

Aptima™ HCV Quant Dx Assay

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

Apenas para exportação pelos EUA.

Informações gerais	2
Utilização prevista	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	3
Advertências e precauções	4
Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes	7
Colheita e conservação de espécimes	8
Amostras dentro do Panther System	11
Transporte de espécimes	11
Panther System	12
Reagentes e materiais fornecidos	12
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente	14
Materiais opcionais	15
Procedimento de teste no Panther System	15
Notas sobre o procedimento	20
Controlo de qualidade	21
Calibração do ensaio	21
Controlos negativo e positivo	21
Calibrador interno/controlo interno	21
Interpretação dos resultados	22
Limitações	23
Desempenho	24
Limite de detecção (Limit of Detection, LOD) utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS	24
Limite de detecção em vários genótipos do HCV	25
Intervalo linear	26
Linearidade nos vários genótipos do HCV	27
Limite inferior de quantificação utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS	27
Determinação do Limite inferior de quantificação (LLOQ) em vários genótipos do HCV	29
Precisão	31
Substâncias potencialmente interferentes	31
Especificidade	33
Especificidade analítica	34
Amostras clínicas contendo vírus que não o HCV	35
Reprodutibilidade de espécimes clínicos	35
Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes	36
Correlação de métodos	38
Concordância do diagnóstico	38
Contaminação por transferência	39
Painel de seroconversão	39
Bibliografia	40

Informações gerais

Utilização prevista

O Aptima HCV Quant Dx Assay é um teste de amplificação mediado por transcrição em tempo real. Este ensaio é utilizado para detecção e quantificação do RNA do vírus da hepatite C (HCV) em soro e plasma humano fresco e congelado em pessoas infectadas com HCV.

O plasma pode ser preparado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), solução de anticoagulante de citrato e dextrose (ACD) e tubos de preparação de plasma (PPT). O soro pode ser preparado em tubos de soro e tubos de separador de soro (SST). Os espécimes são testados utilizando o Panther System para processamento, amplificação, detecção e quantificação automatizados de espécimes. Os espécimes contendo genótipos de HCV 1 a 6 são validados para detecção e quantificação no ensaio.

O Aptima HCV Quant Dx Assay é indicado para utilização como um auxiliar no diagnóstico da infecção de HCV. O ensaio pode ser utilizado para confirmar a infecção de HCV activa em pacientes com um resultado positivo de anticorpos de HCV. A detecção de RNA de HCV indica que o vírus se está a replicar e, por isso, é sinal de infecção activa.

O Aptima HCV Quant Dx Assay é indicado para utilização como um auxiliar no controlo de pacientes infectados com HCV que estão a seguir a terapia de medicamentos antivirais HCV. O ensaio avalia os níveis de RNA de HCV na base, durante e após o tratamento para determinar a resposta virológica prolongada (SVR). Os resultados do Aptima HCV Quant Dx Assay devem ser interpretados no contexto de todas as descobertas relevantes clínicas e laboratoriais.

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

Resumo e explicação do teste

O HCV é um patogénico existente no sangue e um problema para a saúde pública em todo o mundo com até 170 milhões de pessoas infectadas globalmente e 350.000 mortes anuais devido às condições relacionadas com HCV, incluindo cirrose e cancro do fígado.^{1,2} A transmissão de HCV é efectuada através da exposição ao sangue, aos derivados do sangue ou a actividades com potencial para exposição percutânea.^{3,4} Geneticamente, o HCV contém genoma de RNA de sentido positivo de aproximadamente 9500 nucleotídeos que codificam as proteínas estruturais (core, glicoproteínas E1 e E2, canais iónicos p7) e proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A/B, NS5A/B), sendo estas últimas, proteínas de replicação viral importante e agentes-alvo de antivirais de acção directa.^{4,5} Duas regiões não traduzidas (UTR) do genoma, 5'UTR e 3'UTR, funcionam na tradução do genoma e nas tarefas de replicação/acondicionamento, respectivamente.⁵ A 5'UTR é a região genómica mais altamente conservada entre os seis principais genótipos de HCV.⁶

Clinicamente, há uma elevada prevalência de infecção de HCV assintomática e, apesar dos anticorpos detectáveis (tipicamente no prazo de 5-12 semanas), a infecção crónica de HCV ocorre em até 75% dos pacientes.² Os algoritmos de testes laboratoriais de HCV requerem diagnósticos de infecções de HCV activo em indivíduos positivos com anti-corpos através da detecção de RNA de HCV em plasma ou soro para permitir a ligação apropriada aos cuidados.^{7,8,9}

A quantificação do RNA de HCV (carga viral) tem desempenhado um papel essencial na definição e monitorização do tratamento com sucesso de HCV. A taxa de resposta virológica sustentada (SVR), definida como RNA de HCV não detetado após terapia de sucesso, é um marcador importante para a cura de HCV.^{10,11} Na terapia com interferon, a resposta virológica precoce (EVR), caracterizada por uma redução de 2 log ou mais na carga viral HCV após 12 semanas de terapia, e uma resposta virológica rápida (RVR), caracterizada por níveis não detetáveis de RNA de HCV após 4 semanas de tratamento, demonstraram ser preditores positivos para SVR.^{10,12,13} Estes marcadores de cinética viral são utilizados em abordagens guiadas por respostas que adaptam as opções de tratamento para paragem ou prolongamento da terapia para obtenção de SVR.¹⁴ Além disso, os estudos de seguimento de longo prazo demonstraram durabilidade do SVR após o tratamento com sucesso e a erradicação viral evita a progressão das doenças do fígado.¹⁰

Na era dos antivirais de acção directa (DAAs), são efectuadas avaliações da carga viral de HCV antes da terapia para estabelecer uma carga viral base, durante o tratamento para se obterem as respectivas respostas e após a terapia para avaliação do SVR (ou recaída). Quase todos os pacientes alcançam respostas virológicas a DAAs durante o tratamento definidas abaixo do limite inferior da quantificação (<LLOQ) para o ensaio, seguido por um valor maior que as taxas do SVR de 90% em 12 semanas após a terapia com a maioria dos regimes.^{8,11} A detecção e quantificação do RNA de HCV continuarão a ter um papel fundamental nos diagnósticos de HCV e gestão dos pacientes na terapia antiviral.

Princípios do procedimento

O Aptima HCV Quant Dx Assay é uma amplificação de ácido nucleico que utiliza amplificação mediada por transcrição (TMA) em tempo real para detetar e quantificar o RNA de HCV antes da terapia para diagnósticos auxiliares ou para estabelecer a carga viral básica, bem como para avaliar as respostas, durante e após o tratamento. O ensaio tem como objetivo uma região conservada do genoma HCV, com a detecção e quantificação de génotipos 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Trata-se de um ensaio padrão de acordo com o 2º Padrão Internacional da OMS para o Vírus da Hepatite C (NIBSC Code 96/798).¹²

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

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

A amplificação do alvo ocorre via TMA, que é um método de amplificação de ácidos nucleicos baseado na transcrição que utiliza duas enzimas: a transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina de Moloney) e a polimerase do RNA T7. A transcriptase reversa é utilizada para criar um cópia de DNA (com uma sequência promotora para a polimerase do RNA T7) da sequência-alvo. A polimerase do RNA T7 produz várias cópias do produto de amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA. O Aptima HCV Quant Dx Assay utiliza o método TMA para amplificar uma região da 5'UTR do genoma do HCV. A amplificação destas regiões específicas é conseguida utilizando "primers" específicos que foram concebidos para amplificar os génotipos do HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

A detecção é conseguida utilizando sondas fluorescentes de ácidos nucleicos de cadeia simples que estão presentes durante a amplificação do alvo e que se hibridizam especificamente com o produto da amplificação em tempo real. Cada sonda fluorescente tem um fluoróforo e um agente de extinção. Quando a sonda fluorescente não é hibridizada com o produto da amplificação, o agente de extinção fica em estreita proximidade com o fluoróforo e suprime a fluorescência. Quando a sonda fluorescente se liga ao produto de amplificação, o agente de extinção é ainda mais afastado do fluoróforo e emite um sinal num determinado comprimento de onda quando excitado por uma fonte de luz. À medida que uma maior quantidade de sondas fluorescentes se hibridiza com o produto de 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 HCV. Cada reacção tem um calibrador interno/controlo interno (internal control, IC) que controla as variações do processamento, da amplificação e da detecção de espécimes. A concentração de uma amostra é determinada pelo Panther System Software utilizando os sinais do HCV e do IC para cada reacção e comparando-os com as informações da calibração.

Advertências e precauções

- A. Para reduzir o risco de resultados inválidos, leia atentamente todo o folheto informativo e o *Panther System Operator's Manual* (Manual de instruções do Panther System) antes de executar este ensaio.

Relacionadas com o laboratório



- B. **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 antígeno HIV quando testados com procedimentos licenciados pela Agência dos Medicamentos e Alimentos dos EUA. Além disso, o plasma não é reactivo para 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.^{15,16,17}
- C. Este procedimento só deve ser executado por pessoal com a devida qualificação na utilização do Aptima HCV Quant Dx Assay e no manuseamento de materiais infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfecte imediatamente seguindo os procedimentos adequados do local.
- D. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- E. 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, protecção 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.
- F. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).
- G. Elimine todos os materiais que tenham estado em contacto com espécimes e reagentes de acordo com os regulamentos europeus, nacionais e locais.^{15,16,17,18} Limpe e desinfecte minuciosamente todas as superfícies de trabalho.

- H. Os controlos contêm azida de sódio como conservante. Não utilize tubos de metal para a transferência de reagentes. Se as soluções com compostos de azida de sódio forem eliminadas num sistema de canalização, deverão antes ser diluídas e eliminadas com água corrente em abundância. Estas precauções são recomendadas para evitar a acumulação de depósitos em canos metálicos onde se poderiam desenvolver condições explosivas.
- I. Boas práticas padronizadas para os laboratórios moleculares incluem a monitorização ambiental. Para monitorizar o ambiente de um laboratório, sugere-se o seguinte procedimento:
1. Obtenha uma zaragatoa com ponta de algodão e junte-a com um SAT (Specimen Aliquot Tube) Aptima.
 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. Comprima a zaragatoa no lado do tubo de transporte para extrair a máxima quantidade 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

- J. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize as Precauções universais^{15,16,17} quando executar este ensaio. Devem ser estabelecidos métodos de manuseamento e eliminação adequados de acordo com os regulamentos locais.¹⁸ Este procedimento só deve ser executado por pessoal devidamente qualificado na utilização do Aptima HCV Quant Dx Assay e no manuseamento de materiais infecciosos.
- K. Mantenha condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime em condições de transporte além das recomendadas não foi avaliada.
- L. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desaperar ou destapar espécimes. Os espécimes podem conter níveis de organismos extremamente elevados. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e deite fora os materiais usados sem passá-los por cima de recipientes abertos. Mude de luvas se elas entrarem em contacto com o espécime.

Relacionadas com o ensaio

- M. Não utilize o kit de reagentes, o calibrador nem os controlos após o prazo de validade.
- N. Não troque, misture nem combine reagentes do ensaio de kits com números de lote mestre diferentes. Os fluidos do ensaio podem pertencer a números de lote diferentes. Os controlos e o calibrador podem pertencer a diferentes números de lote.
- O. Evite a contaminação microbiana ou com nuclease dos reagentes.
- P. Tape e conserve todos os reagentes do ensaio às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afectado pela utilização de reagentes conservados de forma incorrecta. Consulte as secções *Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes* e *Procedimento de teste no Panther System* para obter mais informações.
- Q. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos do ensaio sem instruções específicas para tal. Não adicione reagentes ou fluidos. O Panther System verifica os níveis dos reagentes.
- R. Alguns reagentes deste kit possuem símbolos de risco e segurança nos rótulos.

Nota: A informação sobre a Comunicação do Risco contempla as classificações das Folhas de Dados de Segurança (SDS). Para obter informações sobre a comunicação de risco específicas da sua região, consulte as respetivas SDS na Biblioteca de Folha de Dados de Segurança em www.hologicds.com.

**HCV VL Kit Controls**

Azoteto de sódio 0,2%
Human Serum 95-100%

**ATENÇÃO**


H312 - Nocivo em contacto com a pele
H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros
P273 - Evitar a libertação para o ambiente
P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial

Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes

- A. Na tabela seguinte, são mostradas as condições de conservação e estabilidade para reagentes, controlos e calibrador.

Reagente	Conservação de produtos por abrir	Kit aberto (reconstituído)	
		Conservação	Estabilidade
Reagente de amplificação qHCV	2°C a 8°C		
Solução de reconstituição do reagente de amplificação qHCV	2°C a 8°C	2°C to 8°C	30 dias ^a
Reagente enzimático qHCV	2°C a 8°C		
Solução de reconstituição do reagente enzimático qHCV	2°C a 8°C	2°C to 8°C	30 dias ^a
Reagente promotor qHCV	2°C a 8°C		
Solução de reconstituição do reagente promotor qHCV	2°C a 8°C	2°C to 8°C	30 dias ^a
Reagente de captura do alvo qHCV	2°C a 8°C	2°C to 8°C	30 dias ^a
qHCV CONTROL NC – (controlo negativo)	-15°C a -35°C	15°C a 30°C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHCV CONTROL LPC + (controlo positivo baixo)	-15°C a -35°C	15°C a 30°C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHCV CONTROL HPC + (controlo positivo alto)	-15°C a -35°C	15°C a 30°C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas
qHCV PCAL (calibrador positivo)	-15°C a -35°C	15°C a 30°C	Frasco de utilização única Usar no prazo de 24 horas

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

- B. Deite fora quaisquer reagentes reconstituídos e o reagente de captura do alvo (target capture reagent, TCR) não usados, após 30 dias ou após a data de validade do lote principal, conforme o que ocorrer primeiro.
- C. A estabilidade dos reagentes conservados dentro do Panther System é de 72 horas. Os reagentes podem ser carregados no Panther System até 5 vezes. O Panther System regista cada uma das vezes que os reagentes são carregados.
- D. Depois de descongelar o calibrador, a solução tem de estar límpida, ou seja, sem turvação ou precipitados.
-  E. O reagente promotor e o reagente promotor reconstituído são fotossensíveis. Proteja estes reagentes da luz durante a conservação e a preparação para utilização.

Colheita e conservação de espécimes

Nota: Manuseie todos os espécimes como se contivessem agentes potencialmente infecciosos. Use as Precauções universais.

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

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

Podem ser utilizados espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou de plástico:

- Tubos com anticoagulantes (EDTA) ou ácido citrato dextrose (ACD)
- Tubos de preparação de plasma (Plasma Preparation Tubes, PPT)
- Tubos de soro
- Tubos de separação de soro (Serum Separator Tubes, SST)

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

A. Colheita de espécimes

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 30°C e tem que ser centrifugado no prazo de 6 horas após a colheita do espécime. Separe o plasma ou o soro dos glóbulos vermelhos aglomerados seguindo as instruções do fabricante do tubo utilizado. O plasma ou o soro pode ser testado no Panther System, num tubo primário, ou transferido para um tubo secundário, como, por exemplo, o Tubo de Alíquotas de Espécime Aptima. Para obter o volume de reação de 500 µL, o volume mínimo de plasma ou de soro é de até 1200 µL para tubos de colheita primários e de 700 µL para tubos secundários. A tabela que se segue identifica os requisitos de volume morto para cada tipo de tubo primário e secundário.

Tubo (tamanho e tipo)	Volume morto no Panther System
Tubo de alíquotas de espécime Aptima (SAT)	0,2 mL
12x75 mm	0,5 mL
13x100 mm	0,5 mL
13x100 mm com gel	0,3 mL
16x100 mm com gel	0,7 mL

Se não forem testados imediatamente, o plasma e o soro podem ser conservados de acordo com as especificações a seguir descritas. Se for transferido para um tubo secundário, o plasma ou o soro pode ser congelado a -20 °C. Não exceda 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Não congele os espécimes em EDTA, ACD nem em tubos de colheita de soro primários.

B. Condições de conservação de espécimes

1. Espécimes de plasma com EDTA e ACD

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 30°C e tem que ser centrifugado no prazo de 6 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 25°C durante até 24 horas,

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

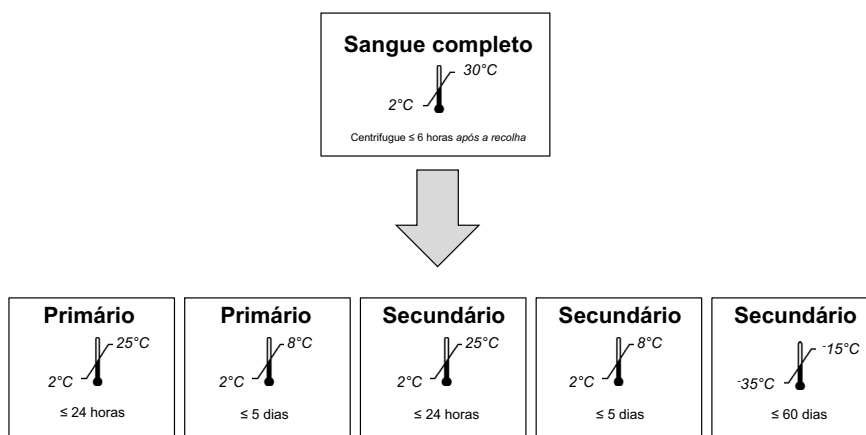


Figura 1. Condições de conservação para tubos EDTA/ACD

2. Espécimes de PPT

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 30°C e tem que ser centrifugado no prazo de 6 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 25°C durante até 24 horas,
- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário de 2°C a 8°C durante até 5 dias,
- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário a -20°C durante até 60 dias.

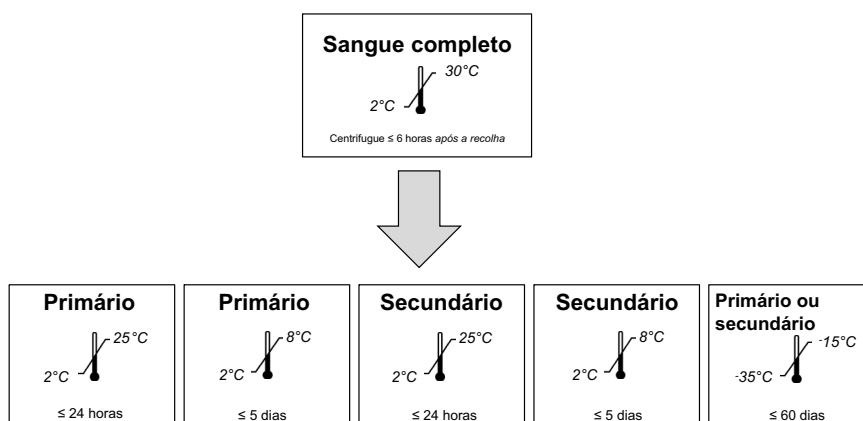


Figura 2. Condições de conservação dos PPT

3. Espécimes no tubo de soro

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 30°C e tem que ser centrifugado no prazo de 6 horas após a colheita do espécime. O soro 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,
- No tubo secundário a -20°C durante até 60 dias.

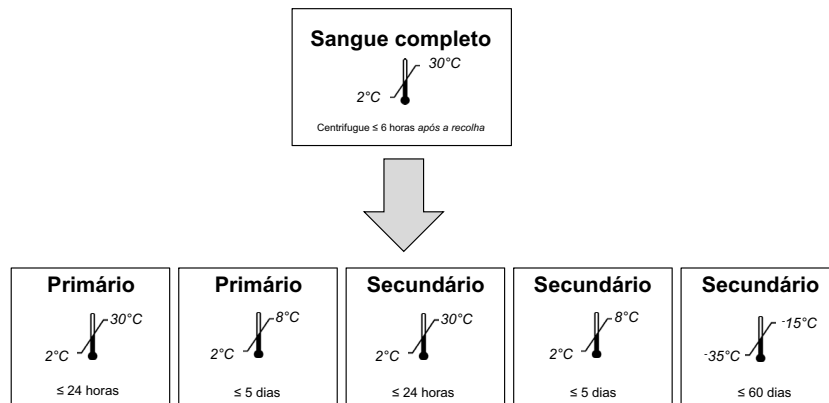


Figura 3. Condições de conservação dos tubos de soro

4. Espécimes em SST

O sangue total pode ser conservado a uma temperatura entre 2°C e 30°C e tem que ser centrifugado no prazo de 6 horas após a colheita do espécime. O soro 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,
- No tubo de colheita primário ou no tubo secundário a -20°C durante até 60 dias.

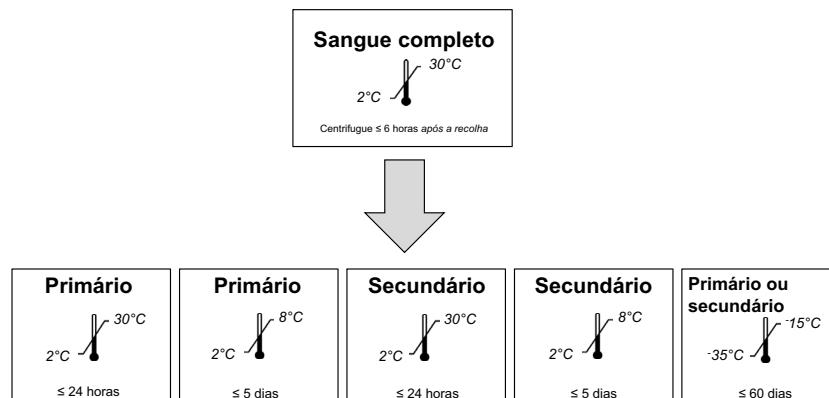


Figura 4. Condições de conservação dos SST

C. Conservação em congelamento de longo prazo

As amostras de plasma ou de soro podem ser armazenadas a -70°C durante até 60 dias em SATs.

D. Diluição de espécimes de plasma e soro

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

⚠ *A diluição dos espécimes de plasma e soro só pode ser utilizada para resultados quantitativos. Não dilua amostras de plasma ou soro para resultados de diagnóstico.*

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

Amostras dentro do Panther System

As amostras podem ficar destapadas no Panther System por um período total de até 8 horas. As amostras podem ser retiradas 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 têm de ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais, internacionais e regionais em vigor.*

Panther System

Os reagentes do Aptima HCV Quant Dx Assay para o Panther System estão indicados abaixo. Os símbolos de identificação do reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Nota: Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Kit de Aptima HCV Quant Dx Assay, 100 testes, código de produto PRD-03506

(1 caixa de ensaio, 1 kit de calibrador e 1 kit de controlos)

Controlos e calibradores adicionais podem ser encomendados separadamente. Consulte os respetivos catálogos abaixo.

Caixa do Aptima HCV Quant Dx Assay

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

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

Kit de calibrador Aptima HCV Quant Dx (código de de produto PRD-03507)
(conservar a uma temperatura de -15°C a -35°C após a recepção)

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

Kit de controlos Aptima HCV Quant Dx (código de de produto PRD-03508)
(conservar a uma temperatura de -15°C a -35°C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
NC	Controlo negativo qHCV <i>Plasma humano desfibrinado HCV negativo com gentamicina e azidade sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
LPC	Controlo positivo baixo qHCV <i>Armored RNA de HCV não infeccioso em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
HPC	Controlo positivo alto qHCV <i>Armored RNA de HCV não infeccioso em plasma humano desfibrinado com gentamicina e azida de sódio a 0,2% como conservantes.</i>	5 x 0,8 mL
	Etiqueta de código de barras do controlo	—

Materiais necessários, mas disponíveis separadamente

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

Material	Código de produto
Panther System	—
Kit de execução Panther para ensaios em tempo real (apenas em tempo real)	PRD-03455 (5.000 testes)
<i>Kit de fluidos do Aptima Assay (também conhecido como Kit de fluidos universal) contém solução de lavagem Aptima, tampão Aptima para fluido de desactivação e reagente de óleo Aptima</i>	303014 (1.000 testes)
<i>Unidades Multitubos (Multi-Tube Units, MTU)</i>	104772-02
<i>Kit do saco de resíduos Panther</i>	902731
<i>Tampa do recipiente de resíduos Panther</i>	504405
Kit de execução do Panther System (ao realizar ensaios TMA, sem ser em tempo real em paralelo com os ensaios TMA em tempo real) contém MTUs (unidades multitubos, sacos de resíduos, tampas do recipiente de resíduos, detetores automáticos e fluidos de ensaio)	303096 (5.000 testes)
Pontas, condutoras de 1.000 µL, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Luvas sem pó descartáveis	—
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas de substituição para reagentes <i>Soluções de reconstituição da solução de amplificação do reagente enzimático e do reagente promotor</i>	CL0041 (100 tampas)
<i>O frasco de TCR</i>	CL0040 (100 tampas)
Coberturas de bancada laboratorial revestidas de plástico	—
Toalhetes que não larguem pêlos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubo de colheita primário:	
13 mm x 100 mm	—
13 mm x 75 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Centrífuga	—
Misturador vortex	—

Materiais opcionais

Material	Código de produto
Opções de tubo secundário:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Tubos de alíquotas de espécimes Aptima (SATs) (100 por embalagem)	503762
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 diluentes de espécimes, 100 SATs, e 100 tampas	PRD-03478
Pipetas de transferência	—
Painéis disponíveis no mercado, por exemplo: HCV de controlo de qualidade para diagnóstico molecular (QCMD) ou Painéis SeraCare ACCURUN HCV	—
Zaragatoas com ponta de algodão	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—

Procedimento de teste no Panther System

Nota: Consulte o *Panther System Operator's Manual (Manual de instruções do Panther System)* para mais informações sobre o procedimento.

A. Preparação da área de trabalho

1. Limpe as superfícies de trabalho onde serão preparados os reagentes. Limpe as superfícies de trabalho com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água desionizada (DI). Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada com capas limpas e absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.
2. Limpe uma superfície de trabalho separada onde as amostras serão preparadas. Siga o procedimento supramencionado (passo A.1).
3. Limpe os pipetadores. Siga o procedimento de limpeza supramencionado (passo A.1).

B. Preparação do calibrador e dos controlos

Deixe o calibrador e os controlos atingir 15°C a 30°C antes do processamento da seguinte forma:

1. Retire 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 controles. A espuma compromete o sensor de nível no 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 neste momento.

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

Opção. O frasco de TCR pode ser preparado num dispositivo de agitação de tubos por oscilação seguindo estas instruções: Retire o TCR da conservação (2°C a 8°C) e agite de imediato 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. Retire os reagentes liofilizados e as soluções de reconstituição correspondentes da conservação (2°C a 8°C). Emparelhe cada solução de reconstituição com o respectivo 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 Principal para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados.
 - i. Abra o frasco de reagente liofilizado removendo o selo metálico e a rolha de borracha.
 - ii. Insira com firmeza a extremidade ranhurada do aro de reconstituição (preto) no frasco (Figura 5, passo 1).
 - iii. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
 - iv. Coloque o frasco da solução de reconstituição numa superfície estável (p. ex., bancada). Em seguida, inverta o frasco de reagente liofilizado sobre o frasco da solução de reconstituição e fixe firmemente o aro ao frasco da solução de reconstituição (Figura 5, passo 2).
 - v. Inverta lentamente os frascos montados (frasco ligado ao frasco de solução) para permitir que a solução drene para o frasco de vidro (Figura 5, passo 3).
 - vi. Recolha os frascos montados e gire-os durante pelo menos 10 segundos (Figura 5, passo 4).

- vii. Aguarde pelo menos 30 minutos para que o reagente liofilizado passe para a solução.
- viii. Depois de o reagente liofilizado estar na solução, gire os frascos montados durante pelo menos 10 segundos e, em seguida, oscile a solução no interior do frasco de vidro para a frente e para trás para misturar totalmente.
- c. Incline lentamente os frascos montados outra vez para permitir que toda a solução seja novamente drenada para dentro do frasco da solução de reconstituição (Figura 5, passo 5).
- d. Retire cuidadosamente o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 6).
- e. Volte a tapar o frasco. Anote as iniciais do operador e a data de reconstituição na etiqueta (Figura 5, passo 7).
- f. Retire o aro de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 5, passo 8).

Advertência: Evite formar espuma excessiva quando reconstituir os reagentes. A espuma compromete o sensor de nível no Panther System.

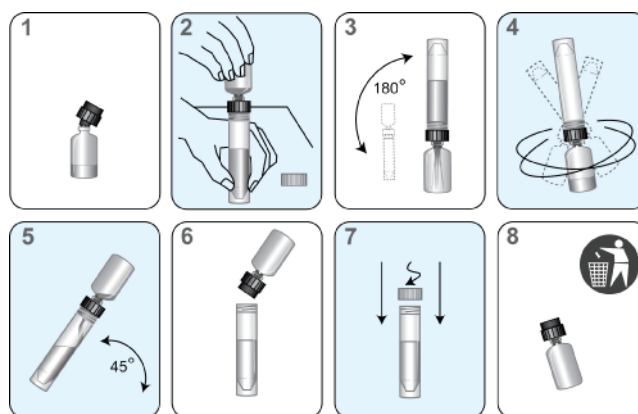


Figura 5. Processo de reconstituição de reagentes

D. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos

1. Retire os reagentes previamente preparados da conservação (2°C a 8°C).
2. O reagente de amplificação enzimático, promotor e TCR previamente preparados têm de atingir uma temperatura entre 15°C e 30°C antes do início do ensaio.
3. No caso de TCR previamente preparado, execute o passo C.1 anterior antes de colocá-lo no sistema.
4. Misture bem os reagentes de amplificação, enzimático e promotor girando-os e invertendo-os antes de os colocar no sistema. Evite criar espuma excessiva quando inverter os reagentes.
5. Não ateste frascos de reagente. O Panther System reconhece e rejeita os frascos que tenham sido atestados.

E. Manuseamento de espécimes

1. Certifique-se de que os espécimes processados em tubos primários ou os espécimes não diluídos em tubos secundários foram conservados corretamente de acordo com Colheita e conservação de espécimes na página 8.

2. Certifique-se de que os espécimes congelados são totalmente descongelados. Agite no vortex os espécimes descongelados durante 3 a 5 segundos para misturar totalmente.
3. Deixe os espécimes atingir uma temperatura de 15°C a 30°C antes do processamento. Consultar *Amostras dentro do Panther System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.
4. Certifique-se de que cada tubo de colheita primária contém até 1200 µL de espécime ou de que cada SAT contém, pelo menos, 700 µL de espécime. Consulte a tabela fornecida em *Colheita de espécimes* na página 8 para identificar os requisitos de volume morto para cada tipo de tubo primário e secundário. Se for necessária a diluição de espécimes, consulte o passo E.6 abaixo para obter mais informações.
5. Imediatamente antes de carregar os espécimes num suporte de amostras, centrifugue cada espécime de 1.000 a 3.000g durante 10 minutos. Não retire as tampas. A existência de bolhas no tubo pode comprometer a detecção de nível do Panther System.

Consulte *Preparação do sistema*, passo F.2 abaixo, para obter mais informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

6. Dilua um espécime de plasma ou de soro a 1:3 num SAT ou a 1:100 num tubo secundário.

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

- ⚠ A diluição dos espécimes só pode ser utilizada para resultados quantitativos. Não dilua espécimes para resultados de diagnóstico.

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

- a. Diluição de espécimes de volume baixo

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

- i. Coloque 240 µL de espécime num SAT.
- ii. Adicione 480 µL de diluente de espécimes Aptima.
- iii. Tape o tubo.
- iv. Inverta suavemente 5 vezes para misturar.

Os espécimes diluídos na proporção de 1:3 podem ser testados utilizando a opção 1:3 no Panther System (consulte o *Panther System Operator's Manual* [Manual de instruções do Panther System] para obter mais informações). O software comunicará automaticamente o resultado do produto não diluído por aplicação do factor de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

- b. Diluição de espécimes de título elevado

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

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

Os espécimes diluídos na proporção de 1:100 podem ser testados utilizando a opção 1:100 no Panther System (consulte o *Panther System Operator's Manual* [Manual de instruções do Panther System] para obter mais informações). O software comunicará automaticamente o resultado do produto não diluído por aplicação do factor de diluição. Estes espécimes serão sinalizados como espécimes diluídos.

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

F. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções no *Panther System Operator's Manual* (Manual de instruções do Panther System) e na secção *Notas sobre o procedimento*. Certifique-se de que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.
2. Carregue as amostras no respectivo 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 respectivo 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, retire e elimine a tampa de cada um dos tubos 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, utilize uma pipeta de transferência descartável nova para rebentar eventuais bolhas ou espuma.
- f. Quando a última tampa tiver sido removida, carregue o suporte de amostras numa zona de amostras.

Nota: Se tentar executar outros tipos de ensaios e amostras ao mesmo tempo, coloque o Retentor de amostras antes de carregar o suporte de amostras numa zona de amostras.

- g. Repita os passos 2.a a 2.f para o suporte de amostras seguinte.

Notas sobre o procedimento

A. Calibrador e controlos

1. O calibrador positivo de qHCV, o controlo positivo baixo de qHCV, o controlo positivo alto de qHCV e os tubos de controlo negativo de qHCV podem ser carregados em qualquer posição no suporte de amostras e em qualquer corredor da zona de amostras do Panther System. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
 - a. O calibrador e os controlos estão atualmente a serem processados pelo sistema.
 - b. Os resultados válidos para o calibrador e controlos estão registados no sistema.
2. Depois dos tubos de controlo e do calibrador terem sido pipetados e estiverem a ser processados pelo kit de execução Aptima HCV Quant Dx Assay, as amostras podem ser testadas com o kit reconstituído associado até 24 horas, **a não ser que:**
 - a. os resultados do calibrador ou do controlo sejam inválidos.
 - b. o respectivo kit de reagente de ensaio seja retirado do sistema.
 - c. o respectivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
3. O tubo do calibrador e de cada controlo só pode ser testado uma vez. As tentativas para usar o tubo mais do que uma vez podem originar erros de processamento.

B. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

Controlo de qualidade

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

Calibração do ensaio

Para gerar resultados válidos, é necessário realizar uma calibração do ensaio. Um calibrador positivo único é executado em triplicado sempre que um kit de reagente for carregado no Panther System. Depois de estabelecida, a calibração é válida durante até 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 numa execução invalidada têm de ser novamente testadas com um calibrador e controlos recém-preparados.

Controlos negativo e positivo

Para gerar resultados válidos, é necessário testar um conjunto de controlo do ensaio. Tem que se testar uma réplica do controlo negativo, uma do controlo positivo baixo e outra do controlo positivo alto sempre que um kit de reagente for carregado no Panther System. Depois de estabelecidos, os controlos são válidos durante até 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 tem que ter um resultado de “Não detectado” e os controlos positivos têm que ter resultados dentro dos parâmetros predefinidos. Se algum dos controlos tiver um resultado inválido, o software invalidará automaticamente a execução. As amostras numa execução invalidada têm de 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 Panther System está concebido para verificar com precisão os processos, quando os procedimentos são efectuados seguindo as instruções disponibilizadas neste folheto informativo e no *Manual de Instruções do Panther System*.

Interpretação dos resultados

O Panther System determina automaticamente a concentração de RNA do HCV para espécimes e controlos mediante comparação dos resultados com uma curva de calibração. As concentrações de RNA do HCV são apresentadas em IU/mL e \log_{10} IU/mL. A interpretação dos resultados é fornecida na Tabela 1. Se a opção 1:3 ou 1:100 for utilizada para espécimes diluídos, o Panther System calcula automaticamente a concentração do HCV para o espécime não diluído multiplicando os resultados da concentração pelo factor de diluição.

Nota: No caso de espécimes diluídos, os resultados indicados como “Não detectados” ou “< 10 detectado” podem ser gerados por diluição de um espécime com uma concentração acima, mas próxima do LOD ou LLOQ (limite da detecção ou limite inferior da quantificação). Caso não se obtenha um resultado quantitativo, recomenda-se a colheita e teste de outro espécime não diluído.

O Panther System não fornece um resultado qualitativo (isto é, “Reactivo” ou “Não reactivo”) para fins de diagnóstico. O operador tem de interpretar a concentração de RNA do HCV apresentada convertendo-a num resultado qualitativo (Tabela 1). Os espécimes com resultados listados como “Não detectado” são não reactivos para o RNA do HCV. Os espécimes com resultados listados como “< 10 detectado” com resultados listados dentro do intervalo linear e > 100.000.000 (limite superior da quantificação) indicam que foi detectado RNA do HCV e que estes espécimes foram reactivos para o RNA do HCV.

Tabela 1: Interpretação de resultados

Apresentação do Resultado do Aptima HCV Quant Dx Assay		Interpretação da concentração do RNA do HCV	Interpretação qualitativa do diagnóstico do utilizador ^a
IU/mL	Valor \log_{10} ^b		
Não detectado	Não detectado	RNA do HCV não detectado.	Não reactivo para RNA do HCV
< 10 detectado	< 1,00	Foi detectado RNA do HCV, mas num nível abaixo do limite inferior de quantificação (LLOQ)	Reactivo para RNA do HCV
10 a 100.000.000	1,00 a 8,00	A concentração de RNA do HCV situa-se dentro do intervalo linear de 10 a 100.000.000 IU/mL	Reactivo para RNA do HCV
> 100.000.000	> 8,00	A concentração do RNA do HCV está acima do limite superior de quantificação (ULOQ)	Reactivo para RNA do HCV
Inválido ^c	Inválido ^c	Houve um erro na produção do resultado. O espécime deverá ser novamente testado.	Inválida

^a Uma interpretação de diagnóstico pode ser feita a partir de espécimes de soro ou plasma que não tenham sido diluídas.

^b O valor é truncado a duas casas decimais.

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

Limitações

- A. A utilização deste ensaio está limitada a pessoal que tenha recebido formação no procedimento. O não cumprimento das instruções fornecidas neste folheto pode levar a resultados erróneos.
- B. A fiabilidade dos resultados depende da colheita, transporte, conservação e processamento adequados.

Desempenho**Limite de detecção (Limit of Detection, LOD) utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS**

O limite de detecção (Limit of Detection, LOD) do ensaio é definido como a concentração de RNA do HCV que é detectada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹⁹

O LOD foi determinado por teste de painéis de acordo com o 2º Padrão Internacional da OMS para o RNA do vírus da hepatite C (NIBSC 96/798 genótipo 1) diluído em plasma e soro humano HCV negativo. Foram testadas, no mínimo, 36 réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 108 réplicas por diluição. Foi realizada a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LOD mostrados na Tabela 2 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LOD do Aptima HCV Quant Dx Assay utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS é 4,3 IU/mL para plasma e 3,9 IU/mL para soro.

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

Limite de detecção previsto	Concentração (IU/mL)	
	Plasma	Soro
10%	0,3	0,3
20%	0,4	0,5
30%	0,5	0,6
40%	0,7	0,8
50%	0,9	1,0
60%	1,1	1,2
70%	1,5	1,5
80%	2,0	2,0
90%	3,0	2,9
95%	4,3	3,9

Limite de detecção em vários genótipos do HCV

O LOD foi determinado testando diluições dos espécimes clínicos positivos do HCV para os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em soro e plasma humano negativo do HCV. As concentrações foram determinadas utilizando o ensaio do comparador com a marca CE. Foram testadas, no mínimo, 20 réplicas de cada membro do painel com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 60 réplicas por membro do painel. Foi efectuada a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos de 50% e 95%. Os valores de LOD mostrados na Tabela 3 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado.

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

Genótipo	Limite de detecção previsto	Concentração (IU/mL)	
		Plasma	Soro
1	50%	0,8	1,3
	95%	3,8	5,1
2	50%	1,0	1,1
	95%	2,8	4,0
3	50%	1,1	1,0
	95%	4,3	3,4
4	50%	1,3	0,7
	95%	4,8	2,3
5	50%	0,8	0,9
	95%	2,1	3,2
6	50%	0,6	0,9
	95%	3,9	3,9

Intervalo linear

O intervalo linear foi estabelecido por painéis de teste do Armored RNA do HCV diluído em soro e plasma humano negativo do HCV de acordo com a norma CLSI EP06-A.²⁰ A concentração dos painéis variou de 1,0 log IU/mL a 8,2 log IU/mL. O Aptima HCV Quant Dx Assay demonstrou linearidade no intervalo testado, com um limite superior da quantificação (ULOQ) de 8,0 log IU/mL, conforme apresentado na Figura 6.

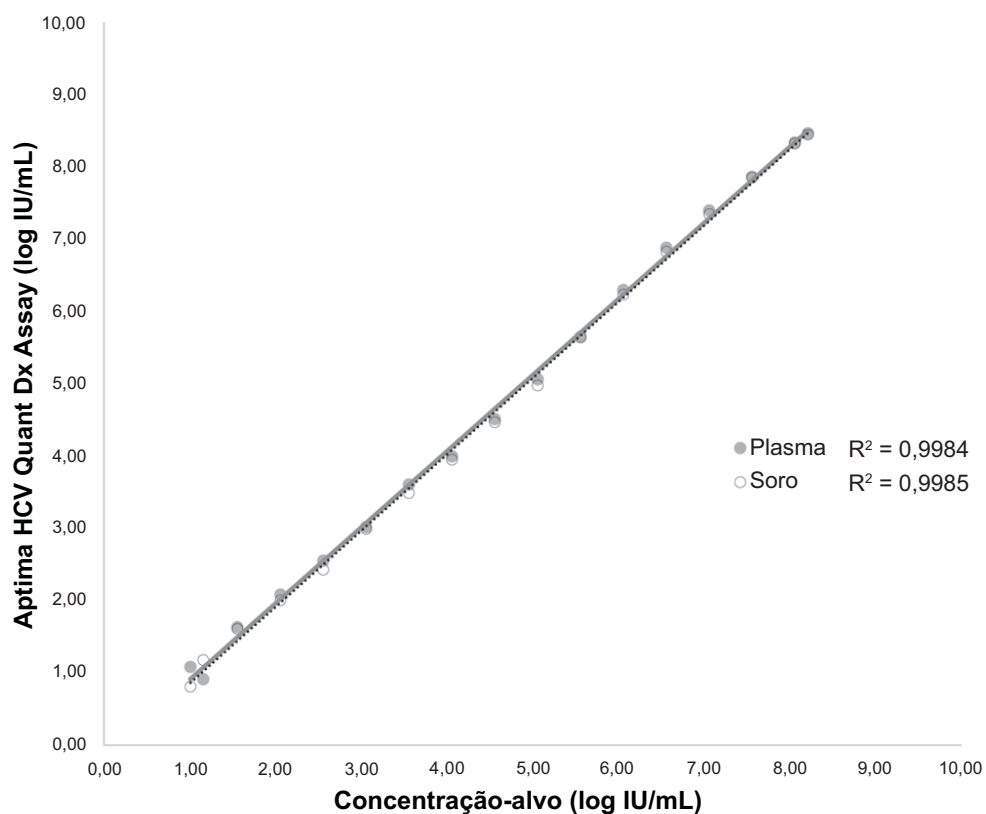


Figura 6. Linearidade no plasma e soro

Linearidade nos vários genótipos do HCV

A resposta linear para os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foi confirmada por teste de painéis constituídos por transcrito de HCV diluído em tampão em concentrações que variam de 1,36 log IU/mL a 7,36 log IU/mL. Os testes foram realizados em três Panther Systems utilizando três lotes de reagentes. Foi demonstrada linearidade em todo o intervalo testado para todos os genótipos testados, conforme mostrado na Figura 7.



Figura 7. Linearidade nos genótipos 1 a 6 do HCV

Limite inferior de quantificação utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS

O limite inferior de quantificação (LLOQ) é definido como a concentração mais baixa em que o RNA do HCV é quantificado com fiabilidade dentro de um erro total, de acordo com a norma CLSI EP17-A2.¹⁹ O erro total foi estimado por dois métodos: Erro analítico total (Total Analytical Error, TAE) = desvio sistemático + 2SD e Erro total (Total Error, TE) = SQRT(2) x 2SD. Para garantir a precisão das medições, o erro total do Aptima HCV Quant Dx Assay foi definido para 1 log IU/mL (ou seja, no LLOQ, a diferença entre duas medições de mais do que 1 log IU/mL é estatisticamente significativa).

O LLOQ foi determinado por teste de painéis de acordo com o 2º Padrão Internacional da OMS para o RNA do vírus da hepatite C (NIBSC 96/798 genótipo 1) diluído em plasma e soro humano HCV negativo. Foram testadas, no mínimo, 36 réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 108 réplicas por diluição. Os resultados dos lotes de reagentes com a concentração mais elevada, igual ou superior ao LOD e segundo os requisitos do TE e TAE, são apresentados na Tabela 4 para plasma e na Tabela 5 e para soro. O LLOQ conforme o 2º padrão internacional da OMS é de 7 IU/mL (0,82 log IU/mL) para plasma e 9 IU/mL (0,93 log IU/mL) para soro, como está resumido na Tabela 6. O LLOQ foi estabelecido em vários genótipos (consulte a secção seguinte “Determinação do LLOQ (Limite inferior de quantificação) em vários genótipos do HCV”). Estes dados do genótipo estabelecem o LLOQ global para o ensaio como 10 IU/mL.

Tabela 4: LLOQ utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS para o HCV diluído em plasma

Lote de reagente	Concentração-alvo (IU/mL)	Concentração-alvo (log IU/mL)	Aptima HCV Quant Dx (log IU/mL)	DP (log IU/mL)	Desvio sistemático (log IU/mL)	ET calculado (log IU/mL)	TAE calculado (log IU/mL)
1	3	0,48	0,53	0,30	0,05	0,85	0,65
	6	0,78	0,73	0,31	-0,04	0,88	0,67
	8	0,90	1,08	0,23	0,18	0,65	0,64
2	3	0,48	0,37	0,32	-0,11	0,92	0,75
	6	0,78	0,82	0,27	0,04	0,78	0,59
	8	0,90	0,96	0,26	0,06	0,74	0,58
3	3	0,48	0,46	0,25	-0,01	0,71	0,52
	6	0,78	0,76	0,34	-0,02	0,95	0,69
	8	0,90	0,89	0,26	-0,01	0,73	0,53

DP = Desvio padrão

Tabela 5: LLOQ utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS para o HCV diluído em soro

Lote de reagente	Concentração-alvo (IU/mL)	Concentração-alvo (log IU/mL)	Aptima HCV Quant Dx (log IU/mL)	DP (log IU/mL)	Desvio sistemático (log IU/mL)	ET calculado (log IU/mL)	TAE calculado (log IU/mL)
1	3	0,48	0,65	0,33	0,17	0,94	0,84
	6	0,78	0,93	0,32	0,15	0,90	0,79
	8	0,90	1,08	0,28	0,18	0,80	0,74
2	3	0,48	0,52	0,36	0,04	1,02	0,76
	6	0,78	0,89	0,32	0,11	0,90	0,75
	8	0,90	1,01	0,21	0,11	0,60	0,53
3	3	0,48	0,47	0,39	-0,01	1,11	0,79
	6	0,78	0,71	0,30	-0,06	0,86	0,67
	8	0,90	0,95	0,29	0,05	0,83	0,63

DP = Desvio padrão

Tabela 6: Resumo do LLOQ utilizando o 2º Padrão Internacional da OMS para HCV

Lote de reagente	LLOQ do Plasma		LLOQ do Soro	
	(log IU/mL)	(IU/mL)	(log IU/mL)	(IU/mL)
1	0,73	5	0,93	9
2	0,82	7	0,89	8
3	0,76	6	0,71	5

Determinação do Limite inferior de quantificação (LLOQ) em vários genótipos do HCV

O LLOQ foi determinado testando diluições dos espécimes clínicos positivos do HCV para os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em soro e plasma humano negativo do HCV. A atribuição da concentração dos espécimes clínicos foi determinada utilizando um ensaio do comparador marcado com CE. Foram testadas, no mínimo, 36 réplicas de cada membro do painel com cada um dos três lotes de reagentes, para um mínimo de 108 réplicas por membro do painel. Os resultados dos lotes de reagentes com a concentração mais elevada, igual ou superior ao LOD e segundo os requisitos do TE e TAE, são apresentados na Tabela 7 para plasma e Tabela 8 para soro. O LLOQ para os genótipos 1 a 6 no plasma e soro é resumido na Tabela 9. Estes dados estabelecem o LLOQ global para o ensaio como 10 IU/mL.

Tabela 7: Determinação do LLOQ em vários genótipos no plasma

Genótipo	Concentração-alvo	Concentração-alvo	Aptima HCV Quant Dx	DP	Desvio sistemático	ET calculado	TAE calculado
	(IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)
1	3	0,48	0,65	0,38	0,17	1,08	0,94
	6	0,78	0,88	0,35	0,11	1,00	0,82
	8	0,90	0,99	0,24	0,09	0,68	0,56
2	3	0,48	0,63	0,40	0,16	1,13	0,95
	4	0,60	0,76	0,29	0,15	0,81	0,73
	6	0,78	1,12	0,30	0,34	0,86	0,94
3	6	0,78	0,52	0,30	-0,26	0,85	0,86
	10	1,00	0,80	0,21	-0,20	0,59	0,62
	12	1,08	0,89	0,26	-0,19	0,74	0,71
4	8	0,90	0,61	0,39	-0,29	1,11	1,07
	10	1,00	0,82	0,31	-0,18	0,87	0,80
	12	1,08	1,01	0,29	-0,07	0,83	0,65
5	3	0,48	0,57	0,37	0,10	1,06	0,85
	6	0,78	0,87	0,31	0,09	0,89	0,72
	10	1,00	1,15	0,16	0,15	0,44	0,46
6	2	0,30	0,66	0,36	0,36	1,02	1,08
	3	0,48	0,79	0,28	0,31	0,80	0,87
	6	0,78	1,14	0,26	0,36	0,74	0,89

DP = Desvio padrão

Tabela 8: Determinação do LLOQ em vários genótipos no soro

Genótipo	Concentração-alvo	Concentração-alvo	Aptima HCV Quant Dx	DP	Desvio sistemático	ET calculado	TAE calculado
	(IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)	(log IU/mL)
1	6	0,78	0,75	0,36	-0,03	1,02	0,75
	8	0,90	0,88	0,32	-0,02	0,89	0,65
	10	1,00	1,04	0,29	0,04	0,81	0,61
2	3	0,48	0,48	0,35	0,00	0,99	0,70
	6	0,78	0,80	0,31	0,02	0,86	0,63
	10	1,00	1,04	0,25	0,04	0,72	0,54
3	6	0,78	0,45	0,25	-0,33	0,72	0,84
	10	1,00	0,67	0,22	-0,33	0,63	0,78
	12	1,08	0,92	0,19	-0,16	0,54	0,54
4	1	0,00	0,19	0,27	0,19	0,77	0,73
	2	0,30	0,65	0,32	0,35	0,91	0,99
	3	0,48	0,65	0,34	0,17	0,96	0,85
5	3	0,46	0,48	0,37	0,02	1,04	0,76
	6	0,76	0,72	0,29	-0,04	0,81	0,61
	9	0,94	1,04	0,27	0,10	0,77	0,65
6	3	0,48	0,58	0,37	0,11	1,04	0,84
	6	0,78	0,99	0,22	0,21	0,61	0,64
	10	1,00	1,25	0,22	0,25	0,63	0,70

DP = Desvio padrão

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

Genótipo do HCV	LLOQ do Plasma		LLOQ do Soro	
	(log IU/mL)	(IU/mL)	(log IU/mL)	(IU/mL)
1	0,88	8	0,88	8
2	0,76	6	0,80	6
3	0,80	6	0,67	5
4	0,82	7	0,65	4
5	0,87	7	0,72	5
6	0,79	6	0,99	10

Precisão

Para avaliar a precisão, foi produzido um painel de 10 membros, diluindo os espécimes clínicos positivos do HCV ou deitando o Armored RNA com analito no soro ou plasma negativo do HCV. O painel foi testado por três operadores utilizando três lotes de reagentes em três Panther Systems durante 21 dias.

A Tabela 10 mostra a precisão dos resultados do ensaio (em log IU/mL) entre instrumentos, entre operadores, entre lotes, entre execuções, dentro das execuções e globais. A variabilidade total foi de $\leq 13,31\%$ em todos os membros do painel, principalmente devido à variabilidade na execução (por exemplo, erro aleatório).

Tabela 10: Precisão do Aptima Quant Dx Assay

Matriz	N	Concentração média (log IU/mL)	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre execuções		Intra-execução		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Plasma	98 ^a	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	3,35	0,06	4,54	0,12	9,84	0,14	11,34
Plasma	162	2,06	0,05	2,23	0,00	0,00	0,07	3,20	0,03	1,47	0,10	4,91	0,14	6,88
Plasma	162	3,02	0,03	0,89	0,01	0,24	0,04	1,47	0,01	0,33	0,09	3,08	0,11	3,77
Plasma	162	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,60	0,04	0,86	0,06	1,13	0,10	2,04
Plasma	162	7,16	0,02	0,21	0,01	0,20	0,04	0,52	0,00	0,00	0,05	0,75	0,09	1,27
Soro	132 ^a	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	5,16	0,00	0,00	0,15	12,17	0,17	13,31
Soro	162	2,17	0,02	0,99	0,04	1,71	0,07	3,01	0,05	2,15	0,08	3,53	0,12	5,61
Soro	162	3,09	0,02	0,67	0,00	0,00	0,06	1,79	0,03	0,90	0,07	2,26	0,11	3,44
Soro	161	4,86	0,00	0,00	0,04	0,78	0,08	1,67	0,00	0,00	0,08	1,72	0,13	2,65
Soro	162	7,16	0,00	0,00	0,05	0,70	0,05	0,73	0,02	0,31	0,04	0,55	0,10	1,35

CV = coeficiente de variação, DP = desvio padrão

^a Número de resultados válidos no intervalo linear do ensaio.

Nota: A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devido a esses factores for muito pequena. Quando isto ocorrer, DP e CV são mostrados como 0.

Substâncias potencialmente interferentes

Foi avaliada a susceptibilidade do Aptima HCV Quant Dx Assay à interferência por níveis elevados de substâncias endógenas ou fármacos frequentemente receitados a indivíduos infectados pelo HCV. Foram testadas amostras de plasma HCV negativas e amostras às quais foi adicionado analito com HCV para concentração de 3,3 log IU/mL de RNA do HCV.

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

Foram testados com o Aptima HCV Quant Dx Assay espécimes de plasma clínicos de pacientes com níveis elevados de substâncias definidas, ou de pacientes com as doenças listadas na Tabela 11. Não foi observada interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 11: Tipos de espécimes clínicos testados

Tipos de espécimes clínicos	
1	Factor reumatóide (FR)
2	Anticorpos antinucleares (ANA)
3	Anticorpos anti-Jo-1 (JO-1)
4	Lúpus eritematoso sistémico (LES)
5	Artrite reumatóide (AR)
6	Esclerose múltipla (EM)
7	Hiperglobulinemia
8	Alanina-aminotransferase (ALT) elevada
9	Aspartato-aminotransferase (AST) elevada
10	Cirrose alcoólica (CA)
11	Mieloma múltiplo (MM)
12	Lipémica (lípidos elevados)
13	Ictérica (bilirrubina elevada)
14	Hemolisada (hemoglobina elevada)
15	Albumina proteica elevada
16	Anticorpos anti-HBV
17	Anticorpos anti-HIV-1
18	Anticorpos anti-HIV-2

Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 12 em concentrações pelo menos três vezes a $C_{máx}$ (plasma humano).

Tabela 12: Substâncias exógenas

Grupo de substâncias exógenas	Substâncias exógenas testadas
1	Telaprevir, claritromicina, interferão alfa-2a, dolutegravir, azitromicina
2	Simeprevir, sofosbuvir
3	Efavirenz, boceprevir, peginterferão alfa-2b, emtricitabina, raltegravir, amoxicilina
4	Sulfato de abacavir, ribavirina, dasabuvir, rilpivirina, rifampina/rifampicina
5	Lopinavir, tenofovir, lamivudina, valganciclovir
6	Heparina, EDTA, citrato de sódio

Especificidade

A especificidade foi determinada utilizando 198 espécimes clínicos frescos e 538 negativos congelados do HCV. No total, foram testados 370 espécimes de plasma e 366 de soro.

A especificidade foi calculada como a percentagem das amostras do HCV negativas com os resultados de “Não detetado.” O RNA do HCV não foi detetado em todas as 736 amostras. A especificidade foi de 100% (736/736, 95% IC: 99,6-100%).

Tabela 13: Especificidade nos espécimes clínicos de plasma e soro

	Plasma fresco	Plasma congelado	Plasma total	Soro fresco	Soro congelado	Soro total	Combinado
Réplicas válidas (n)	100	270	370	98	268	366	736
Não detectado	100	270	370	98	268	366	736
Especificidade (95% IC)	100% (97,1-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (97,0-100)	100% (98,9-100)	100% (99,2-100)	100% (99,6-100)

IC = intervalo de confiança

Especificidade analítica

A potencial reactividade cruzada com agentes patogénicos listados na Tabela 14 foi avaliada no plasma humano do HCV negativo na presença ou ausência de 3,3 log IU/mL do HCV. Não foi observada reactividade cruzada. Não foi observada interferência na presença de agentes patogénicos.

Tabela 14: Agentes patogénicos testados para a especificidade analítica

Agente patogénico	Concentração		Agente patogénico	Concentração	
Vírus da hepatite A	100.000	cópias/mL	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1.000.000	CFU/mL ^f
Vírus da Hepatite B (VHB)	100.000	IU/mL ^a	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.000.000	CFU/mL
Vírus da hepatite G	1.470	PFU/mL ^b	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.000.000	CFU/mL
HIV-1	100.000	cópias/mL	<i>Propionibacterium acnes</i>	1.000.000	CFU/mL
HIV-2	100.000	PFU/mL	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.000.000	CFU/mL
Vírus herpes simplex 1 (VHS-1)	100.000	PFU/mL	<i>Candida albicans</i>	1.000.000	CFU/mL
Vírus herpes simplex 2 (VHS-2)	100.000	PFU/mL	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.000.000	CFU/mL
Vírus herpes 6B humano	100.000	cópias/mL	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.000.000	IFU/mL ^g
Vírus herpes 8 humano	2.667	TCID50 U/mL ^c	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1.000.000	células/mL
Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)	100.000	vp/mL ^d			
Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2)	100.000	vp/mL			
Parvovírus B19	100.000	IU/mL			
Vírus do Nilo Ocidental	100.000	PFU/mL			
Vírus do dengue 1	100.000	PFU/mL			
Vírus do dengue 2	100.000	PFU/mL			
Vírus do dengue 3	100.000	PFU/mL			
Vírus do dengue 4	100.000	PFU/mL			
Citomegalovírus	100.000	PFU/mL			
Vírus Epstein-Barr	100.000	cópias/mL			
Vírus da rubéola	100.000	PFU/mL			
Papilomavírus humano	100.000	células/mL			
Adenovírus tipo 5	100.000	TCID50 U/mL			
Vírus Influenza A	100.000	TCID50 U/mL			
Vírus da encefalite Japonês	ND	ND			
Vírus da encefalite St. Louis	ND	ND			
Vírus da encefalite Murray Valley	2.643	LD/mL ^e			
Vírus da febre amarela	100.000	células/mL			

^a IU/mL = unidades internacionais por mL

^b PFU/mL = unidades formadoras de placa por mL

^c TCID50 U/mL = unidades de dose infecciosa de cultura do tecido por mL

^d vp/mL = partículas virais por mL

^e LD/mL = dose letal por mL

^f CFU/mL = unidades formadoras de colónias por mL

^g IFU/mL = unidades formadoras de inclusão por mL

Amostras clínicas contendo vírus que não o HCV

Os patogênicos listados na Tabela 15 foram avaliados pela obtenção de espécimes clínicos infectados naturalmente. Foram testados na presença ou ausência de RNA do HCV 3,3 log IU/mL. Não foi observada reatividade cruzada. Não foi observada interferência.

Tabela 15: Amostras clínicas testadas para a especificidade analítica

Micro-organismo	Matriz	N (dados)
HBV	soro	5
HBV	plasma	5
Vírus do dengue	plasma	10
Vírus da hepatite A	plasma	10
HTLV-1	plasma	10
HTLV-2	plasma	10
HIV-1	plasma	10
Vírus do Nilo Ocidental	plasma	10

Reprodutibilidade de espécimes clínicos

A reprodutibilidade foi avaliada testando três réplicas dos espécimes clínicos de soro e plasma do HCV positivo infectados naturalmente. A concentração média e o desvio-padrão das amostras de plasma e soro testadas são mostradas nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Reprodutibilidade de espécimes de plasma clínicos

ID do espécime do plasma	Concentração média (log IU/mL)	DP
1	1,68	0,05
2	1,69	0,17
3	1,73	0,06
4	1,73	0,06
5	1,84	0,05
6	2,30	0,10
7	2,71	0,09
8	2,80	0,06
9	3,22	0,04
10	3,80	0,05
11	4,12	0,08
12	4,21	0,11
13	4,90	0,14
14	6,94	0,11
15	7,05	0,04

Tabela 17: Reprodutibilidade de espécimes de soro clínicos

ID do espécime do soro	Concentração média (log IU/mL)	DP
1	1,67	0,07
2	1,74	0,10
3	1,86	0,15
4	1,67	0,07
5	2,00	0,07
6	2,51	0,08
7	3,12	0,23
8	3,29	0,02
9	3,70	0,18
10	3,99 ^a	0,13
11	4,35	0,05
12	5,48	0,12
13	5,74	0,07
14	5,80	0,13
15	7,15	0,10

^aResultado de duas em três réplicas testadas. Uma réplica externa removida.

Diluição de amostras utilizando diluente de espécimes

Para avaliar a recuperação de RNA do HCV nas amostras diluídas com Aptima Specimen Diluent, as amostras de plasma e soro que se espalham no intervalo linear foram diluídas na relação 1:3 com Aptima Specimen Diluent. Além disso, os espécimes clínicos infectados naturalmente de título elevado e amostras do Armored RNA às quais foi adicionado um analito blindadas com concentrações superiores ao ULOQ foram diluídas na relação 1:100 com o Aptima Specimen Diluent. Cada amostra foi testada não diluída e diluída (1:3 ou 1:100) em triplicado. As diferenças entre a concentração média apresentada (factor de diluição aplicado ao resultado da amostra diluída) e a concentração não diluída média são mostradas na Tabela 18 para plasma e na Tabela 19 para soro. As concentrações da amostra foram recuperadas com precisão nas amostras diluídas.

Tabela 18: Diluição de amostras com Aptima Specimen Diluent – Plasma

Diluição	Concentração não diluída média (log IU/mL)	Concentração média apresentada ^a (log IU/mL)	Diferença
1:3	1,68	1,89	-0,21
	1,69	1,69	0,00
	1,73	2,11	-0,38
	1,73	1,78	-0,05
	1,84	1,80	0,04
	2,30	2,23	0,07
	2,71	2,76	-0,05
	2,80	2,76	0,04
	3,22	3,28	-0,06
	3,80	3,71	0,09
	4,12	4,06	0,06
	4,21	4,07	0,14
	4,90	4,68	0,22
	6,94	6,72	0,22
	7,05	6,91	0,14
1:100	7,05	6,59	0,46
	> 8,00 (8,45) ^b	8,38	0,07

^a A concentração apresentada é o valor calculado depois de o factor de diluição ter sido aplicado.

^b Espécime ao qual foi adicionado um analito.

Nota: Todos os resultados > 8,00 log IU/mL foram calculados utilizando análise adicional.

Tabela 19: Diluição de amostras com Aptima Specimen Diluent – Soro

Factor de diluição	Concentração não diluída média (log IU/mL)	Concentração média apresentada ^a (log IU/mL)	Diferença
1:3	1,67	1,85	-0,18
	1,74	1,72	0,02
	1,86	1,66	0,20
	1,67	1,85	-0,18
	2,00	1,91	0,09
	2,51	2,37	0,14
	3,12	3,01	0,11
	3,29	3,35	-0,06
	3,70	3,53	0,17
	3,99 ^c	3,87	0,12
	4,35	4,30	0,05
	5,48	5,25	0,23
	5,74	5,62	0,12
	5,80	5,50	0,30
1:100	7,15	6,86	0,29
	> 8,00 (8,44) ^b	8,46	-0,02

^a A concentração apresentada é o valor calculado depois de o factor de diluição ter sido aplicado.

^b Espécime ao qual foi adicionado um analito.

^c Resultado de duas em três réplicas testadas. Uma réplica externa removida.

Nota: Todos os resultados > 8,00 log IU/mL foram calculados utilizando análise adicional.

Correlação de métodos

O desempenho do Aptima HCV Quant Dx Assay foi avaliado contra um ensaio de comparação com marcação CE através do teste de espécimes clínicos não diluídos de doentes infectados pelo HCV em três Panther Systems com quatro lotes de reagentes. Foi utilizado para a regressão linear um total de 1.058 amostras de plasma e soro (872 de plasma, 186 de soro) em todos os genótipos do HCV no intervalo linear, conforme mostrado na Figura 8.

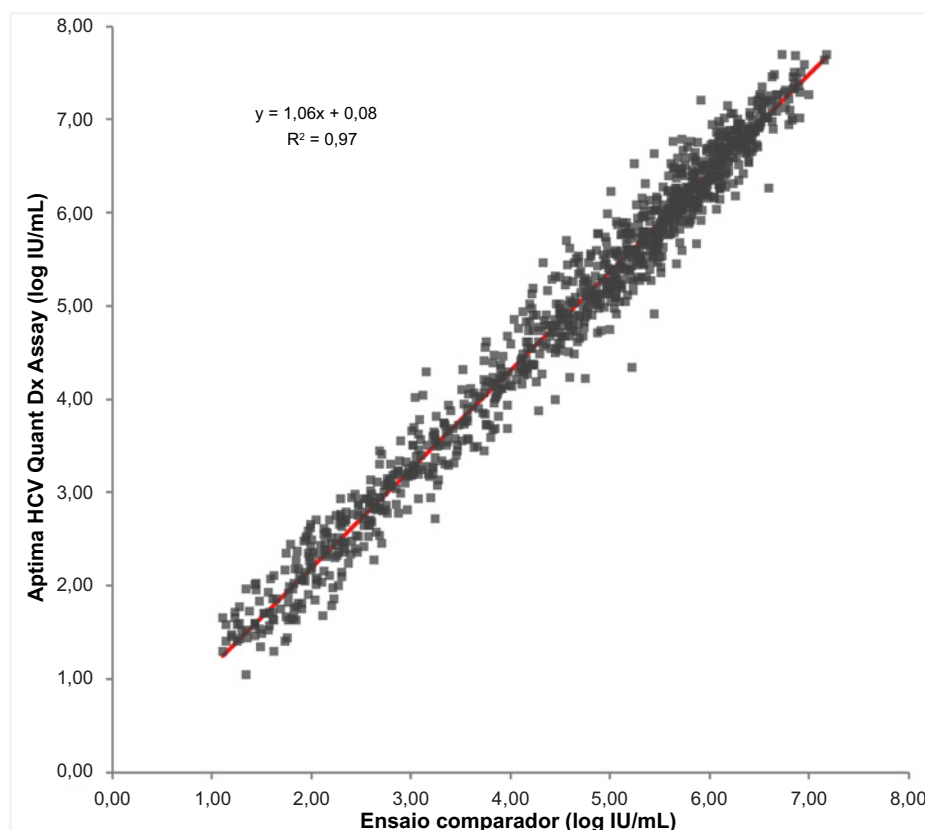


Figura 8. Correlação entre o Aptima HCV Quant Dx Assay e o ensaio de comparação

Concordância do diagnóstico

Para avaliar a concordância do diagnóstico, foram testados 227 espécimes de plasma e soro de indivíduos HCV positivos utilizando o Aptima HCV Quant Dx Assay e um ensaio qualitativo com marcação CE. Qualquer resultado que forneça um resultado quantificável ou detectável foi classificado como “Detectado.” Qualquer resultado de alvo não detectado foi classificado como “Alvo não detectado”. A concordância de diagnóstico entre os ensaios foi de 100%, conforme mostrado na Tabela 20.

Tabela 20: Concordância de diagnóstico entre o Aptima HCV Quant Dx Assay e o ensaio de comparação

		Aptima HCV Quant Dx Assay	
		Detectado	Alvo não detectado
Ensaio de comparação	Detectado	99	0
	Alvo não detectado	0	128

Contaminação por transferência

Para estabelecer que o Panther System minimiza o risco de resultados falso-positivos decorrentes de contaminação por transferência, foi realizado um estudo analítico com várias execuções utilizando os painéis com vírus adicionado em três Panther Systems. A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras de plasma com analito do Armored RNA (7 log IU/mL) dispersas entre amostras HCV negativas num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de quinze execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0,14% (1/704).

Painel de seroconversão

Foram testados onze conjuntos de painéis de seroconversão do HCV, totalizando 72 amostras. Os resultados do Aptima HCV Quant Dx foram comparados com os resultados de teste de anticorpos do HCV. O número de dias até ao primeiro resultado reactivo está listado na Tabela 21. O Aptima HCV Quant Dx Assay detectou a presença do HCV numa média de 20 dias antes dos testes de anticorpos.

Tabela 21: Resumo de dados do painel de seroconversão

ID do painel	Número de membros do painel testados	Número de membros do painel reactivos			Dias até ao primeiro resultado reactivo			Diferença em dias até ao primeiro resultado reactivo (com base na data da colheita)		
		Aptima HCV Quant Dx	Teste 1 dos anticorpos do HCV	Teste 2 dos anticorpos do HCV	Aptima HCV Quant Dx	Teste 1 dos anticorpos do HCV	Teste 2 dos anticorpos do HCV	Dias antes do teste 1 dos anticorpos do HCV	Dias antes do teste 2 dos anticorpos do HCV	
PHV911	4	4	3	3	3 ^a	14	14	11	11	
PHV913	4	4	0	2	0	9 ^b	7	9	7	
PH919	7	4	3	3	25	28	28	3	3	
PH920	9	9	7	6	0 ^c	13	16	13	16	
PH921	11	11	9	7	0	7	18	7	18	
PH923	6	6	2	2	0	21	21	21	21	
PH924	6	6	3	3	0	59	59	59	59	
PH925	5	5	1	1	0	27	27	27	27	
PH926	5	5	1	0	0	14	14 ^b	14	14	
6227	7	4	2	2	42	74	74	32	32	
6229	8	8	4	3	0	17	20	17	20	
Total	72	66	35	32				Média	19,36	20,73
								Mediana	14	18

O teste 1 de anticorpos HCV foi realizado com o Abbot HCV Prism Assay.

O teste 2 de anticorpos HCV foi realizado com o Ortho Enhanced SAVE Assay, com as seguintes excepções:

Os painéis 6.227 e 6.229, que foram testados com o Ortho ELISA Anti-HCV 3.0 Assay.

^aA primeira colheita não foi testada devido à indisponibilidade da amostra do fornecedor.

^bTodas as colheitas neste painel foram não reactivas para os anticorpos do HCV. O último dia da colheita foi utilizado como "Dias até ao primeiro resultado reactivo".

^cA segunda colheita não foi testada devido à indisponibilidade da amostra do fornecedor.

Bibliografia

1. Averhoff FM, Glass N and Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55 (S1): S10-15.
2. Current and Future Disease Progression of the Chronic HCV Population in the United States (2013) PLOS ONE Volume 8: Issue 5; 1-10.
3. Engle RE, Bukh J, Alter HJ et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797372> Transfusion-associated hepatitis before the screening of blood for hepatitis risk factors. *Transfusion*. 5 de Maio de 2014
4. Lee M-H, Yang, H-I, Yuan Y et al., Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2014; 20 (28): 9270-9280
5. Hepatitis C Viruses: Genome and Molecular Biology (2006); Horizon Biosciences
6. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. Jan de 2014;59(1):318-27.
7. EASL Recommendations on treatment of Hepatitis C 2014: www.easl.eu/_clinical-practice-guideline
8. AASLD and the Infectious Diseases Society of America (IDSA), in collaboration with the International Antiviral Society-USA (IAS-USA) 2014: www.hcvguidelines.org
9. CDC. Testing for HCV infection: An update for clinicians and laboratories. *MMWR* 2013; 62 (18)
10. Rutter, K, Hofer H, Beinhardt, S et al., Durability of SVR in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon- α 2a/ribavirin in combination with a direct acting antiviral. *Aliment Pharmacol Ther*. Jul de 2013;38(2):118-23.
11. Treatment of Hepatitis C, A Systemic Review (2014) *JAMA* Volume 312: No.6; 631-640.
12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30; 956-61
13. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. Management of Hepatitis C: 2002; 19 (3):1-46
14. Peiffer K-H and Sarrazin C. The importance of HCV RNA measurement in tailoring treatment duration: *Digestive and Liver Disease* 45S (2013) S323-S331.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
16. **29 CFR Part 1910.1030**. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
17. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health**. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
19. **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.
20. **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.



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

Apoio ao Cliente: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Assistência Técnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

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



Hologic BVBA
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

HOLOGIC, Aptima, Panther e logótipos associados são marcas comerciais ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respectivas subsidiárias nos EUA e/ou em outros países.

Armored RNA é uma marca comercial da Asuragen, Inc.

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

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

© 2015-2019 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-13249-601 Rev. 005
2019-04