reconstituição I Panther Fusion, 1920 testes		
Tampão de reconstituição I Panther Fusion, 960 testes, 2 por caixa	PRD-04333	15 °C a 30 °C
Reagente de óleo Panther Fusion, 1920 testes		
Reagente de óleo Panther Fusion, 960 testes, 2 por caixa	PRD-04335	15 °C a 30 °C

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	Código produto
Panther™ System	303095
Módulo Panther Fusion™	PRD-04173
Panther Fusion™ System	PRD-04172
Panther™ System, fluido contínuo e resíduos (Panther Plus)	PRD-06067
Kit de fluidos Aptima™ Assay (Solução de lavagem Aptima™, tampão para o fluido de desativação Aptima™ e reagente de óleo Aptima™)	303014 (1000 testes)
Unidades multitubos (MTUs)	104772-02
Kit de sacos de resíduos Panther™	902731
Tampa do recipiente de resíduos Panther™	504405
Ou o Kit de execução do Panther™ System contém MTUs, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, fluidos de ensaio e reagentes Auto Detect*	303096 (5.000 testes)
Pontas, 1000 µl, com filtro, detecção de líquido, condutoras e descartáveis: <i>Nem todos os produtos estão disponíveis em todas as regiões. Contacte o seu representante para obter informações específicas da região.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Tabuleiros de tubos Panther Fusion™, 1008 testes, 18 por caixa	PRD-04000
Aptima™ Urine Specimen Transport Tubes <i>apenas para o processamento de espécimes de urina</i>	105575 (100 tubos pré-cheios por embalagem)
Tampas rígidas de substituição Hologic (tampa de tubo de utilização única)	PRD-06720 (100 tampas por embalagem)
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 8,25% (0,7 M a 1,16 M)	—
Luvas descartáveis e isentas de pó	—
Coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico	—
Toalhetes que não larguem pelos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubos de colheita primários (EDTA e PPT): 13 mm x 100 mm 12 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	—
Centrífuga	—
Misturador vórtex	—

*Somente necessário para ensaios Panther Aptima TMA.

Materiais opcionais

Material	Código produto
Opções de tubo secundário:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Tubos de alíquotas de espécime Aptima™ (SATs) (100 por embalagem)	FAB-18184
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) <i>tampa para SAT</i>	504415
Diluyente de espécimes Aptima™	PRD-03003
Kit de diluyente de espécimes Aptima™ <i>contém diluyente de espécimes Aptima, 100 SATs e 100 tampas</i>	PRD-03478
Pipetas de transferência	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—

Procedimento de teste no Panther Fusion System

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

A. Preparação da área de trabalho

1. 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). Permita que a solução de hipoclorito de sódio entre em contacto com as superfícies por pelo menos 1 minuto e depois lave com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada com capas limpas, absorventes, com forro de plástico, indicadas para bancadas de laboratórios.
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 dos calibradores e dos controlos

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

1. Remova os calibradores 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 os calibradores e os controlos. A espuma compromete o sensor de nível do Panther Fusion System.

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

C. Preparação de reagentes

1. Retire os frascos de IC-B, FCR-B e FER-B do meio de conservação.
2. Misture FCR-B até que as esferas estejam totalmente suspensas. Evite formar espuma durante este passo.
3. Abra os frascos de IC-B, FCR-B e FER-B e elimine as tampas. Abra a porta de TCR na zona superior do Panther Fusion System.
4. Coloque os frascos de IC-B, FCR-B e FER-B nas posições apropriadas no carrossel TCR.
5. Feche a porta de TCR.

Nota: O Panther Fusion System adiciona o IC-B ao FCR-B. Depois de adicionar o IC-B ao FCR-B, este passa a ser referido como wFCR-B (FCR-B de trabalho). Se o wFCR-B e o FER-B foram retirados do sistema, use novas tampas e conserve imediatamente de acordo com as condições de conservação adequadas.

D. Manuseamento de espécimes

Nota: Prepare os espécimes de acordo com as instruções da secção *Colheita, processamento e conservação de espécimes antes de carregar espécimes no Panther Fusion System*.

Inspeccione os tubos de amostras antes de colocá-los no suporte. Se um tubo de amostra contiver bolhas ou um volume inferior ao que é normalmente observado, toque suavemente no fundo do tubo para deslocar o conteúdo para o fundo.

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, processamento e conservação de espécimes*.
2. Assegure-se de que os espécimes congelados estejam totalmente descongelados. Coloque no vórtex os espécimes descongelados durante 3 a 5 segundos para misturar totalmente.
3. Deixe os espécimes atingir uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento. Consulte *Amostras dentro do Panther Fusion System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.
4. Certifique-se de que cada tubo primário ou secundário contém espécime adequado. Consulte a Tabela 1 para obter o volume mínimo de amostra para 1 réplica.
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 o passo G.2 abaixo para obter informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

F. Manuseamento de espécimes de urina

1. Certifique-se de que os espécimes em tubos primários ou os espécimes processados em tubos de transporte de espécimes de urina Aptima são conservados corretamente de acordo com *Colheita, processamento e conservação de espécimes*.

2. Certifique-se de que os espécimes congelados em tubos de transporte de espécimes de urina Aptima estão totalmente descongelados.
3. Permita que os espécimes alcancem uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes de proceder à realização dos testes no Panther Fusion System. Consulte *Amostras dentro do Panther Fusion System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.

Nota: Evite carregar no Panther Fusion System espécimes que contenham precipitados.

4. Inverta suavemente os tubos de transporte de espécimes de urina Aptima pelo menos 3 vezes, ou misture suavemente num oscilador, até que a urina fique homogênea.

Nota: Evite criar espuma excessiva quando inverter ou misturar os tubos. A espuma pode comprometer o sensor de nível do Panther Fusion System.

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

G. Preparação do sistema

1. Para obter instruções sobre como configurar o Panther Fusion System, incluindo sobre como carregar amostras, reagentes, cartuchos de ensaio e fluidos universais, consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* e as *Notas sobre o procedimento*.
2. Carregue as amostras no respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibradores 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 o sensor de nível do Panther Fusion 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 urina

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System*.
2. Carregue o suporte de espécimes.

3. Aplique o Fator de conversão de urina aos pedidos de teste de ensaio para os espécimes de urina.

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

Para aplicar o Fator de conversão de urina 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 1).

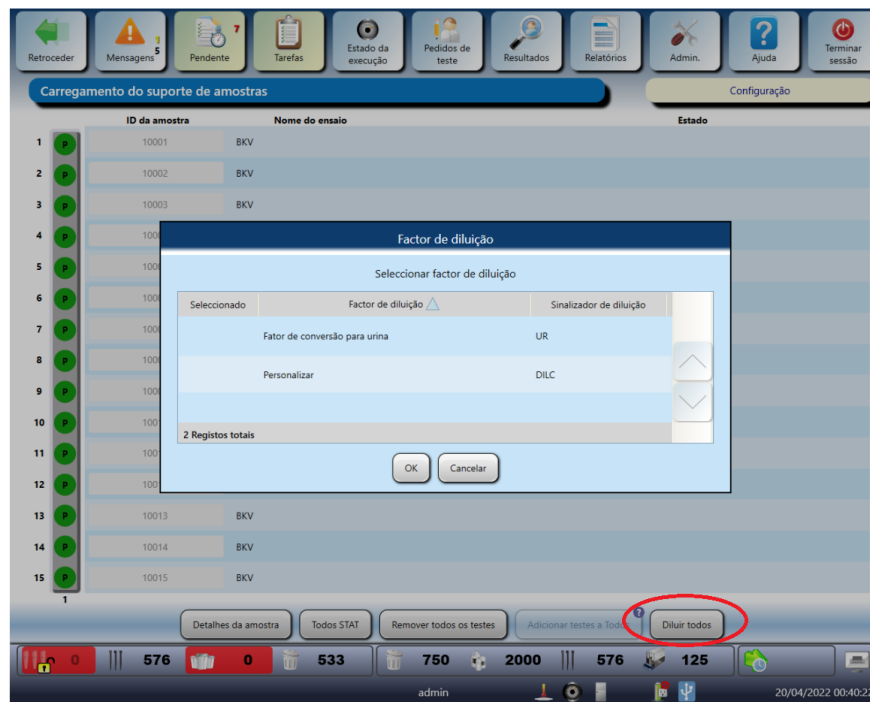


Figura 1. A janela *Dilution Factor* (Fator de diluição) no ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras) (Exemplo)

- c. Selecione **Urine Conversion Factor (Fator de conversão de urina)**.
- 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 urina a todo o suporte de espécimes de urina.

Para aplicar o Fator de conversão de urina a um único pedido de teste (Figura 2):

- 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)**.

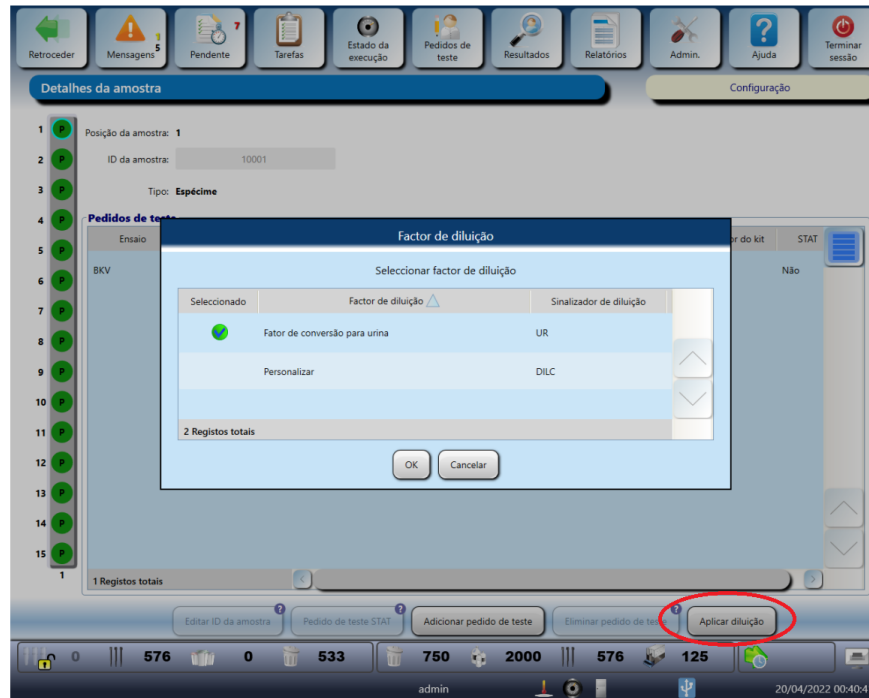


Figura 2. A janela Dilution Factor (Fator de diluição) no ecrã Sample Details (Detalhes da amostra) (Exemplo)

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

Para eliminar o Fator de conversão de urina de todo um suporte:

- 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)**.
- c. Na janela *Dilution Factor* (Fator de diluição), desmarque **Urine Conversion Factor (Fator de conversão de urina)**.
- d. Selecione **OK**.

Aparece uma janela *Set Dilution Factor for Rack* (Definir fator de diluição para suporte).

- e. Selecione **Yes (Sim)** para eliminar o Fator de conversão de urina de todo um suporte.

Para eliminar os pedidos de teste de ensaio do Fator de conversão de urina:

- 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)**.
- e. Na janela *Dilution Factor* (Fator de diluição), desmarque **Urine Conversion Factor (Fator de conversão de urina)**.
- f. Selecione **OK** para eliminar o Fator de conversão de urina do pedido de teste.

Notas sobre o procedimento

A. Calibradores e controlos

1. Os calibradores qBKV (5 tubos), o controlo positivo baixo (LPC) EBV–BKV, o controlo positivo alto (HPC) EBV–BKV e o controlo negativo de transplante (NC III) podem ser carregados em qualquer posição no suporte de amostras e em qualquer corredor da zona de amostras, no Panther Fusion System. A pipetagem de calibrador e de controlo começa quando os espécimes de BKV tiverem sido carregados no sistema. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
 - a. Os calibradores e os controlos estão atualmente a ser processados pelo sistema.
 - b. São registados no sistema resultados válidos para os calibradores e os controlos.
2. Depois de os tubos de calibrador e controlo terem sido pipetados e de serem processados para o Panther Fusion BKV Quant Assay, os espécimes podem ser testados. Os resultados da calibração são válidos durante 60 dias e os resultados do controlo são válidos até 30 dias (frequência configurada por um administrador) **a menos que**:
 - a. Os resultados do calibrador sejam inválidos.
 - b. Os resultados do controlo sejam inválidos.
 - c. O operador peça que sejam executados novos controlos/calibradores no software do Panther Fusion System.
3. É necessária a calibração de cada novo lote de cartuchos de ensaio que seja carregado no Panther Fusion System antes de ser utilizado para o processamento de espécimes.
4. Cada calibrador e cada tubo de controlo só podem ser usados uma única vez.

Controlo de qualidade

Calibração do ensaio

Para gerar resultados válidos, é necessário concluir uma calibração do ensaio. Os cinco calibradores positivos são executados em triplicado sempre que é carregado um novo lote de cartuchos de ensaio no Panther Fusion System. Depois de estabelecida, a calibração do ensaio é válida durante um máximo de 60 dias. O software do Panther Fusion System alerta o operador quando uma calibração for necessária.

Durante o processamento, o software do Panther Fusion verifica automaticamente a validade da curva de calibração. Se a calibração falhar as verificações de validade, o Panther Fusion System irá automaticamente invalidar quaisquer amostras afetadas, e irá necessitar que seja executado um novo conjunto de calibradores do ensaio antes da pipetagem de quaisquer amostras adicionais.

Por predefinição, o ensaio irá processar amostras como plasma não diluído. Para processar amostras de urina, deve ser selecionada a diluição com o Fator de conversão de urina na interface do utilizador do instrumento.

Controlos negativo e positivo

Para gerar resultados válidos, deve ser testado um conjunto de controlos de ensaio. Deve ser testada uma réplica do NC III (controlo negativo de transplante), do LPC (controlo positivo baixo) e do HPC (controlo positivo alto) sempre que é carregado um novo lote de cartuchos de ensaio no Panther Fusion System ou quando o conjunto atual de controlos válidos para um lote de cartuchos ativos perde a validade.

O Panther Fusion System está configurado para necessitar que os controlos de ensaio sejam executados num intervalo (especificado pelo administrador) de até 30 dias. O software do Panther Fusion System alerta o operador quando os controlos de ensaio são necessários e não começa novos testes até os controlos de ensaio terem sido carregados e o processamento ter sido inicializado.

Durante o processamento, os critérios de aceitação dos controlos de ensaio são automaticamente verificados pelo Panther Fusion System. Para gerar resultados válidos, os controlos de ensaio devem passar por uma série de verificações de validade no Panther Fusion System.

Se os controlos de ensaio passarem todas as verificações de validade, estes serão considerados como válidos para o intervalo de tempo especificado pelo administrador. Quando o intervalo de tempo passar, os controlos de ensaio são expirados pelo Panther Fusion System, e será necessário um novo conjunto de controlos de ensaio antes da pipetagem de quaisquer novas amostras.

Se algum dos controlos de ensaio falhar as verificações de validade, o Panther Fusion System irá automaticamente invalidar as amostras afetadas, e será necessário um novo conjunto de controlos de ensaio antes da pipetagem de quaisquer novas amostras.

Controlo interno

Um controlo interno é adicionado a cada amostra durante o processo de extração. Durante o processamento, os critérios de aceitação do controlo interno são automaticamente verificados pelo software do Panther Fusion System. A deteção do controlo interno não é necessária para as amostras que são positivas para BKV. O controlo interno deve ser detetado em todas as amostras que são negativas para BKV; as amostras que não cumprem este critério são comunicadas como inválidas. Cada amostra com um resultado inválido deve ser analisada novamente.

O software do Panther Fusion 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 de resultados

O Panther Fusion System determina automaticamente a concentração de DNA do BKV para espécimes e controlos mediante a comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de DNA do BKV são apresentadas em UI/ml e \log_{10} UI/ml. A interpretação de resultados é fornecida na Tabela 2 e na Tabela 3.

Tabela 2: Interpretação de resultados do plasma

Resultados do BKV Quant Assay apresentados		
UI/ml	Valor \log_{10}	Interpretação
Não detetado	Não detetado	DNA do BKV não detetado.
< 79 detetado	< 1,90	O DNA do BKV é detetado, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLoQ).
79 a 1,0E09	1,90 a 9,00	A concentração de DNA do BKV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLoQ e o ULoQ UI/ml.
> 1,0E09	> 9,00	A concentração de DNA do BKV 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.

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

Tabela 3: Interpretação de resultados da urina

Resultados do BKV Quant Assay apresentados		
UI/ml	Valor \log_{10}	Interpretação
Não detetado	Não detetado	DNA do BKV não detetado.
< 162 detetado	< 2,21	O DNA do BKV é detetado, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLoQ).
162 a 2,0E09	2,21 a 9,30	A concentração de DNA do BKV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLoQ e o ULoQ UI/ml.
> 2,0E09	> 9,30	A concentração de DNA do BKV 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.

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

Limitações

- A. A utilização deste ensaio está limitada ao pessoal que tem a formação profissional neste procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto informativo pode produzir resultados erróneos.
- B. A fiabilidade dos resultados depende da colheita, do transporte, da conservação e do processamento adequados dos espécimes.
- C. A contaminação só pode ser evitada através da adesão às boas práticas laboratoriais e aos procedimentos especificados neste folheto informativo.
- D. Apesar de ser raro, poderão ocorrer mutações em regiões altamente conservadas do genoma viral abrangido pelos "primers" e/ou sondas do Panther Fusion BKV Quant Assay que poderão resultar na subquantificação ou na falha de deteção do vírus.
- E. Os resultados negativos não excluem a presença de infeções por BKV e não devem ser usados como o único fator para o tratamento ou para a tomada de outras decisões de gestão.
- F. Um resultado positivo indica a deteção de ácido nucleico do vírus em causa. O ácido nucleico pode persistir mesmo depois de o vírus deixar de ser viável.

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 BKV que é detetada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.⁷

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 14/212) para BKV diluído em plasma humano BKV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 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 Panther Fusion BKV Quant Assay utilizando o 1.º padrão internacional da OMS é 43,1 UI/ml para o plasma.

Tabela 4: Limite de detecção para o plasma utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)
10%	1,6
20%	2,1
30%	2,7
40%	3,5
50%	4,5
60%	6,1
70%	8,6
80%	13,3
90%	25,3
95%	43,1

Limite de detecção utilizando os padrões da OMS na urina

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS para BKV diluído em urina humana BKV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 5 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Panther Fusion BKV Quant Assay utilizando o 1.º padrão internacional da OMS é 143,6 UI/ml para a urina.

Tabela 5: Limite de detecção para a urina utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)
10%	3,7
20%	6,0
30%	9,1
40%	13,0
50%	18,5
60%	26,2
70%	38,1
80%	58,1
90%	99,5
95%	143,6

Intervalo linear

Intervalo linear no plasma

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do BKV diluído em plasma humano BKV-, de acordo com a norma CLSI EP06-A.⁸ A concentração dos painéis variou entre 1,80 log UI/ml e 9,08 log UI/ml. O Panther Fusion BKV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 9,00 log UI/ml conforme mostrado na Figura 3.

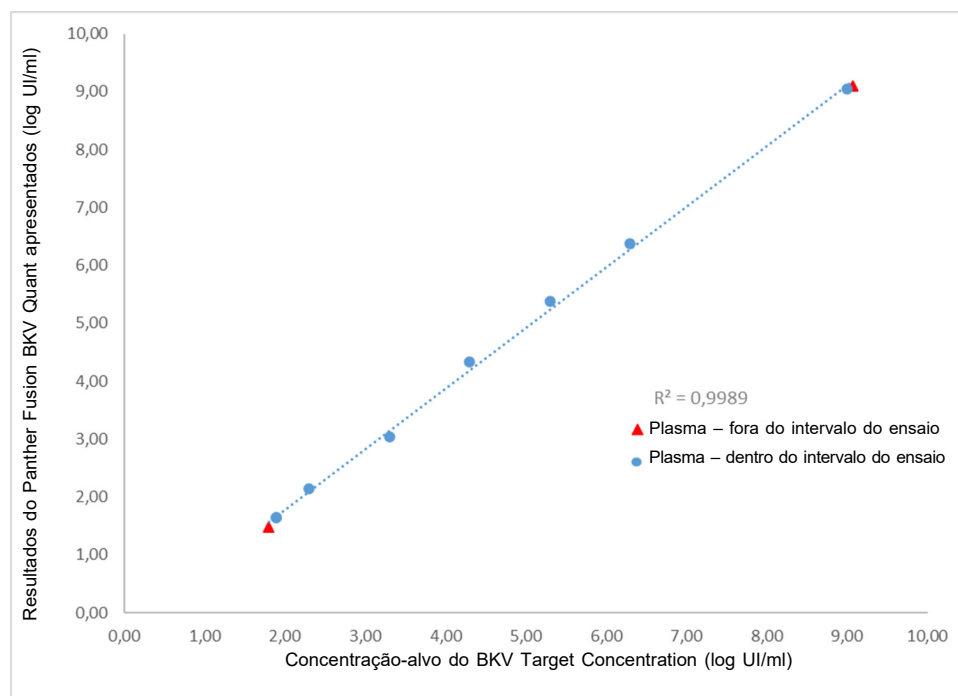


Figura 3. Linearidade no plasma

Intervalo linear na urina

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do BKV diluído em urina humana BKV-, de acordo com a norma CLSI EP06-A.⁸ A concentração dos painéis variou entre 2,11 log UI/ml e 9,38 log UI/ml. O Panther Fusion BKV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 9,30 log UI/ml conforme mostrado na Figura 4.

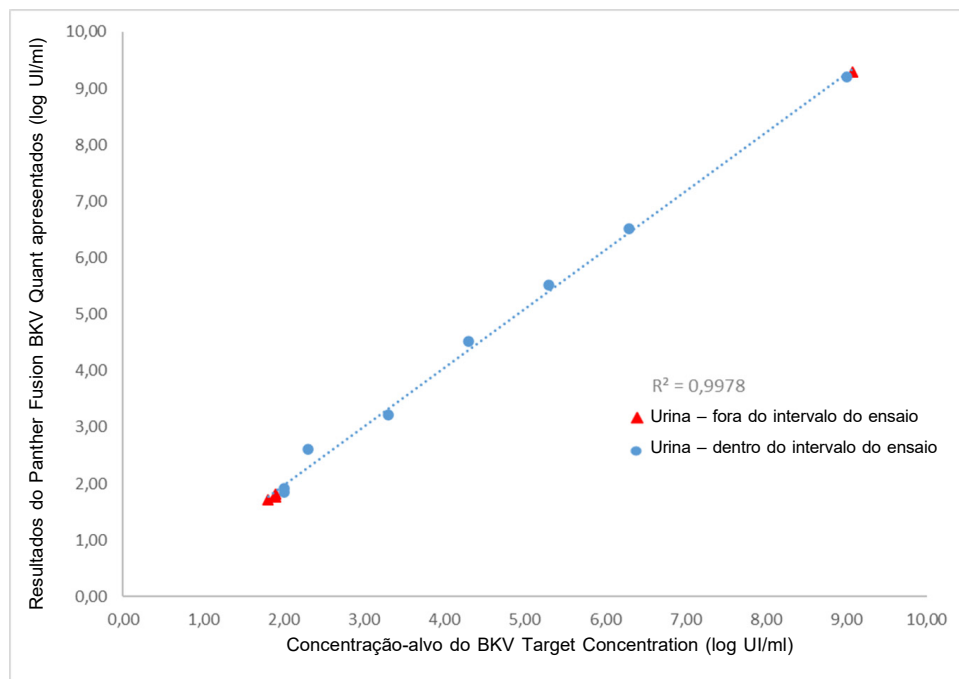


Figura 4. Linearidade na urina

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 BKV é quantificado com fiabilidade, de acordo com a norma CLSI EP17-A2.⁷ O erro total foi calculado utilizando o modelo de Westgard: Erro Total (ET) = |desvio sistemático| + 2 DP. Para garantir a exatidão e a precisão das medições, o Erro Total do Panther Fusion BKV Quant Assay foi definido para 1,2 log UI/ml, com um desvio sistemático em relação ao real e um DP que tem de ser $\leq 0,5$ log UI/ml e $\leq 0,35$ log UI/ml, respetivamente.

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 14/212) para BKV diluído em plasma humano BKV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Os resultados do LLoQ para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 6. O LLoQ gerado com o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV no plasma é 79 UI/ml (1,90 log UI/ml).

Tabela 6: Determinação do LLoQ utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV diluído em plasma

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	BKV Quant Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)	ET calculado (log UI/ml)
1	20	20	1,90	1,95	0,19	0,2	0,5
	20	20	2,06	2,09	0,14	0,1	0,4
	20	20	2,18	2,26	0,12	0,1	0,4
	20	20	2,26	2,35	0,15	0,2	0,5
2	20	20	1,90	1,96	0,14	0,1	0,4
	20	20	2,06	2,13	0,16	0,2	0,5
	20	20	2,18	2,24	0,16	0,1	0,4
	20	20	2,26	2,35	0,14	0,1	0,4
3	20	20	1,90	1,98	0,20	0,2	0,6
	20	20	2,06	2,06	0,15	0,1	0,4
	20	20	2,18	2,27	0,09	0,1	0,3
	20	20	2,26	2,35	0,11	0,1	0,4

DP=desvio padrão $\leq 0,35$ (log UI/ml).

|Desvio sistemático|=desvio em relação ao real $\leq 0,5$ (log UI/ml).

A diluição correspondente à concentração do LLoQ e testada em cada lote de reagente está destacada a cinzento.

Limite inferior de quantificação utilizando o padrão da OMS na urina

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC 14/212) para BKV diluído em urina humana BKV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Os resultados do LLoQ para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 7. O LLoQ gerado com o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV na urina é 162 UI/ml (2,21 log UI/ml).

Tabela 7: Determinação do LLoQ utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o BKV diluído em urina

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	BKV Quant	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)	ET calculado (log UI/ml)
				Assay (log UI/ml)			
1	20	20	2,21	2,09	0,24	0,2	0,7
	20	20	2,26	2,15	0,20	0,2	0,5
	20	20	2,30	2,15	0,23	0,2	0,7
	20	20	2,38	2,27	0,20	0,2	0,6
2	20	20	2,21	1,98	0,22	0,2	0,7
	20	20	2,26	2,14	0,27	0,2	0,7
	20	20	2,30	2,23	0,20	0,2	0,6
	20	20	2,38	2,27	0,25	0,2	0,7
3	20	20	2,21	1,97	0,24	0,3	0,7
	20	20	2,26	2,03	0,22	0,3	0,7
	20	20	2,30	2,08	0,18	0,2	0,6
	20	20	2,38	2,13	0,23	0,3	0,7

DP=desvio padrão $\leq 0,35$ (log UI/ml).

|Desvio sistemático|=desvio em relação ao real $\leq 0,5$ (log UI/ml).

A diluição correspondente à concentração do LLoQ e testada em cada lote de reagente está destacada a cinzento.

Confirmação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do BKV

Limite inferior de quantificação em vários genótipos no plasma

O LLoQ estabelecido utilizando o padrão da OMS foi avaliado testando os genótipos do BKV I (1b-2) e IV enriquecidos a 3X o LLoQ em plasma humano BKV-. Foram testadas três réplicas de cada membro do painel com um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Confirmação do LLoQ em vários genótipos no plasma

Isolado (genótipo)	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	BKV Quant	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)
				Assay (log UI/ml)		
Genótipo I (1b-2)	3	3	2,37	2,59	0,08	0,2
Genótipo IV	3	3	2,37	2,25	0,05	0,1

DP=desvio padrão.

Limite inferior de quantificação em vários genótipos na urina

O LLoQ estabelecido utilizando o padrão da OMS foi avaliado testando os genótipos do BKV I (1b-2) e IV enriquecidos em urina humana BKV-. Foram testadas três réplicas de cada membro do painel com um lote de reagente. Os resultados são apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Confirmação do LLoQ em vários genótipos na urina

Isolado (genótipo)	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	BKV Quant Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)
Genótipo I (1b-2)	3	3	2,69	2,43	0,27	0,0
Genótipo IV	3	3	2,69	2,57	0,16	0,2

DP=desvio padrão.

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 1.º padrão da OMS para o BKV foi diluído e testado juntamente com os padrões secundários, bem como controlos do ensaio e calibradores utilizados no Panther Fusion BKV Quant Assay para avaliar a rastreabilidade de acordo com a norma CLSI EP32-R.º A concentração dos padrões secundários variou entre 2,30 e 6,30 log₁₀ UI/ml.

Rastreabilidade ao padrão da OMS utilizando plasma

As concentrações testadas para o 1.º padrão da OMS para o BKV variaram entre 2,07 e 4,70 log 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 5.

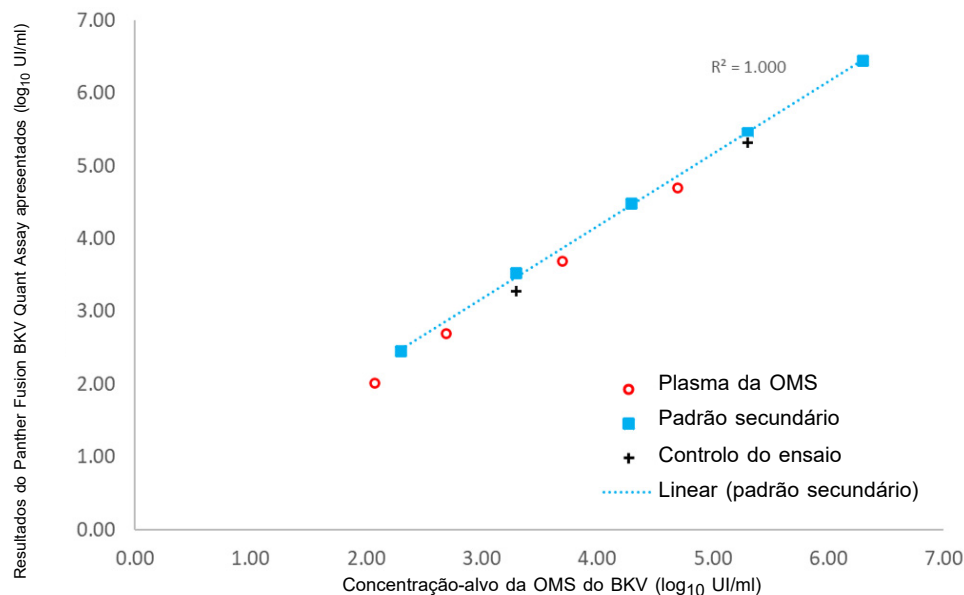


Figura 5. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º padrão da OMS para o BKV e as concentrações apresentadas no Panther Fusion BKV Quant Assay (padrão da OMS diluído em plasma)

Rastreabilidade ao padrão da OMS utilizando urina

As concentrações testadas para o 1.º padrão da OMS para o BKV variaram entre 2,38 e 5,00 log₁₀ UI/ml. Os painéis de urina da OMS, os padrões secundários, os controles do ensaio e os calibradores do ensaio recuperaram conforme esperado, em todo o intervalo linear do ensaio, como se pode observar na Figura 6.

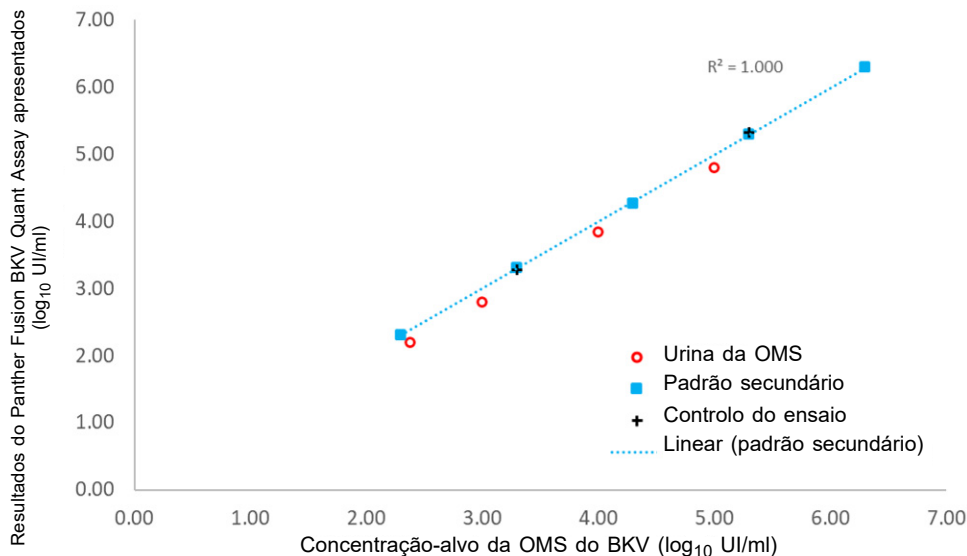


Figura 6. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º padrão da OMS para o BKV e as concentrações apresentadas no Panther Fusion BKV Quant Assay (padrão da OMS diluído em urina)

Precisão no laboratório

Urina

Para avaliar a precisão no laboratório, foram elaborados um painel negativo e um painel 3 membros diluindo DNA do BKV em urina BKV-. Os painéis positivos e negativos foram testados por 2 operadores utilizando 3 lotes de reagentes em 3 Panther Fusion Systems ao longo de 6 dias de testes não consecutivos. Cada operador realizou 2 execuções por dia e cada membro do painel foi testado em triplicado em cada execução. O estudo foi desenhado e analisado seguindo as recomendações da norma CLSI EP-05-A3.¹⁰

A Tabela 10 mostra a reprodutibilidade dos resultados do ensaio (em log UI/ml) para o painel positivo entre instrumentos, operadores, lotes de cartuchos, execuções, dias, dentro das execuções e globais. A variabilidade total ficou a dever-se principalmente à variabilidade dentro das execuções (por exemplo, erro aleatório). Todas as réplicas do painel negativo foram negativas.

Tabela 10: Reprodutibilidade do Panther Fusion BKV Quant Assay na urina

N	Concentração média (log UI/ml)	Entre lotes	Entre instrumentos	Entre operadores	Entre dias	Entre execuções	Intra-execução	Total
		DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
54	2,59	0,06	0,08	0,02	0,08	0,14	0,13	0,16
54	3,55	0,08	0,04	0,01	0,02	0,05	0,25	0,10
54	4,58	0,07	0,01	0,01	0,01	0,06	0,28	0,07

DP=desvio padrão.

Substâncias potencialmente interferentes

A suscetibilidade do Panther Fusion BKV Quant Assay a interferência por níveis elevados de substâncias endógenas, anticoagulantes e fármacos geralmente prescritos a pacientes transplantados foi avaliada em matrizes BKV- na presença ou ausência de 2,37 log UI/ml e 2,69 log UI/ml de BKV em plasma e urina, respectivamente. 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 EP07¹¹ e EP37.¹²

Não foi observada qualquer interferência na exatidão da quantificação em amostras de plasma ou urina na presença das substâncias potencialmente interferentes indicadas na Tabela 11 e na Tabela 12.

Tabela 11: Substâncias endógenas no plasma

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Albumina	3	6000 mg/dl
Bilirrubina conjugada	3	40 mg/dl
Hemoglobina	3	10 mg/dl
DNA genômico humano	3	0,2 mg/dl
Triglicéridos	3	3,45 mg/dl
Bilirrubina não conjugada	3	40 mg/dl

Tabela 12: Substâncias endógenas na urina

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Albumina	3	6000 mg/dl
Bilirrubina conjugada	3	40 mg/dl
Estradiol	3	8E-05 mg/dl
Glicose	3	200 mg/dl
Mucina	3	6 mg/dl
Células mononucleares de sangue periférico	3	1E+06 células/ml
pH, ácido (HCl)	3	2 mM
pH, alcalino (NaOH)	3	0,2 mM
Sémen	3	5%
Sangue total	3	2%

Não foi observada qualquer interferência na exatidão da quantificação na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 13 e na Tabela 14.

Tabela 13: Substâncias exógenas para plasma

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Aciclovir	3	6,6 mg/dl
Azatioprina	3	0,258 mg/dl
Cefotetano	3	71,1 mg/dl
Cidofovir	3	12,4 mg/dl
Clavulanato de potássio	3	1,47 mg/ml
Ciclosporina	3	0,180 mg/dl
Everolimus	3	0,0183 mg/dl
Fluconazol	3	2,55 mg/dl
Foscarnet	3	108 mg/dl
Ganciclovir	3	3,96 mg/dl
Letermovir	3	3,9 mg/dl
Micafungina	3	6,6 mg/dl
Micofenolato de mofetil	3	18,1 mg/dl
Composto B relacionado com micofenolato de mofetil	3	18,1 mg/dl
Naproxeno	3	36 mg/dl
Piperacilina	3	110 mg/dl
Prednisona	3	0,0099 mg/dl
Sirólimus	3	0,0213 mg/dl
Sulfametoxazol	3	35,7 mg/dl
Tacrolimus	3	0,0144 mg/dl
Tazobactam sódico	3	10,2 mg/dl
Ticarcilina dissódica	3	151 mg/dl
Trimetoprim	3	4,2 mg/dl
Valganciclovir	3	4,83 mg/dl
Vancomicina	3	12 mg/dl

Tabela 14: Substâncias exógenas para urina

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Acetaminofeno	3	3 mg/dl
Ácido acetilsalicílico	3	3 mg/dl
Clotrimazol	3	0,5 mg/dl
Ibuprofeno	3	21,9 mg/dl
Metronidazol	3	12,3 mg/dl
Naproxeno	3	36 mg/dl
Cloridrato de fenazopiridina	3	79,5 mg/dl
Propilenoglicol	3	130 mg/dl
Talco	3	5 mg/dl

Especificidade analítica

A potencial reatividade cruzada com os agentes patogênicos indicados na Tabela 15 foi avaliada em matrizes BKV- na presença ou ausência de 2,37 log UI/ml e 2,69 log UI/ml de EBV em plasma e urina, respectivamente. Os agentes patogênicos foram testados à concentração mais alta disponível. Não foi observada qualquer reatividade cruzada ou interferência na exatidão da quantificação.

Tabela 15: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração	Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração
ADV-5	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	Vírus do herpes humano 7	1,00E+03 TCID ₅₀ /ml
<i>Aspergillus niger</i>	1,00E+06 CFU/ml	Vírus do herpes humano 8	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+06 cp/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium avium</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CCU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,00E+06 IFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,00E+06 CFU/ml	Parvovírus humano B19	1,00E+05 UI/ml
CMV	1,00E+05 cp/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00E+06 CFU/ml
EBV	1,00E+05 cp/ml	<i>Salmonella enterica</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,00E+06 CFU/ml

Tabela 15: Agentes patogénicos testados para a especificidade analítica (continuação)

Micro-organismo/Agente patogénico	Concentração	Micro-organismo/Agente patogénico	Concentração
<i>Escherichia coli</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HBV	1,00E+05 UI/ml	<i>Streptococcus bovis</i>	1,00E+06 CFU/ml
HCV	1,00E+04 UI/ml	<i>Streptococcus oralis</i>	1,00E+06 CFU/ml
HIV-1	1,00E+05 UI/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HIV-2	1,00E+04 UI/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
HSV-1	1,00E+06 TCID ₅₀ /ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,00E+05 trofozoitos/ml
HSV-2	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1,00E+06 cp/ml
HPV-16 (infetado com células SiHa)	1,00E+05 células/ml	Vírus da varicela zóster	1,00E+05 cp/ml
Vírus do herpes humano 6	1,00E+05 cp/ml	—	—

CCU/ml=unidades modificadoras de colónias/ml
 CFU/ml=unidades formadoras de colónias por ml.
 cp/ml=cópias virais por ml.
 IFU/ml=unidades formadoras de inclusão por ml.
 UI/ml=unidades internacionais por ml.
 TCID₅₀/ml=unidades de dose infecciosa de cultura do tecido por ml.

Correlação de métodos

Este estudo foi desenhado de acordo com a norma CLSI EP09c.¹³

Correlação de métodos no plasma

O desempenho do Panther Fusion BKV Quant Assay foi avaliado em relação a um ensaio comparador testando espécimes colhidos retrospectivamente e espécimes artificiais abrangendo todo o intervalo linear. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 108 espécimes dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 7.

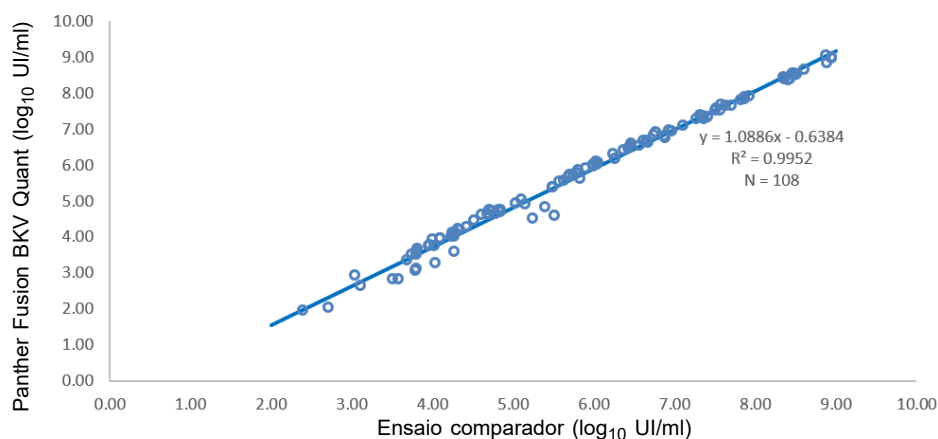


Figura 7. Correlação entre a carga viral de BKV no Panther Fusion BKV Quant Assay e o ensaio comparador nos testes de amostras de plasma

Correlação de métodos na urina

O desempenho do Panther Fusion BKV Quant Assay foi avaliado em relação a um ensaio comparador testando espécimes colhidos retrospectivamente e espécimes artificiais abrangendo todo o intervalo linear. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 153 espécimes dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 8.

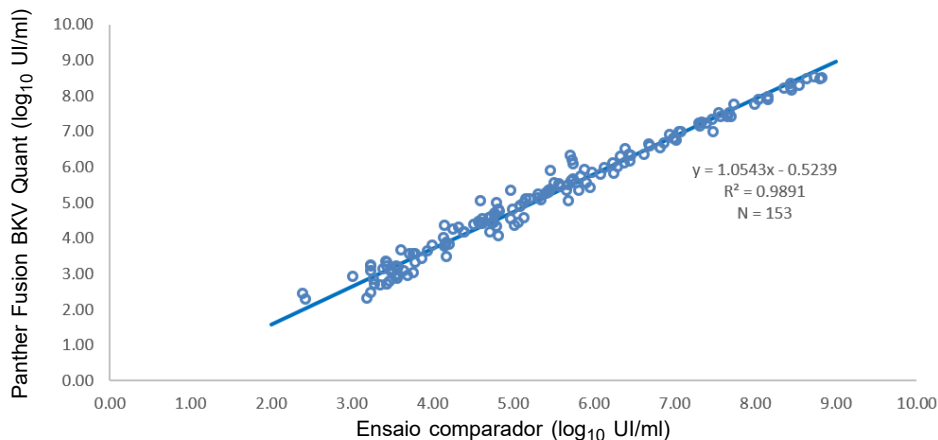


Figura 8. Correlação entre a carga viral de BKV no Panther Fusion BKV Quant Assay e o ensaio comparador nos testes de amostras de urina

Contaminação por transferência/cruzada

A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras em STM enriquecidas com BKV de título elevado (1,00E+09 UI/ml) dispersas entre amostras BKV- num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de 5 execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0,00% (0/150).

Bibliografia

1. Muhsin SA, Wojciechowski D. 2019. BK Virus In transplant recipients: current perspectives. *Transpl Res Risk Manag.* 11:47-58.
2. van Aalderen MC, Heutinck KM, Huisman C, et al. 2012. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. *Neth J Med.* May;70(4):172-183. PMID:264162
3. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. 2019. BK polyomavirus in solid organ transplantation– Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* Sep;33(9): e13528. doi:10.1111/ctr.13528. Epub 2019 Apr 10. PMID:30859620
4. Dalianis T, Ericksson BM, Felldin M, et al. 2019. Management of BK-virus infection–Swedish recommendations. *Infect Dis (Lond).* 51(7):479-484. doi:10.1080/23744235.2019.1595130
5. 1st WHO International Standard for BK Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 14/212, Version 3.0).
6. Clinical & Laboratory Standards Institute. Document M29. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Web site do CLSI <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29/> (4 de abril de 2022)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidelines – Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelines. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. 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.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

Informações de contacto



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



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

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

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

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

Quasar é uma marca comercial registada e licenciada pela Biosearch Technologies, Inc.

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

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

©2022-2023 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-26020-601 Rev. 002
2023-12