

## Aptima® CMV Quant Assay

Instruções de utilização  
Para fins de diagnóstico *in vitro*  
Apenas para exportação pelos EUA

<b>Informações gerais</b>	<b>2</b>
Utilização prevista	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	2
Advertências e precauções	3
Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes	8
Colheita e conservação de espécimes	9
Amostras dentro do Panther System	11
Transporte de espécimes	11
<b>Panther System</b>	<b>12</b>
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	23
<b>Controlo de qualidade</b>	<b>24</b>
Calibração do ensaio	24
Controlos negativo e positivo	24
Calibrador interno/controlo interno	24
<b>Interpretação dos resultados</b>	<b>26</b>
<b>Limitações</b>	<b>28</b>
<b>Desempenho analítico</b>	<b>29</b>
Limite de deteção utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS	29
Limite de deteção de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos	30
Intervalo linear	32
Linearidade em vários genótipos do CMV	34
Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS	36
Determinação do limite inferior de quantificação de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos	38
Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS	41
Precisão	43
Substâncias potencialmente interferentes	44
Especificidade	45
Especificidade analítica	46
Diluição de amostras de plasma utilizando o controlo negativo Aptima CMV (1:3)	47
Confirmação do LoD e do LLoQ utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS diluído em controlo negativo Aptima CMV	48
Correlação de métodos	49
Reprodutibilidade	51
<b>Desempenho clínico</b>	<b>53</b>
Concordância clínica	53
Comparação de métodos	59
Diferença emparelhada média	64
Desvio sistemático em níveis de carga viral seleccionados	65
Diferença total permitida (ATD)	66
<b>Bibliografia</b>	<b>71</b>
<b>Informações de contacto e histórico de revisões</b>	<b>72</b>

## 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 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.<sup>1,2</sup> 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.<sup>3</sup>

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.<sup>4</sup> 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.<sup>5,6,7,8</sup> Geralmente, valores de carga viral mais elevados estão correlacionados com um maior risco de doença por CMV.<sup>4,9</sup> 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 humano.<sup>21</sup>

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 deteção 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 deteção 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 sistema Panther.

## Resumo de segurança e desempenho

O Resumo de segurança e desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) está disponível na base de dados europeia de dispositivos médicos (Eudamed), onde está associado aos identificadores do dispositivo (UDI-DI básico). Para localizar o SSP do Aptima CMV Quant assay, consulte o Identificador único do dispositivo básico (BUDI): **54200455DIAGAPTCMVAP**.

## 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 controlos deste ensaio contêm plasma humano. O plasma é negativo para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpos anti-HCV, anticorpos

anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e 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.<sup>10,11,12</sup>

- 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 regionais.<sup>10,11,12,13</sup> 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 Alíquotas de Espécime Aptima (SAT).
  2. Identifique adequadamente cada SAT.
  3. Encha cada SAT com 1 mL de diluente de espécimes Aptima.
  4. Para colher amostras de superfície, humedeça ligeiramente uma zaragatoa com água desionizada sem nuclease.
  5. Colha a amostra da superfície relevante movimentando a zaragatoa verticalmente, de cima para baixo. Rode a zaragatoa cerca de meia volta enquanto colhe a amostra do local.
  6. Coloque imediatamente a amostra em zaragatoa dentro do tubo e rode suavemente a zaragatoa no diluente para extrair materiais potencialmente colhidos. 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<sup>10,11,12</sup> quando executar este ensaio. Devem estabelecer-se métodos de manuseamento e eliminação

adequados de acordo com os regulamentos locais.<sup>11</sup> 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 desaperçar 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. Em caso de um resultado inválido devido a erro ML2, não volte a testar o espécime de plasma não diluído. Consulte *Procedimento de teste no Panther System*, passo E.5, neste folheto informativo para obter informações sobre como diluir o espécime de plasma.

**Nota:** Para obter informações sobre o erro ML2, consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System apropriado para obter Instruções de limpeza por lavagem magnética*.

- P. Não utilize o kit de reagentes, o calibrador nem os controlos após o prazo de validade.
- Q. 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.
- R. Evite a contaminação microbiana ou com nucleases dos reagentes.
- S. 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.
- T. 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.
- U. 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.
- V. 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 as comunicações de perigo específicas da sua região, consulte as SDS específicas da região na Biblioteca de fichas de dados de segurança, no endereço [www.hologic.com](http://www.hologic.com). Para obter mais informações sobre os símbolos, consulte a legenda dos símbolos em <http://www.hologic.com/package-inserts>

<b>Informações sobre riscos para a UE</b>	
—	<p><b>Amplification Reagent</b>  <b><i>Magnesium Chloride 65 - 70%</i></b></p> <p>—</p> <p>H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.                      P273 - Evitar a libertação para o ambiente.                      P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
—	<p><b>Enzyme Reagent</b>  <b><i>Triton X-100 1 - 5%</i></b>  <b><i>HEPES 1 - 5%</i></b></p> <p>—</p> <p>H402 - Nocivo para os organismos aquáticos                      P273 - Evitar a libertação para o ambiente.                      P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
—	<p><b>Enzyme Reconstitution Solution</b>  <b><i>Glicerol 20 - 25%</i></b>  <b><i>Triton X-100 5 - 10%</i></b>  <b><i>HEPES 1 - 5%</i></b></p> <p>—</p> <p>H402 - Nocivo para os organismos aquáticos.                      P273 - Evitar a libertação para o ambiente.                      P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
—	<p><b>Promoter Reagent</b>  <b><i>Magnesium Chloride 55 - 60%</i></b></p> <p>—</p> <p>H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.                      P273 - Evitar a libertação para o ambiente.                      P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>
—	<p><b>Target Capture Reagent</b>  <b><i>HEPES 15-20%</i></b>  <b><i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 5-10%</i></b>  <b><i>Succinic Acid 1-5%</i></b>  <b><i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 1-5%</i></b></p> <p>—</p> <p>H402 - Nocivo para os organismos aquáticos.                      P273 - Evitar a libertação para o ambiente                      P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</p>

  	<p><b>Target Enhancer Reagent (TER)</b> <i>Lithium Hydroxide, Monohydrate 5-10%</i></p> <p><b>PERIGO</b> H302 - Nocivo por ingestão H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves P264 - Lavar cuidadosamente o rosto, as mãos e qualquer região de pele exposta após manuseamento. P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. P301 + P312 — EM CASO DE INGESTÃO: Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P330 - Enxaguar a boca. P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado. P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P301 + P330 + P331 - EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. P303 + P361 + P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água [ou tomar um duche]. P304 + P340 — EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. 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 ou um médico. P321 - Tratamento específico (consulte as instruções de primeiros socorros suplementares neste rótulo). P363 - Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar. P405 - Armazenar em local fechado à chave.</p>
	<p><b>CMV Kit Controls</b> <i>Human Serum/Human Plasma 95-100%</i> <i>Azoteto de sódio &lt; 1%</i></p> <p>— H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado P273 - Evitar a libertação para o ambiente</p>
<p>—</p>	<p><b>Kit Calibrador</b> <i>Lauryl Sulfate Lithium Salt 0-10%</i> <i>Succinic Acid 0-10%</i></p> <p>— H402 - Nocivo para os organismos aquáticos P273 - Evitar a libertação para o ambiente P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num centro de eliminação de resíduos aprovado.</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 <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup>
Reagente de captura do alvo qCMV	2 °C a 8 °C	2 °C a 8 °C	30 dias <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 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 regista cada uma das vezes que os reagentes são carregados.
- D. Depois de descongelar o calibrador, a solução deve estar límpida, ou seja, sem turvação ou precipitados. Certifique-se de que os precipitados se dissolveram. Não utilize o calibrador se apresentar formação de gel, precipitado ou um tom turvo.
- 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.

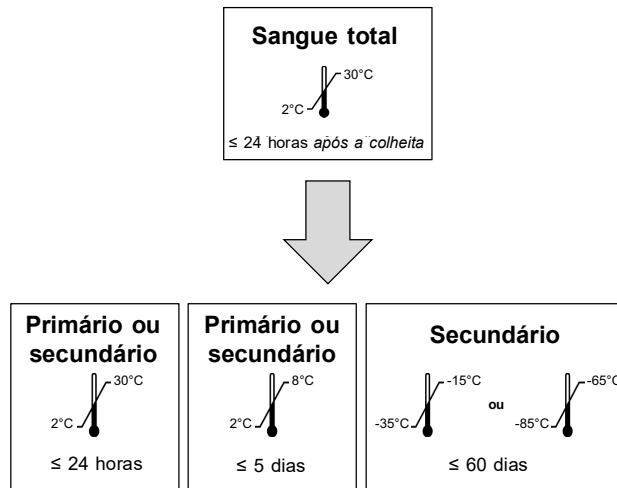
2. O sangue total tem de ser processado utilizando tubos com diluente de sangue total pré-cheios antes de ser testado no Panther System. Não exceda 3 ciclos de congelamento/descongelamento em amostras de sangue total não processadas.

### 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.

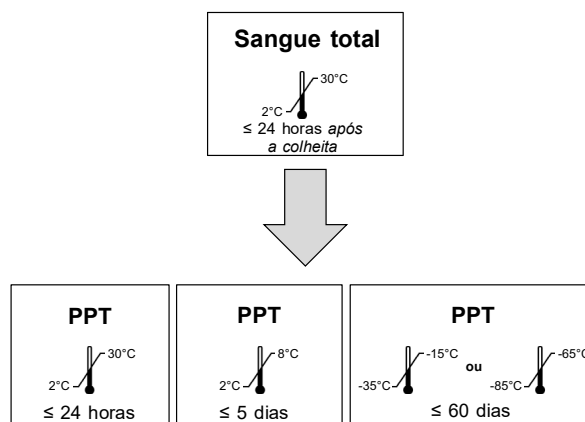


**Figura 1. Condições de conservação para tubos EDTA**

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. Diluição de espécimes de plasma

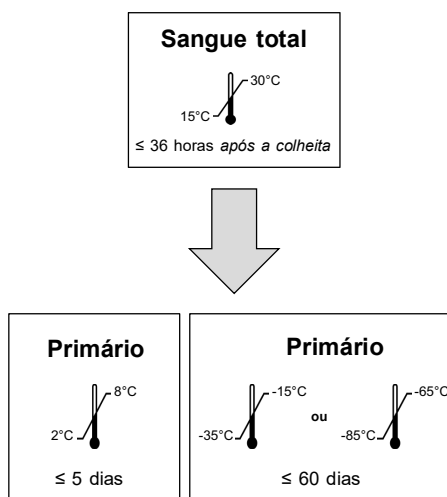
Os espécimes de plasma podem ser diluídos no SAT ou tubo secundário para serem testados no sistema Panther. Consulte *Procedimento de teste no Panther System*, passo E.5 abaixo para obter mais informações.

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

### 4. 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 caixa de reagente estimulador do alvo, 1 kit de calibrador e 1 kit de controlos)

#### Caixa do Aptima CMV Quant Assay

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

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

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

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

**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
<b>NC</b>	<b>Controlo negativo qCMV</b> <i>Plasma humano desfibrinado CMV negativo com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
<b>LPC</b>	<b>Controlo positivo baixo qCMV</b> <i>CMV inativado em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
<b>HPC</b>	<b>Controlo positivo alto qCMV</b> <i>CMV inativado em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
	<b>Etiqueta de código de barras do controlo</b>	—

**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.

<b>Material</b>	<b>Cód. produto</b>
Panther® System	303095
Panther Fusion® System	PRD-04172
Panther System, Fluidos e resíduos contínuos (Panther Plus)	PRD-06067
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, 1000 µL, com filtro, condutoras, detecção de líquido 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
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 8.25% (0,7 M a 1,16 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	—

Material	Cód. produto
Opções de tubos de colheita primários (EDTA e PPT):	—
13 mm x 100 mm	
13 mm x 75 mm	
16 mm x 100 mm	
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)	FAB-18184
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) tampa para SAT	504415
Diluyente de espécimes Aptima	PRD-03003
Kit de diluyente de espécimes Aptima contém diluyente de espécimes Aptima, 100 SATs e 100 tampas	PRD-03478
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.

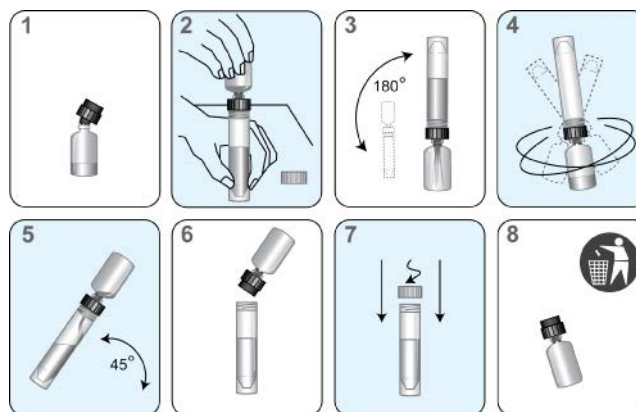
**Opção.** O frasco de TCR pode ser preparado num dispositivo de agitação de tubos por oscilação seguindo estas instruções: Remova o TCR da conservação (2 °C a 8 °C) e agite imediata e vigorosamente 10 vezes. Coloque o frasco de TCR num dispositivo de agitação de tubos por oscilação e deixe o TCR a uma 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 4, 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. Se for necessária a diluição do espécime de plasma, em casos de baixo volume de amostra e/ou aqueles que requerem testes repetidos, consulte o passo E.5 abaixo para obter mais informações.
5. Diluição de espécimes de plasma

Os espécimes de plasma podem ser diluídos na proporção de 1:3 num tubo SAT ou num tubo secundário para serem testados no sistema Panther.

##### a. Descongelar o controlo negativo Aptima CMV

- i. Retire um tubo de controlo negativo da conservação (-15 °C a -35 °C) e coloque-o a 15 °C a 30 °C. Durante o processo de descongelação, inverta suavemente o tubo para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

**Opção:** O tubo de controlo pode ser colocado 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.

- ii. Quando o conteúdo do tubo tiver descongelado, seque a parte de fora do tubo com um toalhete descartável, limpo e seco.
- iii. Para prevenir a contaminação, não abra o tubo agora.

##### b. Diluição de espécimes de plasma

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

- i. Coloque 240 ul de espécime no SAT.
- ii. Adicione 480 ul de controlo negativo.
- iii. Tape o tubo.
- iv. Inverta suavemente 5 vezes para misturar.

Os espécimes diluídos na proporção de 1:3 podem ser testados utilizando a opção 1:3 do sistema Panther (consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* para obter mais informações). O software comunicará automaticamente um resultado do produto não diluído por aplicação do fator de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

6. 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 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 não 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. 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.
3. 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.
4. 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 o 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.

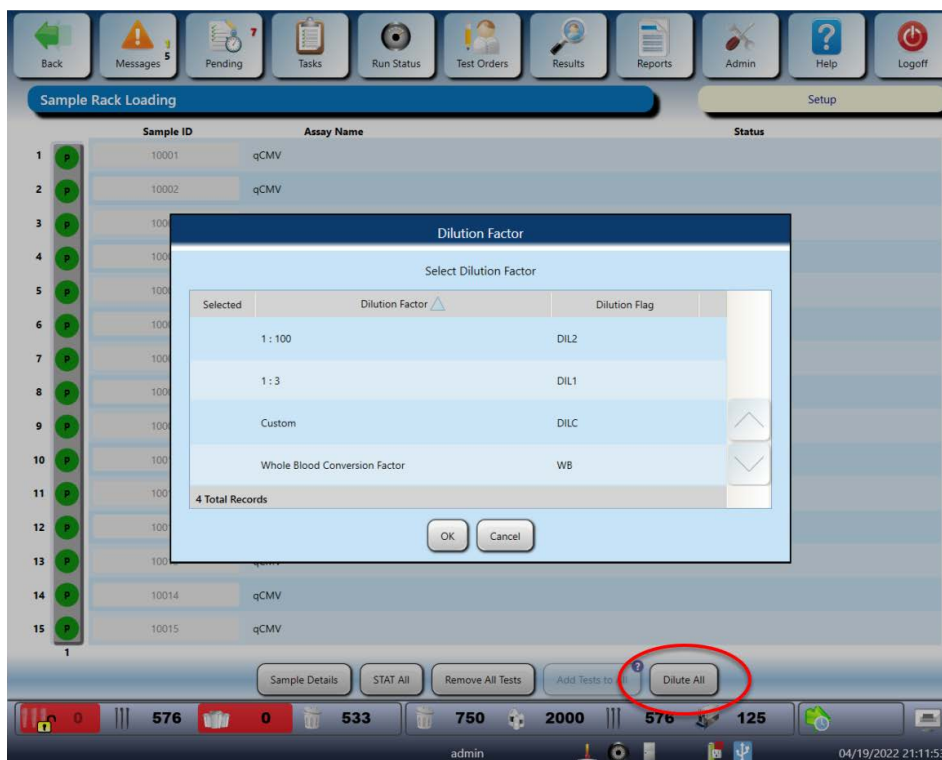
#### H. Preparação do sistema - Aplicar o fator de conversão de espécimes de sangue total.

1. Configure o sistema de acordo com as instruções do *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion 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).

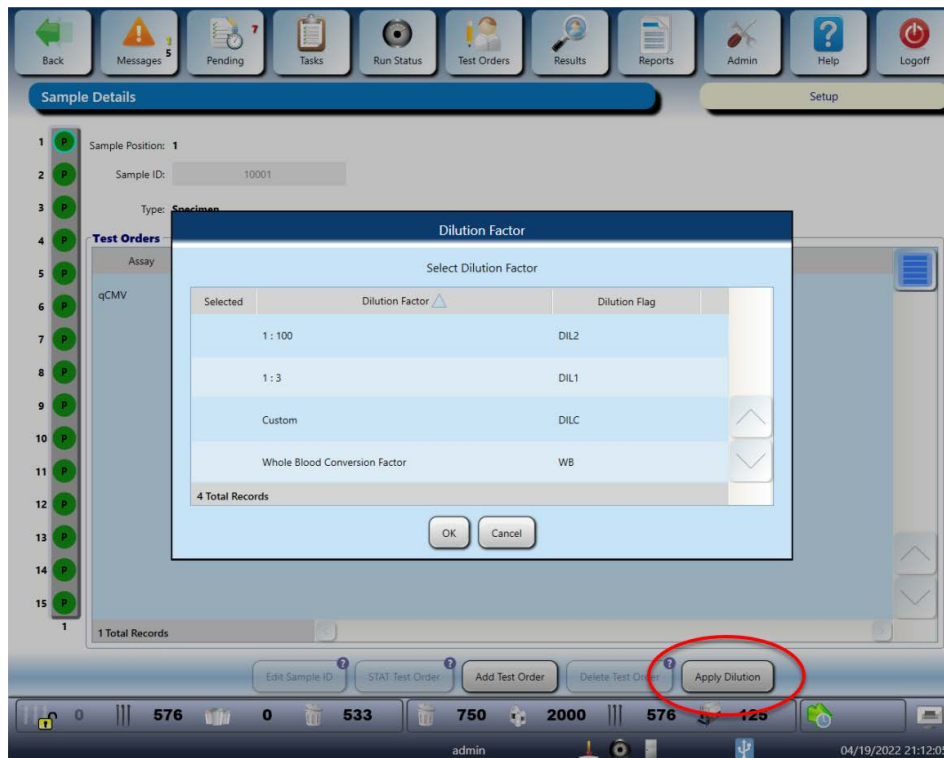


**Figura 5. A janela Dilution Factor (Fator de diluição) no ecrã Sample Rack Loading (Carregamento do suporte de amostras) (Exemplo)**

- 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 (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) (Exemplo)**

- 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.

Em caso de um resultado inválido devido a erro ML2, não volte a testar o espécime de plasma não diluído. Consulte *Procedimento de teste no Panther System*, passo E.5, neste folheto informativo para obter informações sobre como diluir o espécime.

**Nota:** Para obter informações sobre o erro ML2, consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System apropriado para obter Instruções de limpeza por lavagem magnética*.

## 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 sistema Panther determina automaticamente a concentração de DNA do CMV para espécimes e controlos mediante 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. Se for utilizada a opção de diluição de sangue total ou plasma no sistema Panther, o software calcula automaticamente a concentração de DNA do CMV para o espécime não diluído multiplicando a concentração diluída pelo fator de diluição, e os resultados da amostra serão assinalados.

**Nota:** No caso de espécimes de plasma diluídos, os resultados indicados como “Não detetados” ou “< 53 detetado” podem ser gerados por diluição de um espécime com uma concentração acima, mas próxima do LoD (limite de deteção) ou LLoQ (limite inferior de quantificação). Caso não se obtenha um resultado quantitativo, recomenda-se a colheita e teste de outro espécime não diluído.

Tabela 1: Interpretação de resultados 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 <sup>a</sup>	Inválido <sup>a</sup>	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

<sup>a</sup>Os 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 <sup>a</sup>	Inválido <sup>a</sup>	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

<sup>a</sup>Os resultados inválidos são apresentados em letra de cor azul.

**Nota:** Para espécimes de plasma diluídos, o sistema Panther reportará resultados superiores ao ULoQ (limite superior de quantificação) utilizando notação científica se o resultado do espécime diluído estiver dentro do intervalo do ensaio antes da aplicação do fator de diluição.

Os critérios de aceitação para cada um dos controlos do Aptima CMV Quant assay são descritos na Tabela 3.

**Nota:** O intervalo de recuperação apresentado abaixo varia com base no valor atribuído a cada lote específico. Consulte a concentração atribuída apresentada na Folha do código de barras do controlo fornecida com cada caixa de controlo.

Tabela 3: Critérios de aceitação para o intervalo de recuperação do Aptima CMV Quant assay

Componente	Intervalo de recuperação para execuções válidas
Controlo negativo	N/D
Controlo positivo baixo	+/- 0,6 log <sub>10</sub> cópias/ml
Controlo positivo alto	+/- 0,5 log <sub>10</sub> cópias/ml

## 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 analítico

### 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.<sup>14</sup>

### Limite de detecção utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS no plasma

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS (código NIBSC 09/162)<sup>21</sup> para 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. 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 40,7 UI/mL para o plasma.

Tabela 4: 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 o 1.º Padrão Internacional 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 5 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 5: 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 de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos

#### Limite de detecção de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos no plasma

Foi verificado o LoD para três genótipos diferentes com base na sequência<sup>7</sup> da glicoproteína B (gB-2, gB-3, gB-4) e mutantes resistentes a fármacos testando várias concentrações do CMV próximas do LoD estabelecido para o plasma utilizando o 1.º Padrão Internacional 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 e mutantes resistentes a fármacos foi de 40 UI/ml utilizando ambos os lotes de reagentes.

**Nota:** O desempenho do Aptima CMV Quant assay com mutações resistentes a fármacos de CMV foi avaliado apenas em espécimes de plasma.

Tabela 6: Limite de detecção de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos no plasma

Genótipos/Mutantes	Concentração (UI/mL)
gB-2	40
gB-3	40
gB-4	35
Mutante resistente a fármacos UL54 e UL97*	35
Mutante resistente a fármacos UL56**	35

\*As mutações genéticas UL54 podem levar a resistência cruzada a vários antivíricos para o tratamento da infecção por CMV, tais como ganciclovir (GCV), cidofovir (CDV) e foscarnet (PFA). As mutações genéticas UL97 também levam a resistência ao ganciclovir (GCV).

\*\*As mutações genéticas UL56 levam a resistência ao letermovir (LET).

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 1.º Padrão Internacional 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 7: Limite de detecção em vários genótipos do CMV no sangue total*

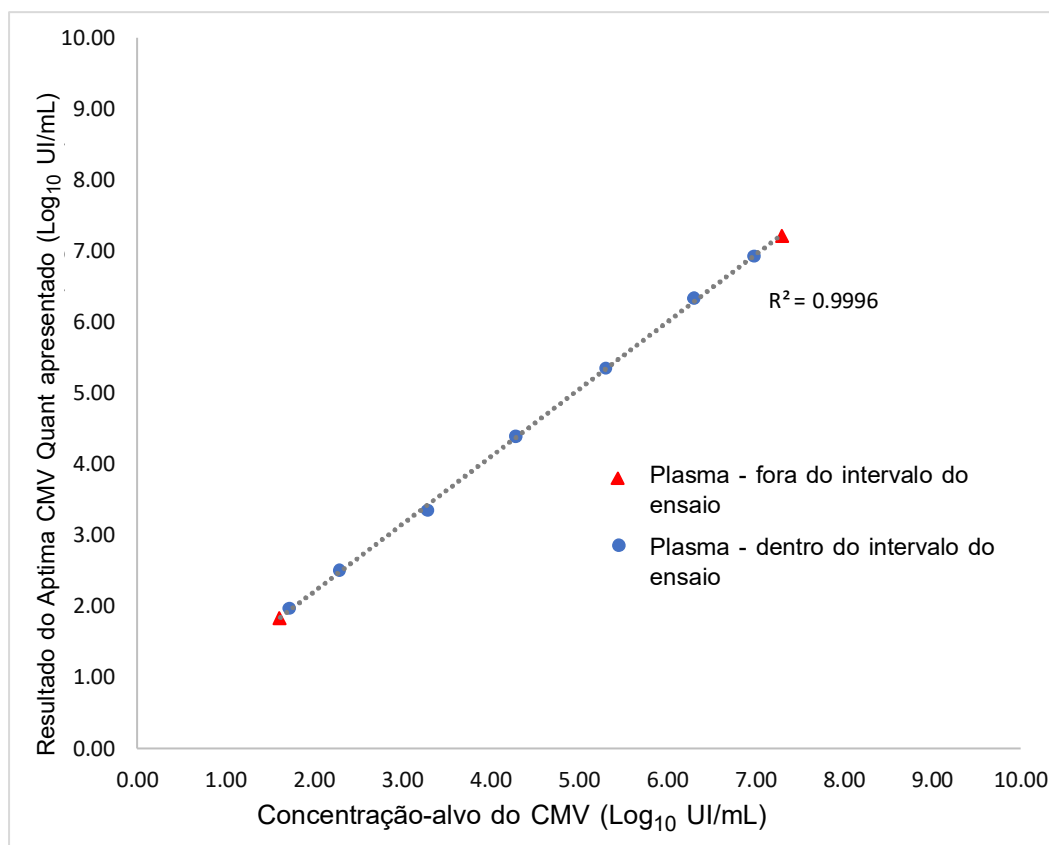
<b>Genótipo</b>	<b>Concentração (UI/mL)</b>
gB-2	150
gB-3	150
gB-4	130

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.<sup>15</sup> A concentração dos painéis variou entre 1,62 log<sub>10</sub> IU/mL e 7,30 log<sub>10</sub> IU/mL. O Aptima CMV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 7 log<sub>10</sub> IU/mL conforme mostrado na Figura 7.

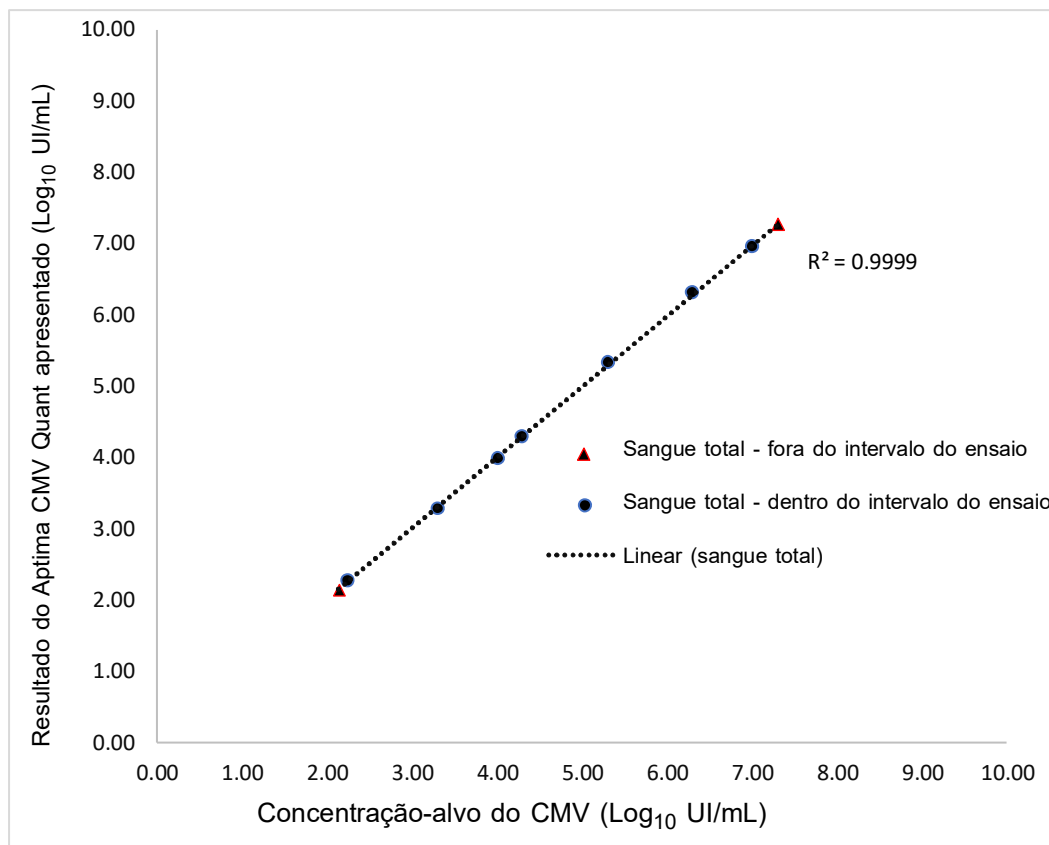


**Figura 7. Linearidade no plasma**



### 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.<sup>15</sup> A concentração dos painéis variou entre 2,15 log<sub>10</sub> IU/mL e 7,3 log<sub>10</sub> IU/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<sub>10</sub> IU/mL conforme mostrado na Figura 8.

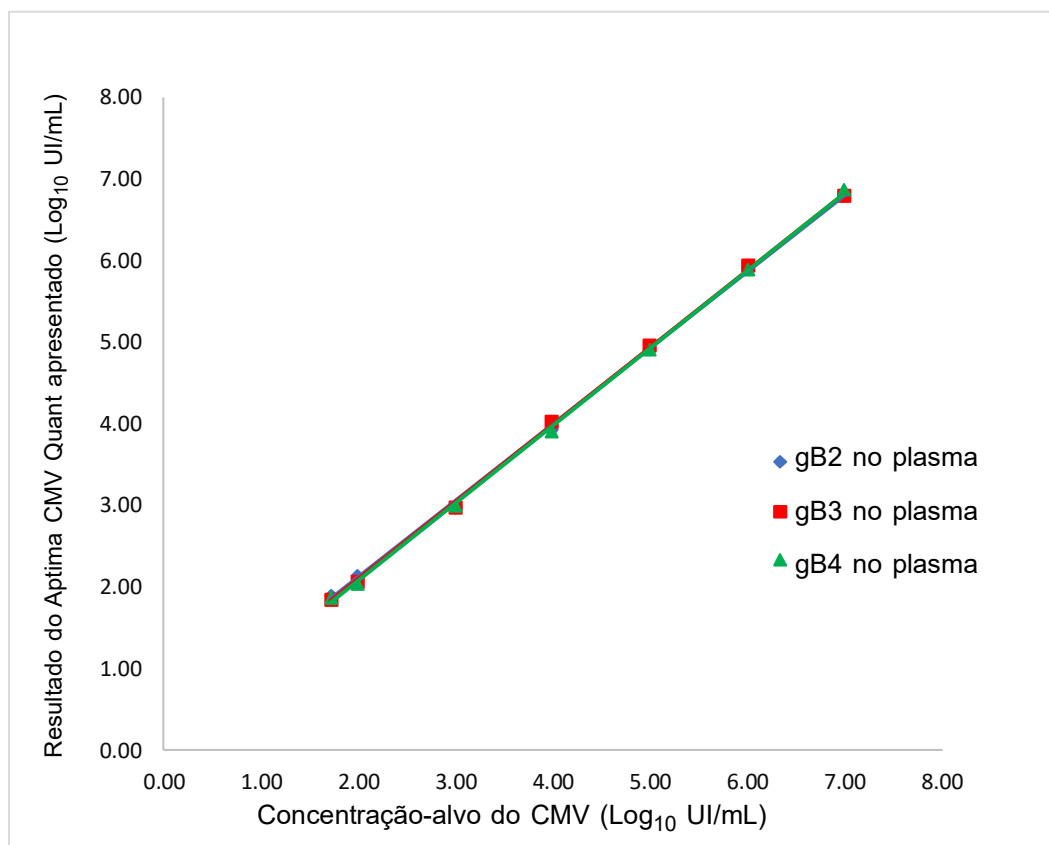


**Figura 8. Linearidade no sangue total**

## Linearidade em vários genótipos do CMV

### Linearidade em vários genótipos do CMV no plasma

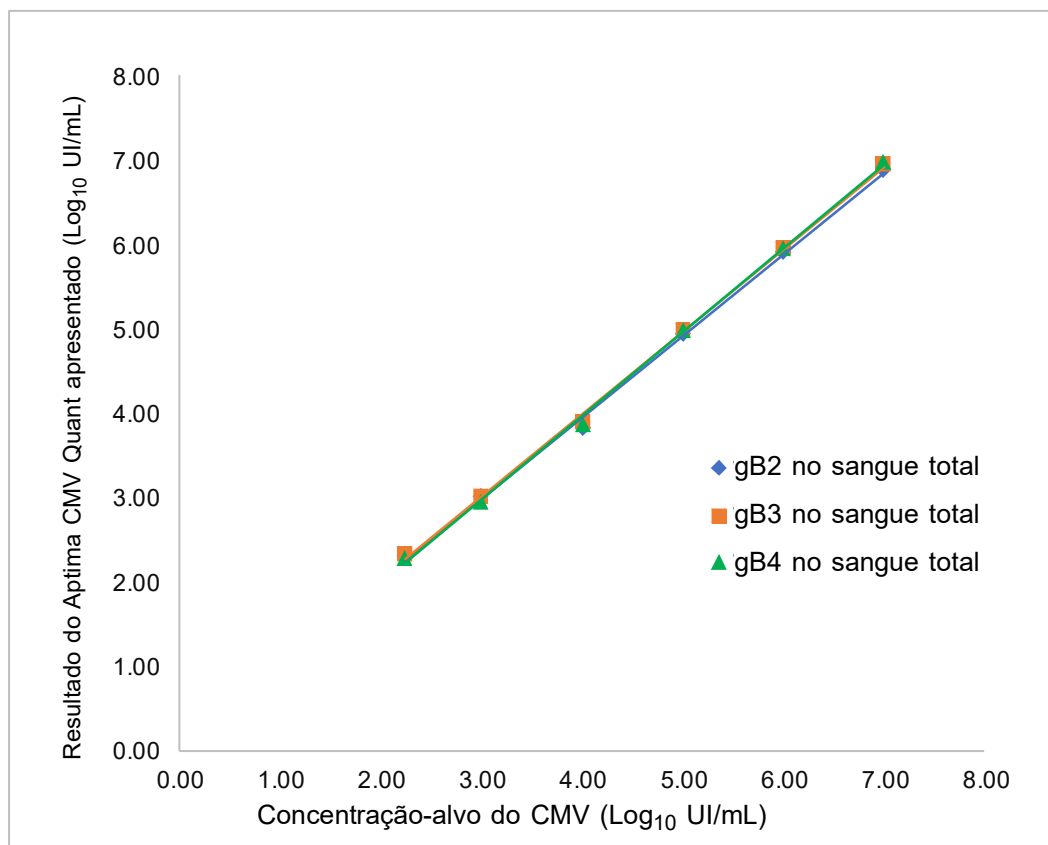
Foi verificada a linearidade para os genótipos da glicoproteína gB-2, gB-3 e gB-4 testando painéis de CMV diluído em plasma CMV negativo a concentrações que variam de 1,72 log<sub>10</sub> IU/mL a 7,00 log<sub>10</sub> IU/mL. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo para todos os genótipos testados, 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  $\log_{10}$  IU/mL a 7,00  $\log_{10}$  IU/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.<sup>14</sup> 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<sub>10</sub> UI/mL (ou seja, no LLoQ, uma diferença superior a 1 log<sub>10</sub> UI/mL entre duas medições é estatisticamente significativa).

**Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS no plasma**

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º Padrão Internacional da OMS (código NIBSC 09/162, genótipo gB-1)<sup>21</sup> 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 8. Os resultados do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção ≥ 95% estão resumidos na Tabela 9. O LLoQ gerado com o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV no plasma é 53 UI/mL.

*Tabela 8: 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 <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> 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
	60	60	1,70	1,83	0,24	0,14	0,62
3	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 ≥ 95% para os lotes de reagentes 1, 2 e 3 estão sombreados.

Tabela 9: Resumo do LLoQ para o plasma utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Lote de reagente	(UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)
1	53	1,72
2	41	1,61
3	47	1,67

### Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º Padrão Internacional 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 10. 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 11. O LLoQ gerado com o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV no sangue total é 176 UI/mL.

Tabela 10: 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 <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> 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  $\leq 1$ ) e detecção  $\geq 95\%$  para os lotes de reagentes 1, 2 e 3 estão sombreados.

Tabela 11: Resumo do LLoQ para o sangue total utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV

Lote de reagente	(UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)
1	138	2,14
2	106	2,02
3	176	2,25

### Determinação do limite inferior de quantificação de genótipos do CMV e mutantes resistentes a fármacos

#### Limite inferior de quantificação de genótipos e mutantes resistentes a fármacos no plasma

Foi verificado o LLoQ estabelecido utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS testando diluições dos genótipos do CMV gB-2, gB-3, gB-4 e mutantes resistentes a fármacos 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 12. O LLoQ calculado para os genótipos gB-2, gB-3, gB-4 e mutantes resistentes a fármacos do lote de reagentes com a concentração mais elevada coincidente com os requisitos de ET e detecção ≥ 95% está resumido na Tabela 12. O LLoQ global para plasma neste ensaio é de 53 UI/ml.

**Nota:** O desempenho do Aptima CMV Quant assay com mutações resistentes a fármacos de CMV foi avaliado apenas em espécimes de plasma.

Tabela 12: Determinação do LLoQ de genótipos e mutantes resistentes a fármacos no plasma

Genótipos /Mutantes	N	% de detecção	Concentração-alvo (log <sub>10</sub> UI/mL)	Aptima CMV Quant (log <sub>10</sub> UI/mL)	DP (log <sub>10</sub> UI/mL)	Desvio sistemático  (log <sub>10</sub> UI/mL)	ET calculado (log <sub>10</sub> UI/mL)
gB-2	60	93,3	1,48	1,38	0,41	0,10	0,92
	60	96,7	1,54	1,39	0,39	0,16	0,95
	60	93,3	1,60	1,49	0,38	0,11	0,87
	60	96,7	1,65	1,70	0,24	0,04	0,51
	60	95,0	1,70	1,54	0,32	0,16	0,80
gB-3	60	91,7	1,48	1,27	0,38	0,20	0,97
	60	91,7	1,54	1,27	0,40	0,27	1,07
	60	88,3	1,60	1,31	0,47	0,29	1,23
	60	93,3	1,65	1,46	0,34	0,20	0,88
	60	91,7	1,70	1,57	0,29	0,13	0,71
	60	98,3	1,74	1,55	0,30	0,19	0,79

Tabela 12: Determinação do LLoQ de genótipos e mutantes resistentes a fármacos no plasma (continua)

Genótipos /Mutantes	N	% de detecção	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)
gB-4	60	96,7	1,48	1,38	0,39	0,09	0,88
	60	98,3	1,54	1,51	0,33	0,03	0,69
	60	95,0	1,60	1,66	0,36	0,06	0,79
	60	98,3	1,65	1,66	0,29	0,01	0,59
	60	100,0	1,70	1,70	0,24	0,00	0,48
Mutante resistente a fármacos (UL54 e UL97)	60	95,0	1,48	1,57	0,32	0,10	0,74
	60	98,3	1,54	1,58	0,32	0,04	0,68
	60	98,3	1,60	1,72	0,33	0,12	0,79
	60	100,0	1,65	1,74	0,22	0,08	0,51
	60	100,0	1,70	1,83	0,24	0,14	0,61
Mutante resistente a fármacos (UL56)	60	95,0	1,48	1,54	0,28	0,07	0,64
	60	96,7	1,54	1,60	0,30	0,06	0,65
	60	100,0	1,60	1,69	0,26	0,08	0,60
	60	100,0	1,65	1,78	0,29	0,12	0,71
	60	100,0	1,70	1,74	0,27	0,05	0,58

DP=desvio padrão

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

Tabela 13: Resumo do LLoQ de genótipos e mutantes resistentes a fármacos no plasma

Genótipos/Mutantes	LLoQ	
	(UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)
gB-2	50	1,70
gB-3	35	1,55
gB-4	24	1,38
Mutante resistente a fármacos UL54 e UL97*	38	1,57
Mutante resistente a fármacos UL56**	35	1,54

\*As mutações genéticas UL54 podem levar a resistência cruzada a vários antiviricos para o tratamento da infecção por CMV, tais como ganciclovir (GCV), cidofovir (CDV) e foscarnet (PFA). As mutações genéticas UL97 também levam a resistência ao ganciclovir (GCV).

\*\*As mutações genéticas UL56 levam a resistência ao letermovir (LET).

**Limite inferior de quantificação em vários genótipos no sangue total**

Foi verificado o LLoQ estabelecido utilizando o 1.º Padrão Internacional 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 14. 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 15. O LLoQ global para o sangue total neste ensaio é de 176 UI/mL.

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

Genótipo	N	N detetado	Concentração-alvo	Aptima CMV Quant	DP	Desvio sistemático	ET calculado
			(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)	(log <sub>10</sub> 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 15: Resumo do LLoQ em vários genótipos no sangue total

Genótipo	LLoQ	
	(UI/mL)	(log <sub>10</sub> UI/mL)
gB-2	129	2,11
gB-3	104	2,02
gB-4	93	1,97

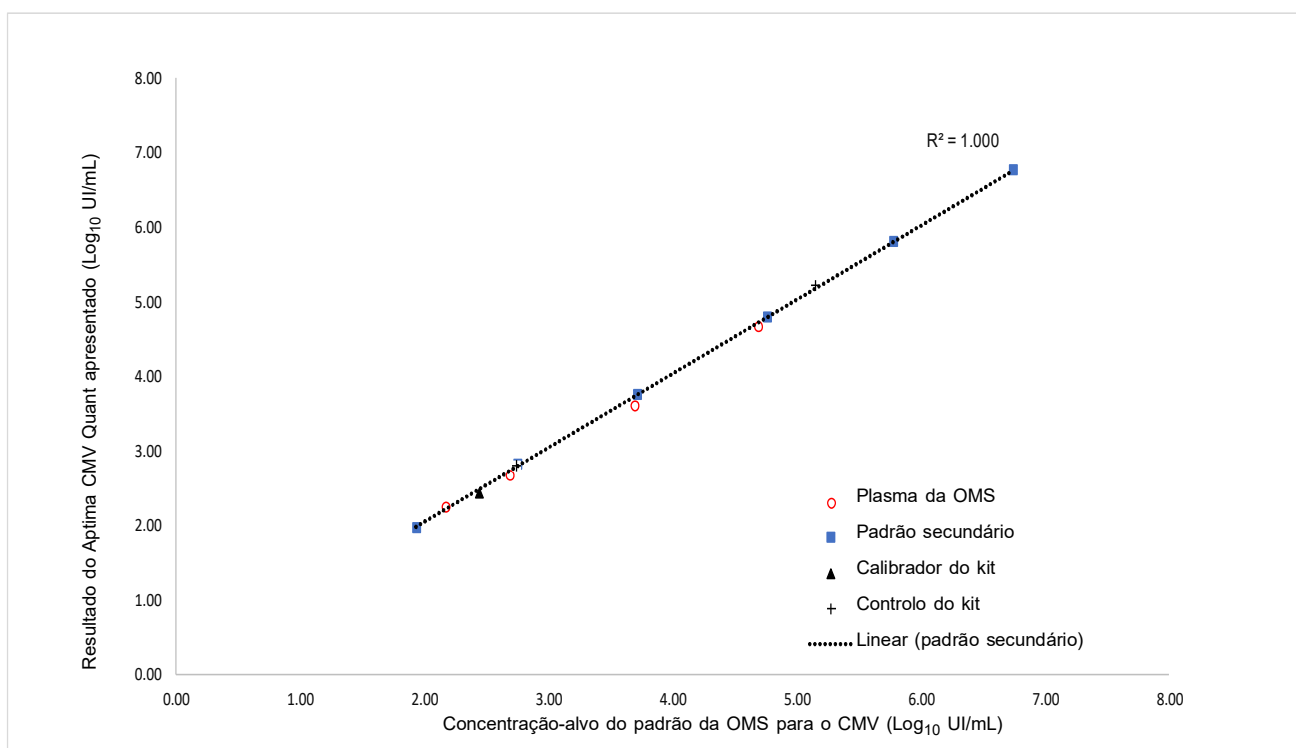


## Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS

Durante o desenvolvimento e o fabrico do produto, foi utilizada uma série de padrões secundários com concentrações conhecidas para estabelecer a rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS. O 1.º Padrão Internacional 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.<sup>16</sup> A concentração dos padrões secundários variou entre 1,80 e 6,60 log<sub>10</sub> UI/ml.

### Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS utilizando plasma

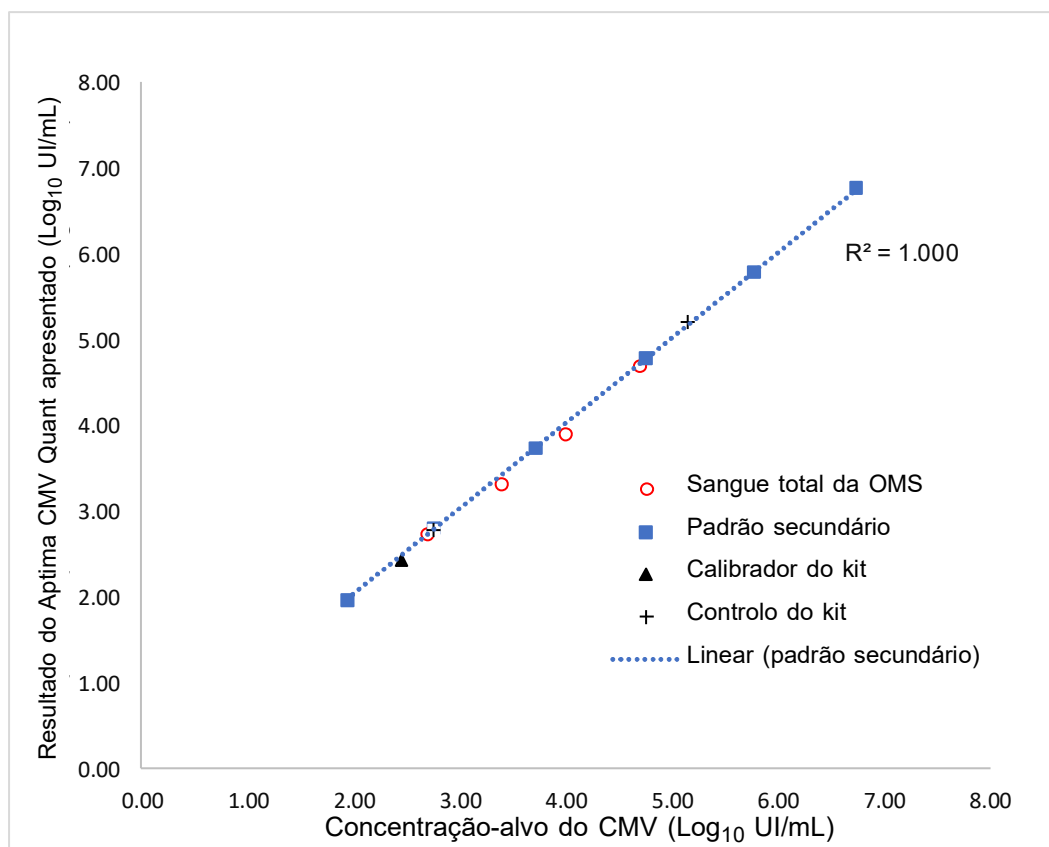
As concentrações testadas para o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV foram entre 2,18 e 4,70 log<sub>10</sub> UI/ml. Os painéis de plasma da OMS, os padrões secundários, os controlos do ensaio e os calibradores do ensaio recuperaram conforme esperado, em todo o intervalo linear do ensaio, como se pode observar na Figura 11.



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

**Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS utilizando sangue total**

As concentrações testadas para o 1.º Padrão Internacional da OMS para o CMV em sangue total foram entre 2,70 e 4,70 log<sub>10</sub> UI/ml. Os painéis de sangue total com padrões 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 12.



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

## Precisão

### Plasma

Para avaliar a precisão, foi produzido um painel de 6 membros, diluindo os 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.<sup>17</sup>

A Tabela 16 mostra a precisão dos resultados do ensaio (em  $\log_{10}$  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 16: Precisão do Aptima CMV Quant Assay no plasma

N	Concentração média ( $\log_{10}$ 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 precisão, foi produzido um painel de 6 membros, diluindo os espécimes clínicos CMV positivos ou deitando CMV em cultura em 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 17 mostra a precisão 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 17: Precisão do Aptima CMV Quant Assay no sangue total

N	Concentração média (log <sub>10</sub> 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 EP07<sup>18</sup> e EP37<sup>19</sup>. Foram testadas amostras de plasma CMV negativas e amostras contaminadas com CMV a uma concentração de 2,22 log<sub>10</sub> UI/ml e 3,30 log<sub>10</sub> 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<sub>10</sub> 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 genómico 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 18. Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 18: Tipos de espécimes clínicos testados

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

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 19 em concentrações pelo menos três vezes a  $C_{máx}$  de fármacos no plasma humano.

Tabela 19: 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, CI de 95%: 99,3-100%).

Tabela 20: 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
<b>Especificidade</b>	99,7%	100%	99,9%
<b>(IC de 95%)</b>	(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 21 foi avaliada no plasma humano CMV negativo na presença ou ausência de 2,2 log<sub>10</sub> IU/mL e 3,3 log<sub>10</sub> IU/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<sub>10</sub> IU/mL e 4,0 log<sub>10</sub> IU/mL do CMV. Os agentes patogênicos foram testados à concentração mais alta disponível. Não foi observada reatividade cruzada ou interferência.

Tabela 21: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração		Micro-organismo/Agente patogênico	Concentração	
Adenovírus tipo 4	1886	TCID50/mL <sup>a</sup>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1 000 000	CFU/mL
Poliomavírus BK	1 000 000	cp/mL <sup>b</sup>	<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 <sup>c</sup>	<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 <sup>d</sup>			
<i>Clostridium perfringens</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Escherichia coli</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 000 000	CFU/mL			
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 000 000	CFU/mL			

<sup>a</sup>TCID50/ml = Unidades de dose infecciosa de cultura do tecido por ml

<sup>b</sup>cp/ml = Cópias virais por ml

<sup>c</sup>UI/ml = Unidades internacionais por ml

<sup>d</sup>CFU/ml = Unidades formadoras de colônias por ml

\*testado com tipo de amostra de sangue total

**Diluição de amostras de plasma utilizando o controlo negativo Aptima CMV (1:3)**

Para avaliar a exatidão da quantificação do DNA do CMV em amostras de plasma diluídas com o controlo negativo Aptima CMV, foram diluídas amostras com concentrações distribuídas ao longo do intervalo linear na proporção de 1:3 com o controlo negativo Aptima CMV (240 µl de amostra combinados com 480 µl de controlo negativo Aptima CMV). Foram testados espécimes não diluídos e diluídos em triplicado. Os testes foram realizados utilizando um lote de reagentes num sistema Panther com dois lotes de controlo negativo Aptima CMV. A diferença entre os resultados dos testes não diluídos e diluídos foi calculada para cada conjunto de amostras, como mostra a Tabela 22. As concentrações da amostra foram recuperadas com exatidão nas amostras diluídas após a incorporação do fator de diluição.

*Tabela 22: Repetibilidade de espécimes clínicos de plasma diluídos em controlo negativo*

<b>Espécimes de plasma não diluídos</b> <b>Concentração média apresentada</b> <b>(log<sub>10</sub> UI/ml) n=3</b>	<b>Espécimes de plasma diluídos</b> <b>Concentração média</b> <b>apresentada (log<sub>10</sub> UI/ml) n=6</b>	<b>Diferença</b> <b>(log<sub>10</sub> UI/ml)</b>
2,30	2,42 <sup>a</sup>	0,12
2,50	2,60	0,11
3,03	3,02	-0,01
3,46	3,45	-0,01
3,29	3,29	0,00
4,64	4,43	-0,21
5,32	5,31	-0,01
6,43	6,44	0,01
6,91 <sup>b</sup>	6,95	0,05
>ULoQ <sup>c</sup>	7,41 <sup>d</sup>	N/D

<sup>a</sup>Resultado de duas réplicas. Quatro resultados de "Detetado", mas não quantificados.

<sup>b</sup>Resultado de duas réplicas. Um resultado foi "Detetado", mas não quantificado porque estava >ULoQ.

<sup>c</sup>Três resultados foram "Detetados", mas não quantificados porque estavam >ULoQ.

<sup>d</sup>Resultado de quatro réplicas. Dois resultados foram "Detetados", mas não quantificados porque estavam >ULoQ.

### Confirmação do LoD e do LLoQ utilizando o 1.º Padrão Internacional da OMS diluído em controlo negativo Aptima CMV

O LoD e o LLoQ do Aptima CMV Quant assay foram confirmados com o 1.º Padrão Internacional da OMS (Código NIBSC 09/162) em plasma, diluído na proporção de 1:3 utilizando o controlo negativo Aptima CMV. As amostras foram preparadas em plasma humano negativo para CMV com concentrações de CMV de 90, 105, 120, 135, 150 e 165 UI/ml. Cada painel foi diluído na proporção de 1:3 no controlo negativo Aptima CMV, pouco antes do teste, para obter concentrações finais de aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50 e 55 UI/ml. Foi testado um total 60 réplicas de cada membro do painel com um lote de reagente em três dias. O erro total foi calculado utilizando o modelo de Westgard: Erro Total (ET) = |Desvio sistemático| + 2DP. Todas as amostras com concentração  $\geq 45$  UI/ml apresentaram  $\geq 95\%$  de deteção e um erro total (ET) de  $\leq 1 \log_{10}$  UI/ml, tal como apresentado na Tabela 23. Isto confirma o LLoQ do CMV com amostras diluídas com controlo negativo.

Tabela 23: LoD e LLoQ de amostras de plasma diluídas na proporção de 1:3 utilizando o controlo negativo

N	% Detetado	Concentração alvo após diluição na proporção de 1:3 (UI/ml)	Concentração alvo após diluição na proporção de 1:3 (log <sub>10</sub> UI/ml)	Aptima CMV Quant para espécimes diluídos (log <sub>10</sub> UI/ml)	DP (log <sub>10</sub> UI/ml)	Desvio sistemático  (log <sub>10</sub> UI/ml)	ET calculado (log <sub>10</sub> UI/ml)
60	98,3%	45	1,65	1,73	0,22	0,08	0,53

### Contaminação por transferência

Foi avaliada a contaminação por transferência no sistema Panther 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).

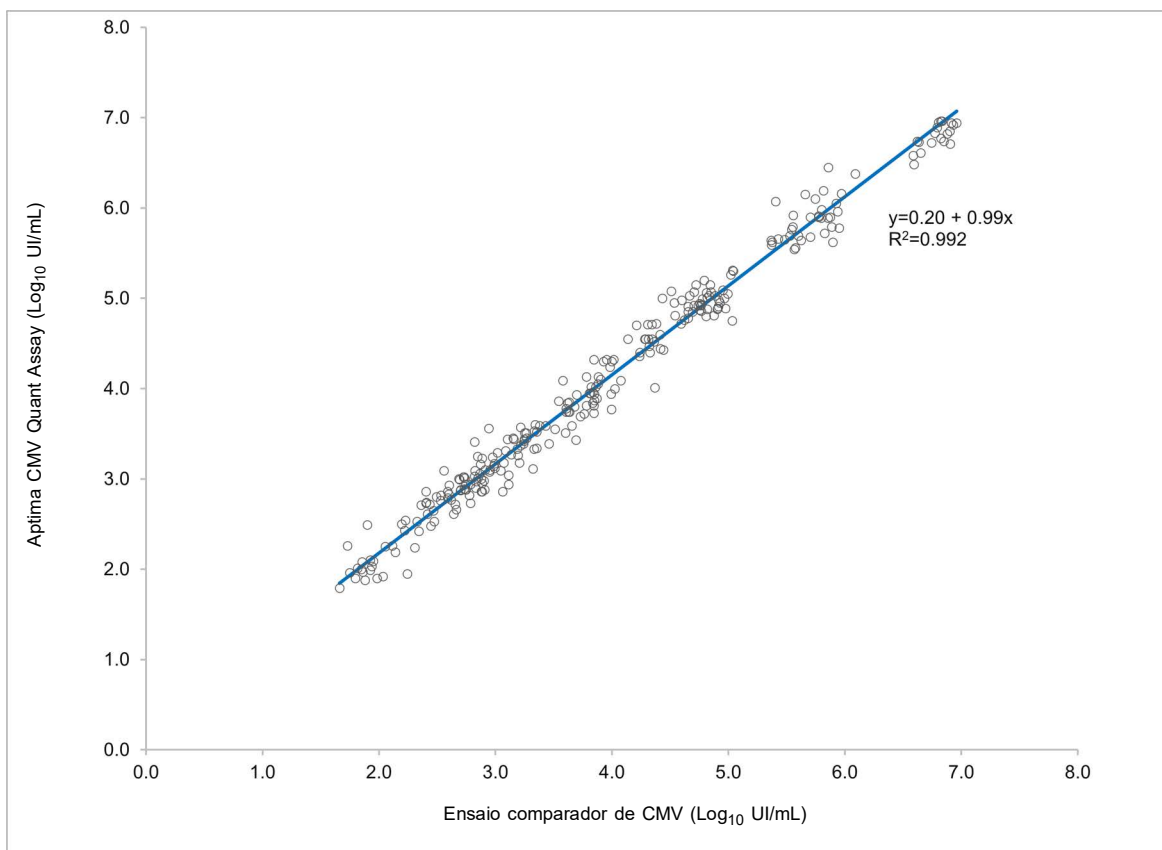


## Correlação de métodos

Este estudo foi desenhado de acordo com a norma CLSI EP09c.<sup>19</sup>

### Correlação de métodos no plasma

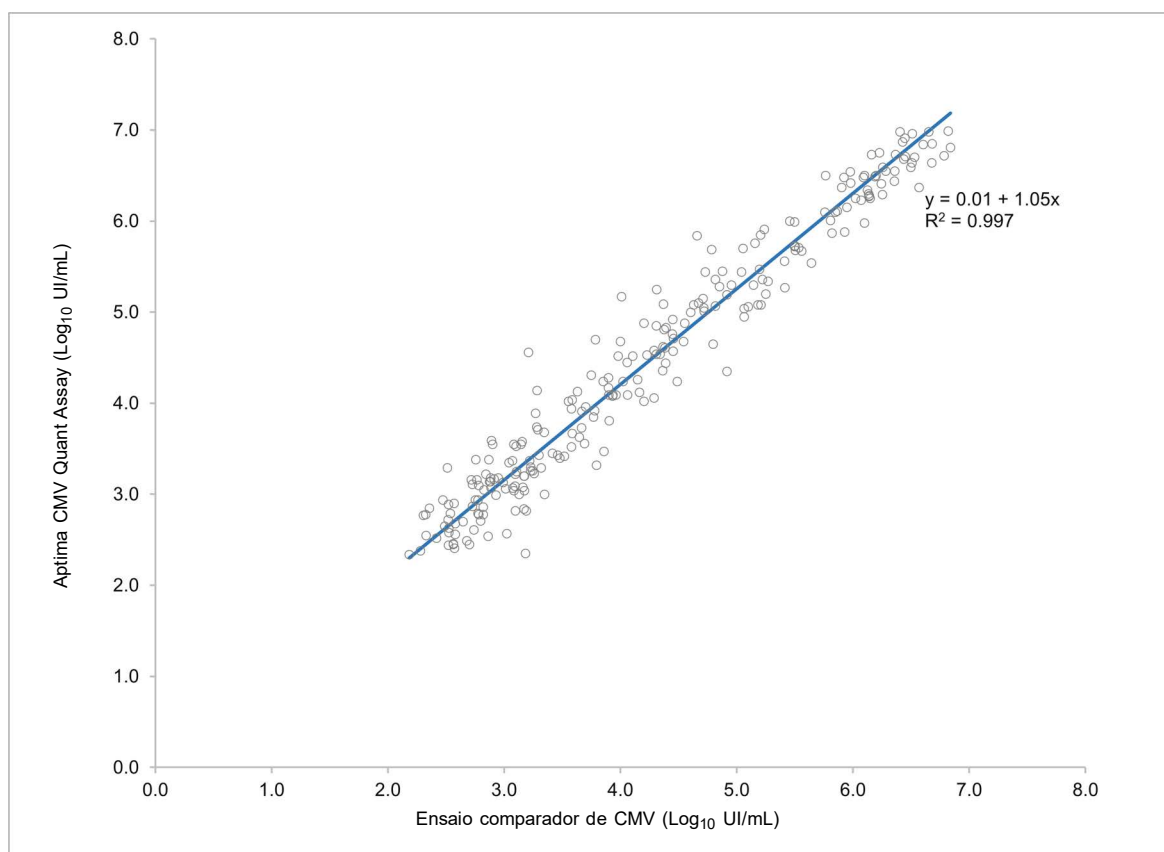
O desempenho do Aptima CMV Quant assay foi avaliado em relação ao ensaio comparador de CMV testando espécimes clínicos não diluídos de doentes CMV positivos e espécimes artificiais compostos por várias estirpes de vírus em cultura pertencentes aos quatro genótipos adicionados a plasma EDTA negativo de dadores 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 ensaio comparador de CMV nos testes de amostras de plasma**

### Correlação de métodos no sangue total

O desempenho do Aptima CMV Quant assay foi avaliado em relação ao ensaio comparador de CMV testando espécimes clínicos não diluídos de doentes CMV positivos e espécimes artificiais compostos por vírus em cultura adicionados a sangue total EDTA negativo de doadores 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 ensaio comparador de CMV nos testes de amostras de sangue total**

## Reprodutibilidade

### Reprodutibilidade em amostras de plasma

A reprodutibilidade do Aptima CMV Quant Assay no plasma foi avaliada em três centros externos. Dois operadores realizaram os testes em cada centro. Cada operador realizou uma execução por dia durante 5 dias, utilizando um lote de reagentes durante os testes. Cada execução teve três réplicas de cada membro do painel.

A reprodutibilidade foi testada utilizando membros do painel preparados diluindo espécimes clínicos CMV positivos ou CMV em cultura em plasma EDTA CMV negativo. As concentrações de DNA de CMV abrangem o intervalo linear do ensaio.

A Tabela 24 mostra a reprodutibilidade e a precisão dos resultados do ensaio para cada membro do painel positivo entre centros, entre operadores, entre dias, entre execuções, dentro das execuções e globais. O coeficiente de variação foi calculado utilizando a equação seguinte em que  $\sigma^2$  é a variação da amostra dos dados após a transformação  $\log_{10}$ .

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2 \times \ln(10)} - 1}$$

Tabela 24: Reprodutibilidade dos níveis de DNA de CMV do Aptima CMV Quant assay no Panther System nos membros do painel positivo no plasma

N	Média observada		Contribuição para a variação total DP (%CV <sup>2</sup> )					Variação total DP (%CV)
	UI/mL	Log <sub>10</sub> UI/mL	Entre centros	Entre operadores	Entre dias	Entre execuções	Dentro das execuções	
90	198,33	2,26	0,05 (11,19)	0,00 (0)	0,06 (12,94)	0,00 (0)	0,17 (39,59)	0,18 (43,68)
90	603,27	2,76	0,02 (3,99)	<0,01 (2,22)	0,07 (15,68)	0,04 (10,25)	0,12 (27,04)	0,14 (33,67)
90	2428,54	3,36	0,06 (12,83)	0,00 (0)	0,09 (21,42)	0,06 (12,83)	0,11 (24,69)	0,16 (38,27)
90	27623,02	4,42	0,07 (15,98)	0,00 (0)	0,04 (9,29)	0,06 (13,85)	0,08 (19,38)	0,13 (30,63)
90	284107,74	5,44	0,07 (15,58)	0,00 (0)	0,04 (10,22)	0,00 (0)	0,09 (21,66)	0,12 (28,90)
90	3821364,62	6,57	0,08 (19,12)	0,00 (0)	0,06 (14,22)	0,02 (4,02)	0,08 (17,45)	0,13 (30,25)

%CV=coeficiente de variação log-normal, DP=desvio padrão (log<sub>10</sub> UI/mL)

**Nota:** a variabilidade derivada de alguns fatores pode ser numericamente negativa. Tal ocorreu quando a variabilidade devido a esses fatores foi muito pequena. Nesses casos, o DP e o %CV são mostrados como 0.

### Reprodutibilidade em amostras de sangue total

A reprodutibilidade do Aptima CMV Quant Assay no sangue total foi avaliada em três centros externos. Dois operadores realizaram os testes em cada centro. Cada operador realizou uma execução por dia durante 5 dias, utilizando um lote de reagentes durante os testes. Cada execução teve três réplicas de cada membro do painel.

A reprodutibilidade foi testada utilizando membros do painel preparados diluindo espécimes clínicos CMV positivos ou CMV em cultura em sangue total EDTA CMV negativo. As concentrações de DNA de CMV abrangeram o intervalo linear do ensaio.

A Tabela 25 mostra a reprodutibilidade e a precisão dos resultados do ensaio para cada membro do painel positivo entre centros, entre operadores, entre dias, entre execuções, dentro das execuções e globais excluindo um outlier observado (0,2%, 1/533). O coeficiente de variação foi calculado utilizando a equação seguinte em que  $\sigma^2$  é a variação da amostra dos dados após a transformação  $\log_{10}$ .

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2} \times \ln(10) - 1}$$

Para todos os membros do painel CMV positivos e CMV negativos, os valores de concordância foram de 100%.

Tabela 25: Reprodutibilidade dos níveis de DNA de CMV do Aptima CMV Quant assay no Panther System nos membros do painel positivo no plasma

N	Média observada		Contribuição para a variação total DP (%CV <sup>2</sup> )					Variação total DP (%CV)
	UI/mL	Log <sub>10</sub> UI/mL	Entre centros	Entre operadores	Entre dias	Entre execuções	Dentro das execuções	
89	604,32	2,73	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,11 (25,39)	0,18 (43,23)	0,21 (51,32)
89	2188,59	3,32	<0,01 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,07 (15,25)	0,11 (25,34)	0,13 (29,83) <sup>a</sup>
89	7830,84	3,87	0,04 (8,75)	0,04 (8,16)	0,00 (0)	0,08 (17,71)	0,13 (30,28)	0,16 (37,70)
88	48897,12	4,66	0,03 (7,11)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,10 (22,47)	0,11 (24,99)	0,15 (34,89)
88	375626,91	5,56	0,04 (9,59)	0,04 (9,96)	0,00 (0)	0,05 (12,04)	0,09 (21,18)	0,12 (28,34)
89	4609046,44	6,64	0,08 (18,15)	0,00 (0)	0,05 (11,42)	0,03 (6,32)	0,10 (22,74)	0,14 (32,39)

%CV=coeficiente de variação log-normal, DP=desvio padrão (log<sub>10</sub> UI/mL)

**Nota:** a variabilidade derivada de alguns fatores pode ser numericamente negativa. Tal ocorreu quando a variabilidade devido a esses fatores foi muito pequena. Nesses casos, o DP e o %CV são mostrados como 0.

<sup>a</sup>Resultado da variação total excluindo o outlier que poderá ser resultado de um problema na preparação da amostra.

## Desempenho clínico

### Concordância clínica

O estudo de desempenho clínico foi desenhado para avaliar a concordância clínica entre o Aptima CMV Quant assay e um teste comparador aprovado. Durante o estudo multicêntrico prospectivo em oito centros clínicos, foram colhidos espécimes de plasma de oito recetores de transplantes de órgãos sólidos (RTOS) e recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas (RTCEH) submetidos a monitorização de CMV na prática clínica de rotina. Além disso, foram obtidas de fornecedores de espécimes clínicos amostras congeladas residuais de RTOS e RTCEH.

Dos 88 doentes incluídos no estudo prospectivo, seis não foram avaliáveis devido a retirada (n = 5), ou por não terem resultados de amostras válidos com o Aptima CMV Quant assay e o teste aprovado (n = 1). A Tabela 26 mostra as características demográficas e clínicas na linha de base dos 82 doentes avaliáveis.

Tabela 26: Características demográficas e clínicas na linha de base dos doentes avaliáveis gerais e por tipo de transplante

Caraterísticas		RTOS	RTCEH	Todos
Total, N		62	20	82
Sexo, n (%)	Masculino	28 (45,2)	14 (70,0)	42 (51,2)
	Feminino	34 (54,8)	6 (30,0)	40 (48,8)
Idade (anos)	Média ± (DP)	52,1 ± (12,93)	51,9 ± (14,60)	52,1 ± (13,27)
	Mediana	53,0	54,5	54,0
	Mínima	20	22	20
	Máxima	81	69	81
Etnia, n (%)	Hispanico ou latino	2 (3,2)	3 (15,0)	5 (6,1)
	Não hispanico ou latino	41 (66,1)	17 (85,0)	58 (70,7)
	Desconhecido	19 (30,6)	0 (0)	19 (23,2)
Raça, n (%)	Americano nativo/nativo do Alasca	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Asiático	1 (1,6)	1 (5,0)	2 (2,4)
	Negro ou afro-americano	17 (27,4)	0 (0)	17 (20,7)
	Nativo do Havai/das ilhas do Pacífico	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Caucasiano	37 (59,7)	18 (90,0)	55 (67,1)
	Outra	0 (0)	1 (5,0)	1 (1,2)
	Desconhecido	7 (11,3)	0 (0)	7 (8,5)
Tipo de órgão, n (%)	Rim	25 (40,3)	--	--
	Fígado	15 (24,2)	--	--
	Pulmão	10 (16,1)	--	--
	Coração	12 (19,4)	--	--

Tabela 26: Características demográficas e clínicas na linha de base dos doentes avaliáveis gerais e por tipo de transplante (*continua*)

Caraterísticas		RTOS	RTCEH	Todos
Tipo de células estaminais, n	Alogénicas	--	18 (90,0)	--
	Autólogas	--	2 (10,0)	--
Estado serológico de CMV, n (%)	Dador positivo/Recetor negativo	34 (54,8)	3 (15,0)	37 (45,1)
	Dador negativo/Recetor positivo	6 (9,7)	8 (40,0)	14 (17,1)
	Dador positivo/Recetor positivo	22 (35,5)	9 (45,0)	31 (37,8)
Em terapêutica antiviral para		50 (80,6)	13 (65,0)	63 (76,8)
Dias de terapêutica antiviral				
	n	41	12	53
	Média	13,6	13,3	13,5
	Mediana	11	9,5	11
	Mínima	1	1	1
	Máxima	47	45	47

RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, DP=desvio padrão, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

No estudo prospetivo, foram colhidas 365 amostras de plasma de 82 doentes avaliáveis. Além disso, foram obtidas 261 amostras congeladas residuais de fornecedores de espécimes clínicos. Das 626 amostras clínicas de plasma (ou seja, amostras colhidas no estudo prospetivo e amostras congeladas residuais combinadas), 597 amostras clínicas de plasma emparelhadas (ou seja, com um resultado válido quer no Aptima CMV Quant assay, quer no teste aprovado) foram incluídas nas análises de concordância. Das 597 amostras clínicas emparelhadas, 339 amostras foram colhidas no estudo prospetivo e 258 eram amostras congeladas residuais. Foram efetuadas, separadamente, análises de concordância nas 181 amostras emparelhadas colhidas dos doentes após terem iniciado a terapêutica antiviral para CMV como parte dos seus cuidados de rotina durante o estudo prospetivo.

A Tabela 27 mostra a análise de concordância e a percentagem de concordância entre o Aptima CMV Quant assay e o teste aprovado em diferentes limiares (geral e por grupo de transplante). A análise de concordância em diferentes intervalos de carga viral (geral e por grupo de transplante) é apresentada na Tabela 28. Quatro em 597 resultados gerais foram observados como sendo discrepantes em mais do que a categoria imediatamente adjacente, dos quais 3 eram de RTCEH.

Tabela 27: Análise de concordância e percentagem de concordância em diferentes limiares (geral e por grupo de transplante)

Limiar de grupo de transplante	N <sup>a</sup>	Resultados do teste comparador <sup>b</sup> e do Aptima CMV Quant				PPA % (n/N) [CI de 95%] <sup>c</sup>	NPA % (n/N) [CI de 95%] <sup>c</sup>
		Comp≥ ACMV≥	Comp< ACMV≥	Comp< ACMV<	Comp≥ ACMV<		
Geral							
TND	597	427	13	136	21	95,3 (427/448) [92,9, 96,9]	91,3 (136/149) [85,6, 94,8]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL (137 UI/mL) <sup>d</sup>	597	252	48	295	2	99,2 (252/254) [97,2, 99,8]	86,0 (295/343) [81,9, 89,3]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	597	158	37	397	5	96,9 (158/163) [93,0, 98,7]	91,5 (397/434) [88,5, 93,8]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	597	93	20	483	1	98,9 (93/94) [94,2, 99,8]	96,0 (483/503) [93,9, 97,4]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	597	45	12	540	0	100 (45/45) [92,1, 100]	97,8 (540/552) [96,2, 98,8]
RTOS							
TND	403	295	9	85	14	95,5 (295/309) [92,5, 97,3]	90,4 (85/94) [82,8, 94,9]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL (137 UI/mL) <sup>d</sup>	403	197	26	178	2	99,0 (197/199) [96,4, 99,7]	87,3 (178/204) [82,0, 91,2]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	403	129	25	245	4	97,0 (129/133) [92,5, 98,8]	90,7 (245/270) [86,7, 93,6]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	403	78	16	308	1	98,7 (78/79) [93,2, 99,8]	95,1 (308/324) [92,1, 96,9]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	403	41	10	352	0	100 (41/41) [91,4, 100]	97,2 (352/362) [95,0, 98,5]
RTCEH							
TND	194	132	4	51	7	95,0 (132/139) [90,0, 97,5]	92,7 (51/55) [82,7, 97,1]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL (137 UI/mL) <sup>d</sup>	194	55	22	117	0	100 (55/55) [93,5, 100]	84,2 (117/139) [77,2, 89,3]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	194	29	12	152	1	96,7 (29/30) [83,3, 99,4]	92,7 (152/164) [87,6, 95,8]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	194	15	4	175	0	100 (15/15) [79,6, 100]	97,8 (175/179) [94,4, 99,1]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	194	4	2	188	0	100 (4/4) [51,0, 100]	98,9 (188/190) [96,2, 99,7]

ACMV=Aptima CMV Quant assay, CI=intervalo de confiança, Comp=ensaio comparador, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, NPA=percentagem de concordância negativa, PPA=percentagem de concordância positiva, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos, TND=alvo não detetado

**Notas:**

≥: O resultado é maior ou igual ao valor do limiar indicado

<: O resultado é menor do que o valor do limiar indicado

PPA resume resultados maiores ou iguais ao limiar indicado; NPA resume resultados menores do que o limiar indicado.

<sup>a</sup> Número de amostras clínicas emparelhadas (amostras colhidas no estudo prospetivo e amostras congeladas residuais obtidas de fornecedores de espécimes clínicos combinadas).

<sup>b</sup> teste aprovado

<sup>c</sup> CI da pontuação

<sup>d</sup> LLoQ de um teste aprovado alternativo

Tabela 28: Análise de concordância em diferentes intervalos de carga viral (geral e por grupo de transplante)

Resultado do Aptima CMV assay por grupo de transplante	Resultado do ensaio comparador <sup>b</sup> (log <sub>10</sub> UI/mL)						
	Total <sup>a</sup> , N	TND	Detetado, <2,1	≥2,1 a <2,7	≥2,7 a <3,3	≥3,3 a <3,9	≥3,9
<b>Geral</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	597	149	194	91	69	49	45
TND	157	136	21	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	140	13	125	2	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	105	0	46	54	5	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	82	0	2 <sup>d</sup>	34	45	1	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	56	0	0	1 <sup>d</sup>	18	37	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	57	0	0	0	1 <sup>d</sup>	11	45
<b>RTOS</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	403	94	110	66	54	38	41
TND	99	85	14	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	81	9	70	2	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	69	0	26	39	4	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	60	0	0	25	34	1	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	43	0	0	0	15	28	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	51	0	0	0	1 <sup>d</sup>	9	41
<b>RTCEH</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	194	55	84	25	15	11	4
TND	58	51	7	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	59	4	55	0	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	36	0	20	15	1	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	22	0	2 <sup>d</sup>	9	11	0	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	13	0	0	1 <sup>d</sup>	3	9	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	6	0	0	0	0	2	4

RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos, TND=alvo não detetado

<sup>a</sup>Número de amostras clínicas emparelhadas (amostras colhidas no estudo prospetivo e amostras congeladas residuais obtidas de fornecedores de espécimes clínicos combinadas).

<sup>b</sup>teste aprovado

<sup>c</sup>LLoQ de um teste aprovado alternativo

<sup>d</sup>4 em 597 resultados gerais foram observados como sendo discrepantes em mais do que a categoria imediatamente adjacente; 1 de 4 era de um RTOS e 3 de 4 eram de RTCEH. Dos 2 RTCEH submetidos a testes com um NAAT alternativo, 1 estava em concordância com os resultados do Aptima CMV Quant assay.



Tabela 29 mostra a análise de concordância e a percentagem de concordância em diferentes limiares (geral e por grupo de transplante) para amostras colhidas dos pacientes após terem iniciado a terapêutica antiviral para CMV como parte dos cuidados de rotina no estudo prospetivo. A análise de concordância em diferentes intervalos de carga viral utilizando todos os pontos temporais após o início do tratamento combinados (geral e por grupo de transplante) é apresentada na Tabela 30. Um em 181 resultados gerais foram observados como sendo discrepantes em mais do que a categoria imediatamente adjacente, observado num RTOS.

Tabela 29: Análise de concordância e percentagem de concordância em diferentes limiares utilizando todos os pontos temporais após o início do tratamento combinados (geral e por grupo de transplante)

Limiar de grupo de transplante	N <sup>a</sup>	Resultados do teste comparador <sup>b</sup> e do Aptima CMV Quant				PPA % (n/N) [CI de 95%] <sup>c</sup>	NPA % (n/N) [CI de 95%] <sup>c</sup>
		Comp≥ ACMV≥	Comp< ACMV≥	Comp< ACMV<	Comp≥ ACMV<		
Geral							
TND	181	121	4	47	9	93,1 (121/130) [87,4, 96,3]	92,2 (47/51) [81,5, 96,9]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL (137 UI/mL) <sup>d</sup>	181	69	15	97	0	100 (69/69) [94,7, 100]	86,6 (97/112) [79,1, 91,7]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	181	42	9	129	1	97,7 (42/43) [87,9, 99,6]	93,5 (129/138) [88,1, 96,5]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	181	23	5	153	0	100 (23/23) [85,7, 100]	96,8 (153/158) [92,8, 98,6]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	181	12	3	166	0	100 (12/12) [75,8, 100]	98,2 (166/169) [94,9, 99,4]
RTOS							
TND	136	102	2	26	6	94,4 (102/108) [88,4, 97,4]	92,9 (26/28) [77,4, 98,0]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL (137 UI/mL) <sup>a</sup>	136	57	15	64	0	100 (57/57) [93,7, 100]	81,0 (64/79) [71,0, 88,1]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	136	34	8	93	1	97,1 (34/35) [85,5, 99,5]	92,1 (93/101) [85,1, 95,9]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	136	18	5	113	0	100 (18/18) [82,4, 100]	95,8 (113/118) [90,5, 98,2]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	136	10	3	123	0	100 (10/10) [72,2, 100]	97,6 (123/126) [93,2, 99,2]
RTCEH							
TND	45	19	2	21	3	86,4 (19/22) [66,7, 95,3]	91,3 (21/23) [73,2, 97,6]
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL	45	12	0	33	0	100 (12/12) [75,8, 100]	100 (33/33) [89,6, 100]
2,7 log <sub>10</sub> UI/mL (500 UI/mL)	45	8	1	36	0	100 (8/8) [67,6, 100]	97,3 (36/37) [86,2, 99,5]
3,3 log <sub>10</sub> UI/mL (1800 UI/mL)	45	5	0	40	0	100 (5/5) [56,6, 100]	100 (40/40) [91,2, 100]
3,9 log <sub>10</sub> UI/mL (7943,3 UI/mL)	45	2	0	43	0	100 (2/2) [34,2, 100]	100 (43/43) [91,8, 100]

ACMV=Aptima CMV Quant assay, CI=intervalo de confiança, Comp=ensaio comparador, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, NPA=percentagem de concordância negativa, PPA=percentagem de concordância positiva, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos, TND=alvo não detetado

**Notas:**

- ≥: O resultado é maior ou igual ao valor do limiar indicado
- <: O resultado é menor do que o valor do limiar indicado
- PPA resume resultados maiores ou iguais ao limiar indicado; NPA resume resultados menores do que o limiar indicado.

<sup>a</sup> Número de amostras emparelhadas que foram colhidas de doentes que estavam a receber terapêutica antiviral para CMV na inclusão ou que iniciaram a terapêutica antiviral para CMV durante o estudo prospetivo.

<sup>b</sup> teste aprovado

<sup>c</sup> CI da pontuação

<sup>d</sup> LLoQ de um teste aprovado alternativo

Tabela 30: Análise de concordância em diferentes intervalos de carga viral utilizando todos os pontos temporais após o início do tratamento combinados (geral e por grupo de transplante)

Resultado do Aptima CMV Quant por grupo de transplante	Resultado do ensaio comparador <sup>b</sup> (log <sub>10</sub> UI/mL)						
	Total <sup>a</sup> , N	TND	Detetado, <2,1	≥2,1 a <2,7	≥2,7 a <3,3	≥3,3 a <3,9	≥3,9
<b>Geral</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	181	51	61	26	20	11	12
TND	56	47	9	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	41	4	37	0	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	33	0	15	17	1	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	23	0	0	9	14	0	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	13	0	0	0	4	9	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	15	0	0	0	1 <sup>d</sup>	2	12
<b>RTOS</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	136	28	51	22	17	8	10
TND	32	26	6	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	32	2	30	0	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	30	0	15	14	1	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	19	0	0	8	11	0	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	10	0	0	0	4	6	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	13	0	0	0	1 <sup>d</sup>	2	10
<b>RTCEH</b>							
Número total de amostras emparelhadas, N	45	23	10	4	3	3	2
TND	24	21	3	0	0	0	0
Detetado, <2,1 log <sub>10</sub> UI/mL <sup>c</sup>	9	2	7	0	0	0	0
≥2,1 a <2,7 log <sub>10</sub> UI/mL	3	0	0	3	0	0	0
≥2,7 a <3,3 log <sub>10</sub> UI/mL	4	0	0	1	3	0	0
≥3,3 a <3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	3	0	0	0	0	3	0
≥3,9 log <sub>10</sub> UI/mL	2	0	0	0	0	0	2

RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos, TND=alvo não detetado

<sup>a</sup> Número de amostras emparelhadas que foram colhidas de pacientes que estavam a receber terapêutica antiviral para CMV na inclusão ou que iniciaram a terapêutica antiviral para CMV durante o estudo prospetivo.

<sup>b</sup> ensaio aprovado

<sup>c</sup> LLoQ de um teste aprovado alternativo

<sup>d</sup> 1 em 181 resultados gerais foram observados como sendo discrepantes em mais do que a categoria imediatamente adjacente.

## Comparação de métodos

O estudo de comparação de métodos foi realizado para avaliar o desempenho do Aptima CMV Quant assay em comparação com um teste aprovado. Nas análises de comparação de métodos, foi incluído um total de 309 amostras clínicas CMV positivas emparelhadas compostas por 165 amostras colhidas no estudo prospectivo e 144 amostras congeladas residuais com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios. Além disso, foi preparado um total de 105 amostras artificiais adicionando vírus CMV em cultura a plasma EDTA CMV negativo, das quais 103 estavam no intervalo linear comum para ambos os ensaios. As amostras artificiais foram analisadas separadamente.

A Tabela 31 apresenta as estimativas dos parâmetros da regressão de Deming ( $\log_{10}$  UI/mL). Da Figura 15 à Figura 18 é apresentada a regressão de Deming dos resultados de carga viral ( $\log_{10}$  UI/mL) do Aptima CMV Quant assay e do teste aprovado.

Tabela 31: Estimativas dos parâmetros da regressão de Deming por tipo de amostra e grupo de transplante

Tipo de amostra	Grupo de transplante	Unidade da carga viral	Parâmetro	N <sup>a</sup>	Estimativa	Método de Jackknife <sup>b</sup>		Método de Bootstrap <sup>c</sup>		r
						EP	CI de 95%	EP	CI de 95%	
Clínica	Geral	$\log_{10}$ UI/mL	Interceção	309	0,20	0,038	(0,12, 0,27)	0,021	(0,15, 0,24)	0,97
			Inclinação							
	RTOS	$\log_{10}$ UI/mL	Interceção	227	0,17	0,043	(0,09, 0,26)	0,025	(0,12, 0,22)	0,98
			Inclinação							
	RTCEH	$\log_{10}$ UI/mL	Interceção	82	0,16	0,101	(-0,04, 0,36)	0,048	(0,07, 0,26)	0,95
			Inclinação							
Artificial	n/d	$\log_{10}$ UI/mL	Interceção	103	0,06	0,058	(-0,05, 0,18)	0,059	(-0,05, 0,18)	1,00
			Inclinação							

CI=intervalo de confiança, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, r=coeficiente de correlação, EP=erro padrão, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

<sup>a</sup> Número de amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios.

<sup>b</sup> Independência assumida entre todas as amostras; método de Jackknife utilizado para estimar o EP e o CI.

<sup>c</sup> As amostras clínicas foram ajustadas para a correlação entre pacientes utilizando o método de nova amostragem de Bootstrap com 500 iterações; este método também foi utilizado para amostras artificiais, mas sem estratificação por paciente.

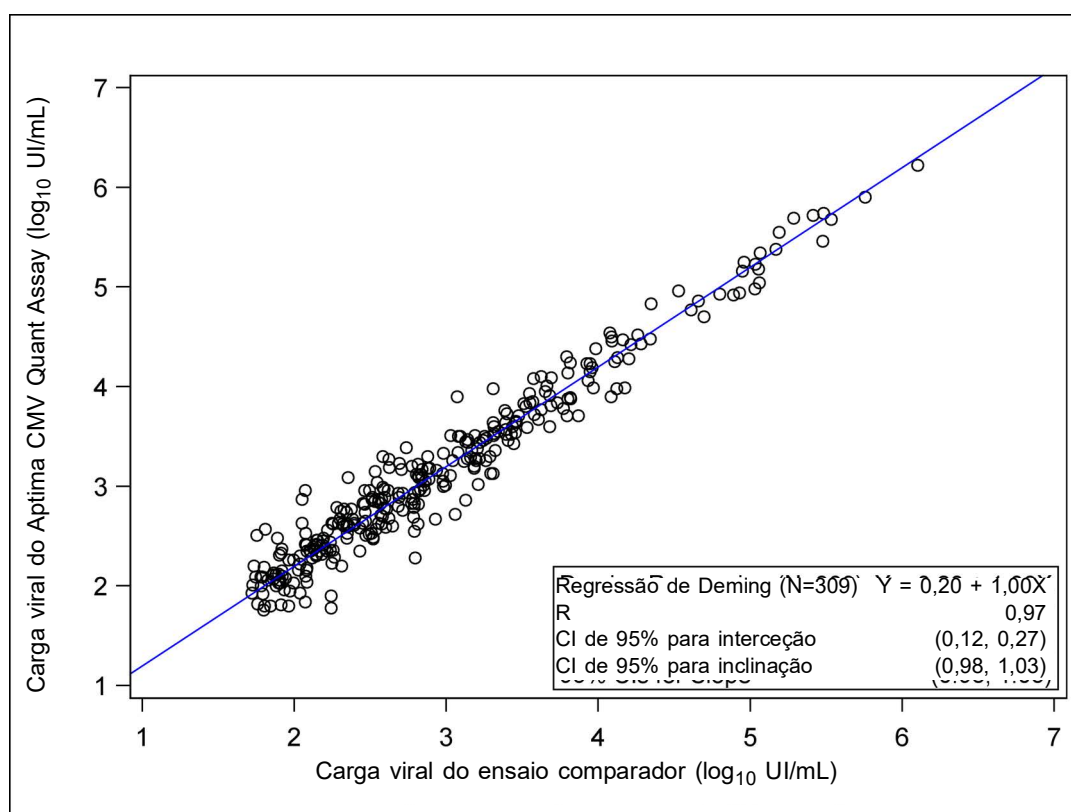
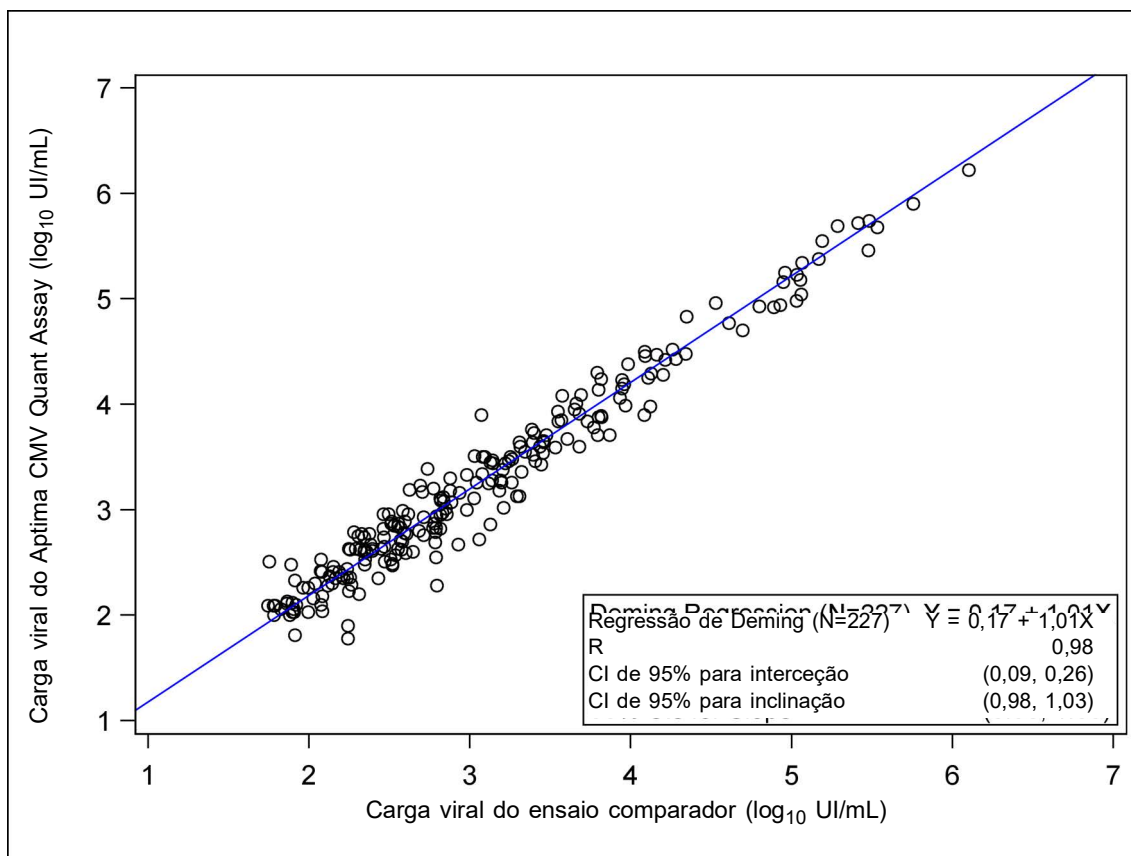


Figura 15. Gráfico da regressão linear de Deming (amostras clínicas: RTOS e RTCEH combinadas)

CI=intervalo de confiança, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, R=coeficiente de correlação, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

**Notas:**

- Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.
- O modelo de regressão de Deming assume a independência entre todas as amostras; método de Jackknife utilizado para estimar os CI.

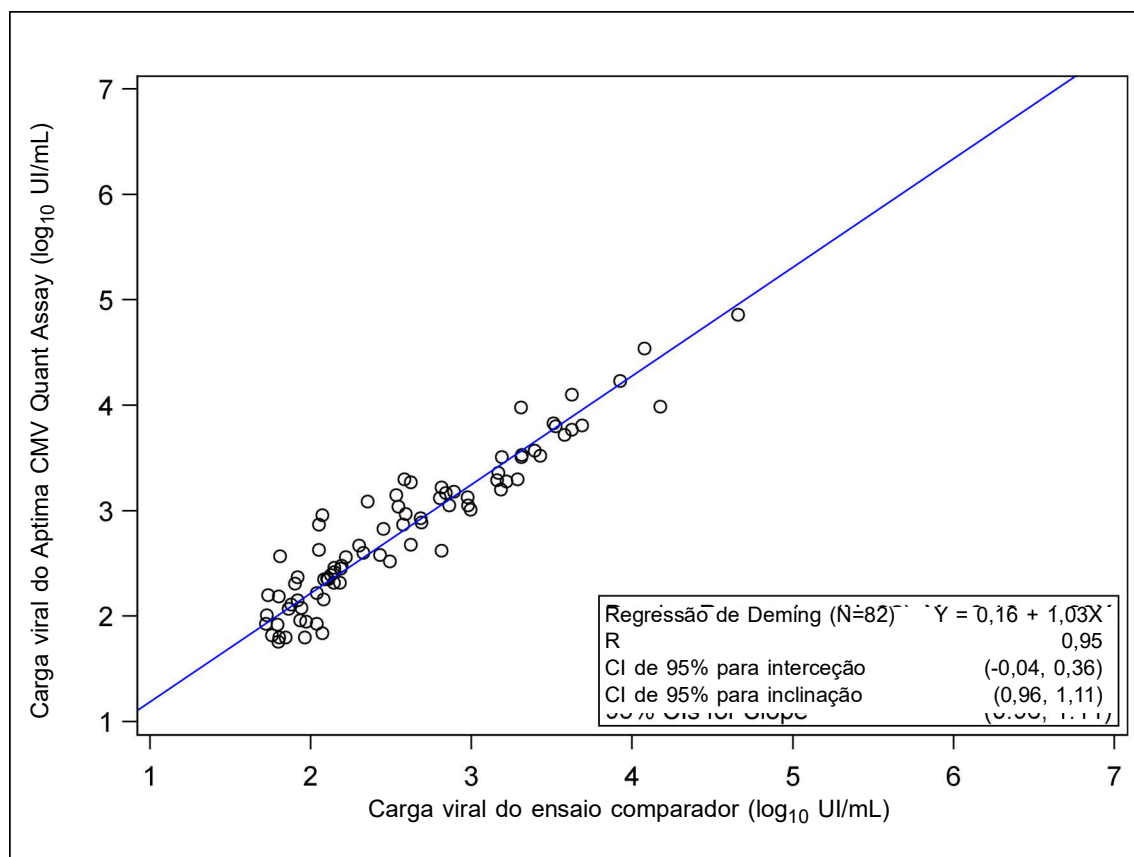


**Figura 16. Gráfico da regressão linear de Deming de cargas virais (amostras clínicas: apenas RTOS)**

CI=intervalo de confiança, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos, R=coeficiente de correlação

**Notas:**

- Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.
- O modelo de regressão de Deming assume a independência entre todas as amostras; método de Jackknife utilizado para estimar os CI.

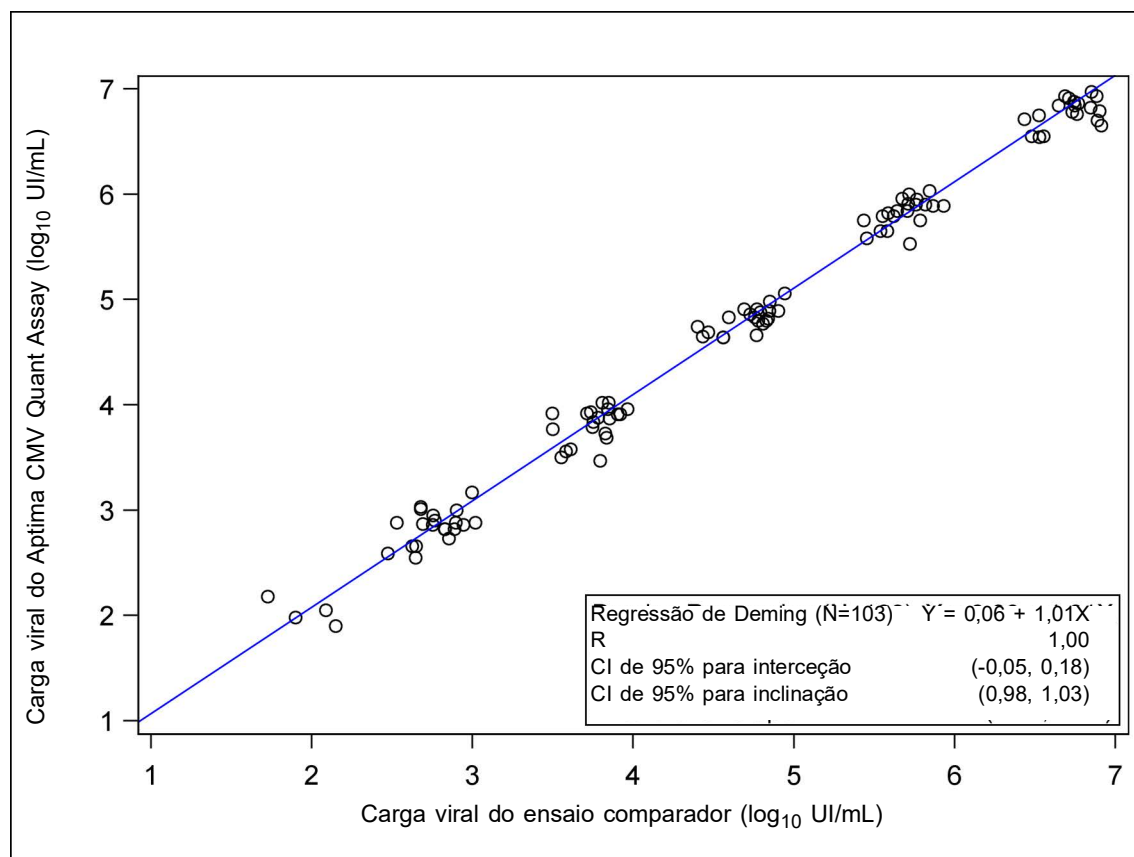


**Figura 17. Gráfico da regressão linear de Deming de cargas virais (amostras clínicas: apenas RTCEH)**

CI=intervalo de confiança, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, R=coeficiente de correlação

**Notas:**

- Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.
- O modelo de regressão de Deming assume a independência entre todas as amostras; método de Jackknife utilizado para estimar os CI.



**Figura 18. Gráfico da regressão linear de Deming de cargas virais (amostras artificiais)**

CI=intervalo de confiança, R=coeficiente de correlação

**Notas:**

- Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.
- O modelo de regressão de Deming assume a independência entre todas as amostras; método de Jackknife utilizado para estimar os CI.

**Diferença emparelhada média**

A Tabela 32 abaixo apresenta a diferença emparelhada média entre o Aptima CMV Quant assay e o teste aprovado em intervalos de decisão representativos.

Tabela 32: Média das diferenças de carga viral emparelhada em intervalos de decisão representativos por tipo de amostra e grupo de transplante

Tipo de amostra	Grupo de transplante	Intervalos de decisão representativos <sup>a</sup> (log <sub>10</sub> UI/mL)	Número total de amostras emparelhadas <sup>b</sup> (N)	Média (EP)	CI de 95%
Clínica	Geral	Todos	254	0,20 (0,012)	(0,17, 0,22)
		≥2,1 a <3,0	129	0,21 (0,018)	(0,18, 0,25)
		≥3,0 a <4,0	87	0,19 (0,021)	(0,15, 0,23)
		≥4,0 a <5,0	24	0,17 (0,039)	(0,09, 0,25)
		≥5,0	14	0,18 (0,037)	(0,10, 0,26)
	RTOS	Todos	199	0,18 (0,014)	(0,16, 0,21)
		≥2,1 a <3,0	95	0,19 (0,021)	(0,14, 0,23)
		≥3,0 a <4,0	69	0,18 (0,024)	(0,13, 0,23)
		≥4,0 a <5,0	21	0,17 (0,038)	(0,09, 0,25)
		≥5,0	14	0,18 (0,037)	(0,10, 0,26)
	RTCEH	Todos	55	0,26 (0,026)	(0,20, 0,31)
		≥2,1 a <3,0	34	0,29 (0,034)	(0,22, 0,36)
		≥3,0 a <4,0	18	0,22 (0,039)	(0,13, 0,30)
		≥4,0 a <5,0	3	0,16 (0,188)	(-0,65, 0,97)
		≥5,0	0	NC (NC)	NC
Artificial	n/d	Todos	100	0,08 (0,014)	(0,05, 0,11)
		≥2,1 a <3,0	20	0,07 (0,037)	(0,00, 0,15)
		≥3,0 a <4,0	21	0,05 (0,036)	(-0,03, 0,12)
		≥4,0 a <5,0	20	0,10 (0,025)	(0,04, 0,15)
		≥5,0	39	0,10 (0,022)	(0,06, 0,14)

CI=intervalo de confiança, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, NC=não calculável, EP=erro padrão, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

<sup>a</sup> As amostras emparelhadas são atribuídas a intervalos de decisão com base no resultado do teste aprovado.

<sup>b</sup> Número de amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios.



### Desvio sistemático em níveis de carga viral selecionados

A Tabela 33 abaixo apresenta o desvio sistemático entre o Aptima CMV Quant assay e o teste aprovado em cinco níveis de carga viral selecionados de 2,1 log<sub>10</sub> UI/mL a 7,0 log<sub>10</sub> UI/mL com equivalentes não transformados associados.

Tabela 33: Desvio sistemático/diferença sistemática em níveis de carga viral selecionados por tipo de amostra e grupo de transplante

Tipo de amostra	Grupo de transplante	Níveis de carga viral selecionados log <sub>10</sub> UI/mL (UI/mL)	Diferença sistemática <sup>a</sup> log <sub>10</sub> UI/mL (UI/mL)
Clínica	Geral	2,1 (137)	0,20 (1797,1)
		2,7 (500)	0,20 (1948,2)
		3,3 (1800)	0,21 (2489,1)
		3,9 (7943,3)	0,21 (5045,3)
		7,0 (10000000)	0,22 (4162789,2)
	RTOS	2,1 (137)	0,18 (2251,8)
		2,7 (500)	0,19 (2402,4)
		3,3 (1800)	0,19 (2941,7)
		3,9 (7943,3)	0,19 (5490,5)
		7,0 (10000000)	0,21 (4151107,2)
	RTCEH	2,1 (137)	0,23 (180,1)
		2,7 (500)	0,25 (430,5)
		3,3 (1800)	0,27 (1327,2)
		3,9 (7943,3)	0,29 (5564,7)
		7,0 (10000000)	0,40 (6897935,4)
Artificial	n/d	2,1 (137)	0,07 (33420,4)
		2,7 (500)	0,08 (33467,9)
		3,3 (1800)	0,08 (33638,0)
		3,9 (7943,3)	0,08 (34442,0)
		7,0 (10000000)	0,10 (1342167,4)

RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

<sup>a</sup>A diferença sistemática é a diferença entre a variável do resultado (Y) e a carga viral (X) derivada em cada um dos níveis de carga viral selecionados utilizando estimativas da regressão de Deming para inclinação e interseção.

**Diferença total permitida (ATD)**

A Tabela 34 juntamente com a Figura 19 à Figura 22 abaixo apresentam os resultados da ATD utilizando diferenças emparelhadas entre o Aptima CMV Quant assay e o teste aprovado versus a sua média em limiares representativos e a percentagem de resultados emparelhados na zona de ATD.

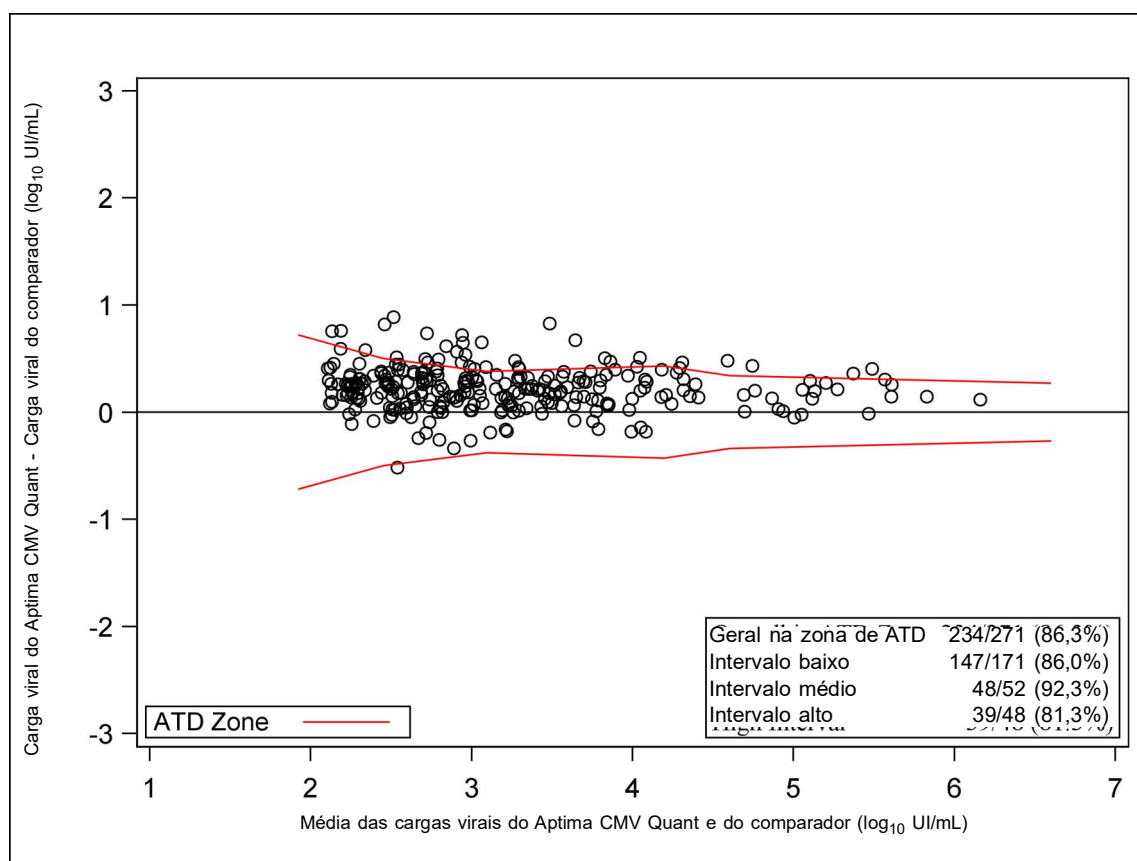
*Tabela 34: Percentagem de diferenças de amostras emparelhadas dentro da zona de diferença total permitida (ATD) em diferentes intervalos de carga viral por tipo de amostra e grupo de transplante*

Tipo de amostra	Grupo de transplante	Intervalos de carga viral <sup>a</sup> (log <sub>10</sub> UI/mL)	N <sup>b</sup>	Diferenças de amostras emparelhadas dentro da zona de ATD				
				n (%)	Percentis			
					2,5%	5%	95%	97,5%
Clínica	Geral	Todos	271	234 (86,3)	-0,19	-0,14	0,40	0,42
		Baixo (≥2,1 a <3,3)	171	147 (86,0)	-0,24	-0,16	0,41	0,44
		Médio (≥3,3 a <3,9)	52	48 (92,3)	-0,08	-0,08	0,38	0,38
		Alto (≥3,9 a <7)	48	39 (81,3)	-0,18	-0,18	0,37	0,40
	RTOS	Todos	207	183 (88,4)	-0,19	-0,14	0,40	0,42
		Baixo (≥2,1 a <3,3)	123	109 (88,6)	-0,26	-0,18	0,41	0,44
		Médio (≥3,3 a <3,9)	40	38 (95,0)	-0,16	-0,08	0,38	0,40
		Alto (≥3,9 a <7)	44	36 (81,8)	-0,18	-0,14	0,37	0,40
	RTCEH	Todos	64	51 (79,7)	-0,18	0,01	0,38	0,41
		Baixo (≥2,1 a <3,3)	48	38 (79,2)	-0,19	0,01	0,41	0,45
		Médio (≥3,3 a <3,9)	12	10 (83,3)	0,09	0,09	0,32	0,32
		Alto (≥3,9 a <7)	4	3 (75,0)	-0,18	-0,18	0,31	0,31
Artificial	n/d	Todos	99	96 (97,0)	-0,19	-0,14	0,29	0,34
		Baixo (≥2,1 a <3,3)	20	20 (100)	-0,14	-0,13	0,35	0,35
		Médio (≥3,3 a <3,9)	14	13 (92,9)	-0,32	-0,32	0,27	0,27
		Alto (≥3,9 a <7)	65	63 (96,9)	-0,19	-0,11	0,24	0,29

RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

<sup>a</sup>As amostras emparelhadas são atribuídas a intervalos de decisão com base no resultado do teste aprovado.

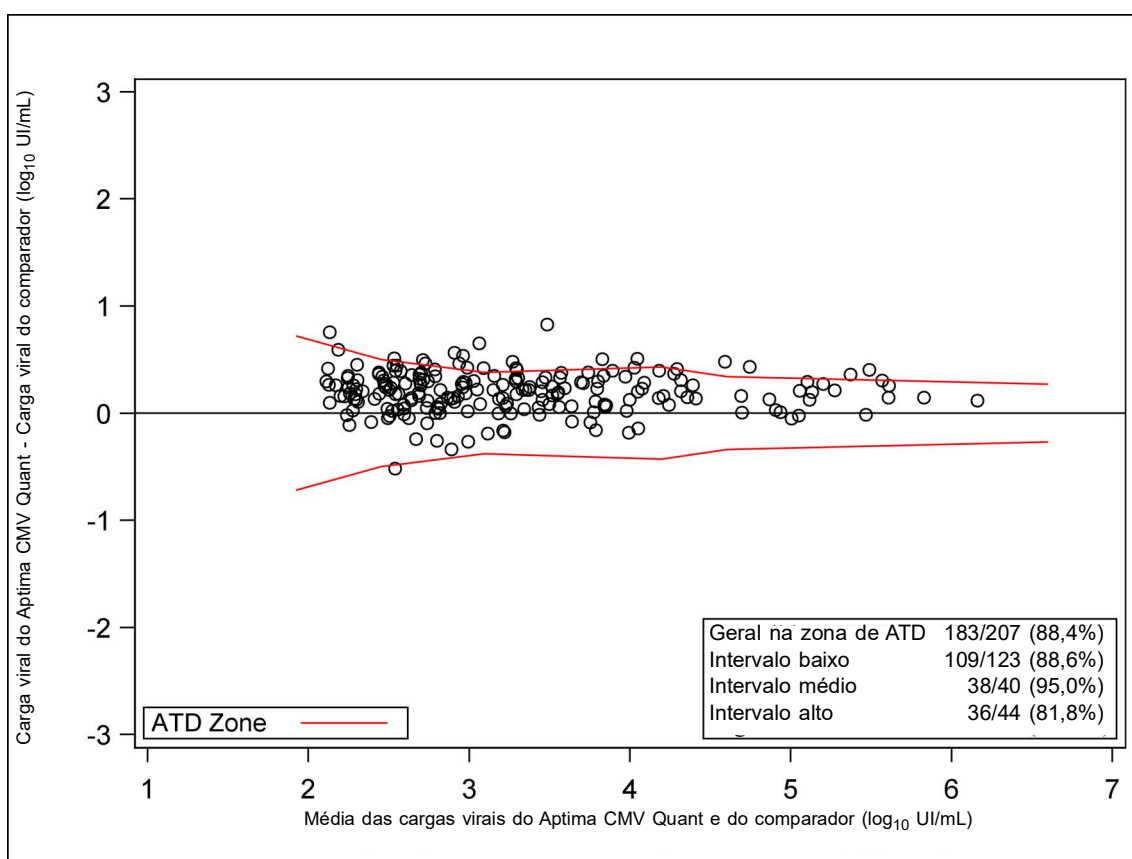
<sup>b</sup>Número de amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios.



**Figura 19. Gráfico da diferença das amostras emparelhadas e da zona de ATD (amostras clínicas: RTOS e RTCEH combinadas)**

ATD=diferença total permitida, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

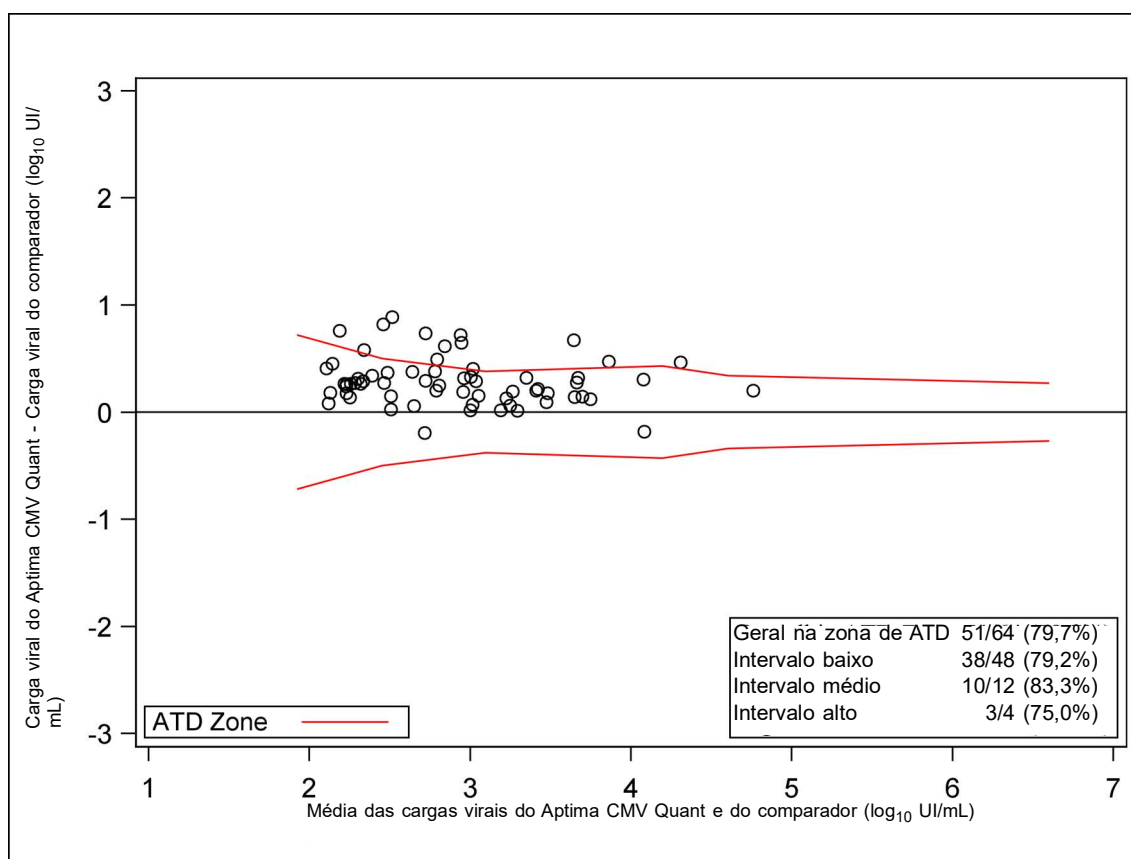
**Nota:** Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.



**Figura 20. Gráfico da diferença das amostras emparelhadas e da zona de ATD (amostras clínicas: apenas RTOS)**

ATD=diferença total permitida, RTOS=recetores de transplantes de órgãos sólidos

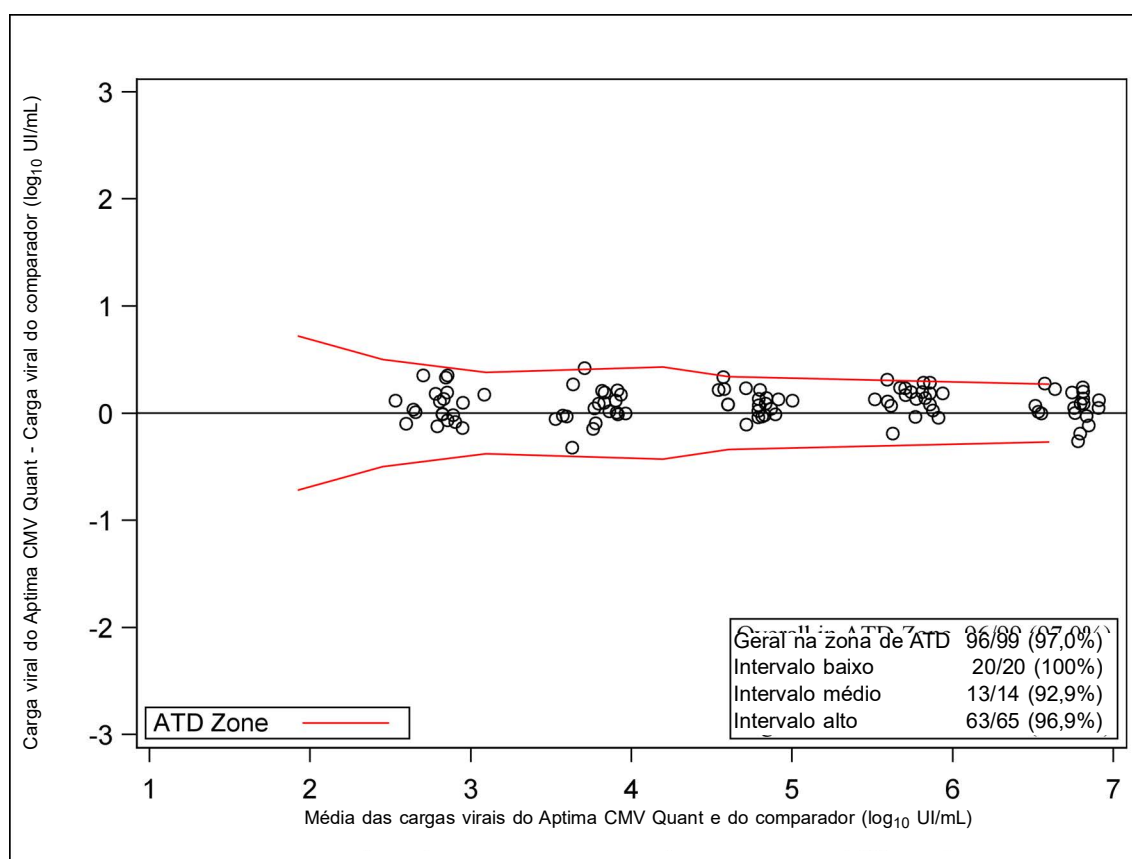
**Nota:** Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.



**Figura 21. Gráfico da diferença das amostras emparelhadas e da zona de ATD (amostras clínicas: apenas RTCEH)**

ATD=diferença total permitida, RTCEH=recetores de transplantes de células estaminais hematopoéticas

**Nota:** Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.



**Figura 22. Gráfico da diferença das amostras emparelhadas e da zona de ATD (amostras artificiais)**

ATD=diferença total permitida

**Nota:** Amostras emparelhadas com resultados no intervalo linear comum para ambos os ensaios incluídas.

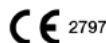
## Bibliografia

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, 3<sup>rd</sup> 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, 1<sup>st</sup> 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, 3<sup>rd</sup> 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

## Informações de contacto e histórico de revisões



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



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

**Australian Sponsor**  
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](http://www.hologic.com/support).

Incidentes graves que ocorram em relação ao dispositivo na União Europeia devem ser comunicados ao fabricante e à autoridade competente do Estado Membro onde o utilizador e/ou paciente reside.

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

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

Este produto pode estar abrangido por uma ou mais das seguintes patentes nos EUA identificadas em [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).

© 2021-2024 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-27747-601 Rev. 002

2024-06

Histórico de revisão	Data	Descrição
AW-27747 Rev. 001	Junho de 2023	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criação das Instruções de utilização do Aptima CMV Quant assay AW-27747 Rev. 001 com base em AW-25509 Rev. 003 para conformidade regulamentar com o IVDR.</li> <li>• Adicionado o Resumo de segurança e desempenho</li> <li>• Atualização das Informações gerais</li> <li>• Atualização das Informações sobre riscos.</li> <li>• Atualizadas as secções de Desempenho analítico e a tabela de Materiais fornecidos</li> <li>• Adicionado Desempenho clínico: Concordância clínica, Comparação de métodos, Diferença emparelhada média, Desvio sistemático em níveis de carga viral selecionados e Diferença total permitida (ATD).</li> <li>• Atualização de informações de contacto incluindo: Representante na CE, marcação CE, informações do representante australiano e suporte técnico.</li> <li>• Diversas atualizações de estilo e formatação.</li> </ul>
AW-27747 Rev. 002	Junho de 2024	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revisto para incorporar o fluxo de trabalho de diluição de espécimes de plasma</li> <li>• Secções atualizadas apresentadas abaixo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Advertências e precauções</li> <li>• Colheita e conservação de espécimes</li> <li>• Materiais necessários, mas disponíveis separadamente</li> <li>• Procedimento de teste no Panther System</li> <li>• Interpretação dos resultados</li> <li>• Especificidade analítica</li> </ul> </li> </ul>