

EBV Quant Assay (Panther Fusion™)

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

ÍNDICE

Informações gerais	2
Utilização prevista	2
Resumo e explicação do teste	2
Princípios do procedimento	2
Advertências e precauções	3
Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes	6
Colheita, processamento e conservação de espécimes	7
Amostras dentro do Panther Fusion System	8
Transporte de espécimes	8
Panther Fusion System	9
Reagentes e materiais fornecidos	9
Materiais necessários, mas disponíveis em separado	10
Materiais opcionais	11
Procedimento de teste no Panther Fusion System	11
Notas sobre o procedimento	16
Controlo de qualidade	17
Calibração do ensaio	17
Controlos negativo e positivo	17
Controlo interno	17
Interpretação de resultados	18
Limitações	19
Desempenho	20
Limite de deteção utilizando o 1.º padrão internacional da OMS	20
Intervalo linear	21
Limite inferior de quantificação utilizando o 1.º padrão internacional da OMS	22
Confirmação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do EBV	24
Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS	25
Precisão no laboratório	27
Substâncias potencialmente interferentes	27
Especificidade analítica	29
Correlação de métodos	30
Contaminação por transferência/cruzada	31
Bibliografia	32
Informações de contacto	33

Informações gerais

Utilização prevista

O Panther Fusion™ EBV Quant Assay é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* de PCR em tempo real (RT-PCR) totalmente automatizado para a quantificação do DNA de vírus Epstein-Barr (EBV) em espécimes de plasma em EDTA e sangue total humanos.

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

O Panther Fusion EBV Quant Assay não se destina a ser utilizado como um ensaio de rastreio à presença de EBV no sangue ou derivados do sangue. Este ensaio foi concebido para ser usado no Panther Fusion System.

Resumo e explicação do teste

O EBV é um vírus de DNA de cadeia dupla linear, ubíquo de 172 kb que pertence à família dos herpesvírus. Existem dois genótipos de EBV principais: os tipos 1 e 2, distinguidos pelas diferenças no gene EBNA-2.

Após uma infeção primária, o EBV entra nos linfócitos B circulantes e permanece num estado latente a partir daí. Estima-se que 90% da população mundial esteja infetada com EBV.¹ Em indivíduos imunocompetentes, a infeção por EBV pode ser assintomática durante a infância. No entanto, a infeção por EBV pode conduzir a mononucleose infecciosa² em adultos e está associada a diferentes tipos de cancros: linfomas, leucemias, neoplasias epiteliais e cancro gástrico.³

Em indivíduos imunocomprometidos, tais como recetores de transplantes e indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a reativação do EBV pode resultar em linfoproliferação maligna e é uma causa importante de morbidade e mortalidade. A maioria destes tumores associados ao EBV, conhecido por “doença linfoproliferativa pós transplante” (PTLD, post-transplant lymphoproliferative disease), ocorre frequentemente no primeiro ano após o transplante.³

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos quantitativos de espécimes de sangue total ou plasma são o método preferencial para a monitorização de infeção por EBV e de doença em recetores de transplantes, pois são rápidos, sensíveis, cómodos e não invasivos. As orientações recentes recomendam uma monitorização semanal da carga viral de EBV para sustentar decisões de iniciar a terapêutica anti-EBV e monitorizar a resposta à terapêutica.⁴

Geralmente, valores de carga viral mais elevados estão correlacionados com um maior risco de doença relacionada com EBV.⁵ Assim, a quantificação do DNA de EBV, em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores laboratoriais, é essencial para o tratamento de doentes com infeção por EBV.

Princípios do procedimento

O Panther Fusion System automatiza completamente o processamento de espécimes, incluindo a lise celular, bem como a captura, amplificação e deteção do ácido nucleico para o Panther Fusion EBV Quant Assay. O Panther Fusion EBV Quant Assay tem como alvo o gene EBNA-1 altamente conservado para garantir uma quantificação exata do DNA de EBV. O ensaio está padronizado de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC: 09/260) para o EBV.⁶

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

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

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

O Panther Fusion System fornece um valor de Ct proporcional à concentração de EBV nas amostras dos testes. A concentração da amostra é determinada pelo software do Panther Fusion System utilizando os valores de Ct de EBV para cada reação e comparando-os à curva de calibração. Os resultados de EBV são indicados em UI/ml e \log_{10} UI/ml para os espécimes de sangue total e plasma. Quando o fator de conversão de sangue total é selecionado no software do Panther Fusion, é automaticamente aplicado um fator de diluição de 4 aos resultados da carga viral de EBV para representar o passo de diluição durante o processamento de espécimes de sangue total.

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

Alvo	Gene-alvo	Canal do instrumento
EBV	EBNA-1	HEX
Controlo interno	Não aplicável	Quasar 705

Advertências e precauções

- Para efeitos de diagnóstico *in vitro*.
- Para uso profissional.
- Leia atentamente todo o folheto informativo e o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* antes de executar este ensaio.
- O reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) é corrosivo, nocivo por ingestão e provoca queimaduras cutâneas e lesões oculares graves.
- Estes procedimentos só devem ser executados por pessoal com a respetiva formação profissional na utilização deste ensaio e no manuseamento de materiais potencialmente infecciosos. Se ocorrer um derrame, desinfete imediatamente, respeitando os procedimentos locais apropriados.

- F. Os espécimes podem ser infecciosos. Respeite as precauções universais quando realizar este ensaio. A administração do laboratório deve estabelecer métodos adequados de manuseamento e eliminação. Este procedimento de diagnóstico só pode ser feito por pessoal com a formação profissional adequada em manuseamento de materiais infecciosos.⁷
- G. Tome todas as precauções laboratoriais de rotina. Não pipete com a boca. Não coma, não beba, nem fume nas áreas de trabalho designadas. Use luvas descartáveis e isentas de pó, proteção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes. Lave muito bem as mãos depois de manusear espécimes e reagentes.
- H. Use somente os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- I. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento devem ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).
- J. Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com espécimes e reagentes, e faça-o de acordo com os regulamentos locais, nacionais e internacionais aplicáveis.
- K. Mantenha as condições de conservação adequadas durante o transporte de espécimes, para garantir a integridade do espécime. A estabilidade do espécime noutras condições de transporte que não as recomendadas não foi avaliada.
- L. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento de espécimes. Tenha especial cuidado para evitar a contaminação por disseminação de aerossóis quando desapertar ou destapar espécimes. Os espécimes podem conter níveis extremamente elevados de vírus ou outros organismos. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e elimine os materiais usados sem passá-los por cima de quaisquer recipientes abertos. Mude de luvas se estas entrarem em contacto com espécimes.
- M. Não use os reagentes, calibradores ou controlos depois da respetiva data de expiração. Não utilize o Aptima™ Whole Blood Diluent Tube após a respetiva data de expiração.
- N. Conserve os componentes de ensaio nas condições de conservação recomendadas. Consulte *Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes e Procedimento de teste no Panther Fusion System* para obter mais informações.
- O. Não combine quaisquer reagentes ou fluidos de ensaio. Não reabasteça reagentes ou fluidos; o Panther Fusion System verifica os níveis de reagente.
- P. Evite a contaminação microbiana ou com nuclease dos reagentes.
- Q. Os requisitos de controlo de qualidade devem ser respeitados em conformidade com os regulamentos locais e/ou nacionais, ou requisitos de certificação, e os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório.
- R. Não use o cartucho de ensaio se a bolsa de conservação perder o selo, ou se a película do cartucho de ensaio não estiver intacta. Contacte o Suporte Técnico da Hologic em qualquer um dos casos.
- S. Não utilize os pacotes de fluidos se o selo de alumínio não estiver intacto. Contacte o Suporte Técnico da Hologic caso isto aconteça.
- T. Manuseie os cartuchos de ensaio com cuidado. Não deixe que os cartuchos de ensaio caiam ou invertam. Evite a exposição prolongada à luz ambiente.

U. Alguns reagentes deste kit estão marcados com símbolos de risco e segurança.

Nota: A informação sobre a comunicação de perigos reflete as classificações das Fichas de dados de segurança (SDS) da União Europeia. Para consultar informações de comunicação de perigos específicas da sua região, consulte a respetiva Ficha de dados de segurança na Biblioteca de Fichas de dados de segurança em: www.hologicsds.com.

Informações de perigos para a UE	
	<p>Cartucho do Panther Fusion EBV Quant Assay ALFA-CICLODEXTRINA 20-25%</p> <p>— —</p> <p>H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros P273 - Evitar a libertação para o ambiente P280 - Usar proteção ocular/proteção facial</p>
	<p>Óleo Panther Fusion POLIDIMETILSILOXANO, 100%</p> <p>ADVERTÊNCIA H315 - Provoca irritação cutânea H319 - Provoca irritação ocular grave</p>
	<p>Reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) MONOIDRATO DE HIDRÓXIDO DE LÍTIO a 5-10%</p> <p>PERIGO H302 - Nocivo por ingestão H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis P280 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial P303 + P361 + P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada; enxaguar a pele com água/tomar um duche. P305 + P351 + P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. P310 - Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico</p>
	

Requisitos de conservação e manuseamento de reagentes

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

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

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

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

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

- B. O reagente de captura de trabalho B Panther Fusion (wFCR-B) e o reagente estimulador B Panther Fusion (FER-B) são estáveis durante 60 dias quando tapados e conservados a 15 °C a 30 °C. Não refrigere.
- C. Elimine quaisquer reagentes não usados que tenham ultrapassado a sua estabilidade.
- D. Evite a contaminação cruzada durante o manuseamento e conservação de reagentes.
- E. **Não congele os reagentes.**
- F. **Não volte a congelar os controlos nem os calibradores.**

Colheita, processamento e conservação de espécimes

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

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

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

Nota: *Tome cuidado para evitar a contaminação cruzada durante as etapas de manuseamento de espécimes. Por exemplo, elimine o material usado sem passar por cima de tubos abertos.*

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

A. Colheita de espécimes

Para preparar plasma, podem ser utilizados espécimes de sangue total colhidos nos seguintes tubos de vidro ou plástico:

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

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

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

Tabela 1: Volume mínimo de amostra

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

Se não for testado imediatamente, o plasma pode ser conservado de acordo com as especificações descritas em *Condições de conservação de espécimes*. Se for transferido para um tubo secundário, o plasma pode ser congelado a -20 °C ou -70 °C. Não congele espécimes de plasma em tubos de colheita primários EDTA.

2. O sangue total tem de ser processado utilizando tubos com diluente de sangue total pré-cheios antes de ser testado no Panther Fusion System. Para mais informações, consulte *Manuseamento de espécimes de sangue total*.

C. Condições de conservação de espécimes

Os espécimes podem ser conservados numa das seguintes condições:

1. Estabilidade do plasma

- Os espécimes não processados são estáveis durante 24 horas de 2 °C a 30 °C após a centrifugação.
- Os espécimes não processados são estáveis durante 5 dias de 2 °C a 8 °C após a centrifugação.
- Os espécimes não processados e processados são estáveis durante 60 dias a -20 °C ou -70 °C.

2. Estabilidade do sangue total

- Os espécimes não processados são estáveis durante 36 horas de 2 °C a 30 °C.
- Os espécimes não processados são estáveis durante 5 dias de 2 °C a 8 °C.
- Os espécimes não processados e processados são estáveis durante 60 dias a -20 °C ou -70 °C.

Amostras dentro do Panther Fusion System

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

Transporte de espécimes

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

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

Panther Fusion System

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

Reagentes e materiais fornecidos

Embalagem do ensaio

Componentes	Referência	Conservação
Calibradores do Panther Fusion EBV Quant Assay		
PCAL 1 qEBV, 3 por caixa	PRD-07159	-15 °C a -35 °C
PCAL 2 qEBV, 3 por caixa		
PCAL 3 qEBV, 3 por caixa		
PCAL 4 qEBV, 3 por caixa		
PCAL 5 qEBV, 3 por caixa		
Controlos do Panther Fusion EBV–BKV Quant Assay		
HPC, Tubo de controlo positivo alto, 5 por caixa	PRD-07158	-15 °C a -35 °C
LPC, Tubo de controlo positivo baixo, 5 por caixa		
NC III, Tubo de controlo negativo de transplante, 5 por caixa		
Cartucho do Panther Fusion EBV Quant Assay 96 testes		
Cartucho do Panther Fusion qEBV Assay, 12 testes, 8 por caixa	PRD-07157	2 °C a 8 °C
Controlo interno B Panther Fusion 960 testes		
Tubo de controlo interno B Panther Fusion, 4 por caixa	PRD-06234	2 °C a 8 °C
Reagente de extração B Panther Fusion 960 testes		
Frasco de reagente de captura B Panther Fusion, 240 testes, 4 por caixa	PRD-06232	15 °C a 30 °C
Frasco de reagente estimulador B Panther Fusion, 240 testes, 4 por caixa		
Tampão de eluição Panther Fusion, 2400 testes		
Embalagem do tampão de eluição Panther Fusion, 1200 testes, 2 por caixa	PRD-04334	15 °C a 30 °C
Tampão de reconstituição I Panther Fusion, 1920 testes		
Tampão de reconstituição I Panther Fusion, 960 testes, 2 por caixa	PRD-04333	15 °C a 30 °C
Reagente de óleo Panther Fusion, 1920 testes		
Reagente de óleo Panther Fusion, 960 testes, 2 por caixa	PRD-04335	15 °C a 30 °C

Materiais necessários, mas disponíveis em separado

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

Material	Código produto
Panther System	303095
Módulo Panther Fusion	PRD-04173
Panther Fusion System	PRD-04172
Kit de fluidos Aptima Assay (Solução de lavagem Aptima, tampão para o fluido de desativação Aptima e reagente de óleo Aptima)	303014 (1000 testes)
Unidades multitubos (MTUs)	104772-02
Kit de sacos de resíduos Panther	902731
Tampa do recipiente de resíduos Panther	504405
Ou o Kit de execução do Panther System contém MTUs, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, fluidos de ensaio e reagentes Auto Detect*	303096 (5000 testes)
Pontas, 1000 µl, com filtro, detecção de líquido, condutoras e descartáveis: <i>Nem todos os produtos estão disponíveis em todas as regiões. Contacte o seu representante para obter informações específicas da região.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Tabuleiros de tubos Panther Fusion, 1008 testes, 18 por caixa	PRD-04000
Tubos com diluente de sangue total (apenas para o processamento de espécimes de sangue total)	PRD-06783 (100 tubos pré-cheios por embalagem)
Tampas rígidas de substituição Hologic (tampa de tubo de utilização única)	PRD-06720 (100 tampas por embalagem)
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio de 5% a 8,25% (0,7 M a 1,16 M)	—
Luvas descartáveis e isentas de pó	—
Coberturas de bancada laboratorial com forro de plástico	—
Toalhetes que não larguem pelos	—
Pipetador	—
Pontas	—
Opções de tubos de colheita primários (EDTA e PPT): 13 mm x 100 mm 12 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	—
Centrífuga	—
Misturador vórtex	—

*Somente necessário para ensaios Panther Aptima TMA.

Materiais opcionais

Material	Código produto
Opções de tubo secundário:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Tubos de alíquotas de espécime Aptima (SATs) (100 por embalagem)	503762
Tampa de tubo de transporte (100 por embalagem) <i>tampa para SAT</i>	504415
Diluyente de espécimes Aptima	PRD-03003
Kit de diluyente de espécimes Aptima <i>contém diluyente de espécimes Aptima, 100 SATs e 100 tampas</i>	PRD-03503
Pipetas de transferência	—
Dispositivo de agitação de tubos por oscilação	—

Procedimento de teste no Panther Fusion System

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

A. Preparação da área de trabalho

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

B. Preparação dos calibradores e dos controlos

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

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

Opção. Os tubos de calibrador e controlo podem ser colocados num dispositivo de agitação de tubos por oscilação para misturar bem. Certifique-se de que o conteúdo do tubo está totalmente descongelado antes da utilização.

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

2. Quando o conteúdo do tubo tiver descongelado, seque a parte de fora do tubo com um toalhete descartável, limpo e seco.

3. Para prevenir a contaminação, não abra os tubos agora.

C. Preparação de reagentes

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

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

D. Manuseamento de espécimes

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

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

E. Manuseamento de espécimes de plasma

1. Certifique-se de que os espécimes processados em tubos primários ou os espécimes não diluídos em tubos secundários são conservados corretamente de acordo com *Colheita, processamento e conservação de espécimes*.
2. Assegure-se de que os espécimes congelados estejam totalmente descongelados. Coloque no vórtex os espécimes descongelados durante 3 a 5 segundos para misturar totalmente.
3. Deixe os espécimes atingir uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento. Consulte *Amostras dentro do Panther Fusion System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.
4. Certifique-se de que cada tubo primário ou secundário contém espécime adequado. Consulte a Tabela 1 para obter o volume mínimo de amostra para 1 réplica.
5. Imediatamente antes de carregar os espécimes num suporte de amostras, centrifugue cada espécime de 1000 a 3000 g durante 10 minutos. Não remova as tampas neste passo. Consulte o passo G.2 abaixo para obter informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

F. Manuseamento de espécimes de sangue total

1. Certifique-se de que os espécimes em tubos primários são conservados corretamente de acordo com *Colheita, processamento e conservação de espécimes*.
2. Assegure-se de que os espécimes congelados estejam totalmente descongelados. Deixe os espécimes atingir uma temperatura de 15 °C a 30 °C antes do processamento. Consulte *Amostras dentro do Panther Fusion System* para obter mais informações sobre produtos dentro do instrumento.

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 homogêneo.
4. Antes do carregamento no sistema, efetue o procedimento seguinte em cada espécime.
 - a. O sangue nos tubos primários deve ser minuciosamente 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 informações sobre o carregamento do suporte e a remoção das tampas.

G. Preparação do sistema

1. Para obter instruções sobre como configurar o Panther Fusion System, incluindo sobre como carregar amostras, reagentes, cartuchos de ensaio e fluidos universais, consulte o *Manual de instruções do Panther/Panther Fusion System* e as *Notas sobre o procedimento*.
2. Carregue as amostras no respetivo suporte. Execute os seguintes passos para cada tubo de amostra (espécime e, quando necessário, calibradores e controlos):
 - a. Desaperte a tampa de um tubo de amostra, mas não a remova já.

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

- b. Carregue o tubo de amostra no respetivo suporte.
- c. Repita os passos 2.a e 2.b para cada amostra restante.
- d. Depois de as amostras terem sido carregadas no suporte de amostras, remova e elimine a tampa de cada tubo de amostra num suporte de amostras. Para evitar a contaminação, não passe uma tampa sobre quaisquer outros suportes de amostras ou tubos de amostras.
- e. Se necessário, use uma pipeta de transferência descartável e nova para remover quaisquer bolhas ou espuma. A existência de bolhas no tubo compromete o sensor de nível do Panther Fusion System.
- f. Quando a última tampa tiver sido removida, carregue o suporte de amostras na zona de amostras.

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

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

H. Preparação do sistema: aplicar o fator de conversão de espécimes de 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 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:

- 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.
- Selecione **Dilute All (Diluir todos)**.

Aparece a janela *Dilution Factor* (Fator de diluição) (Figura 1).

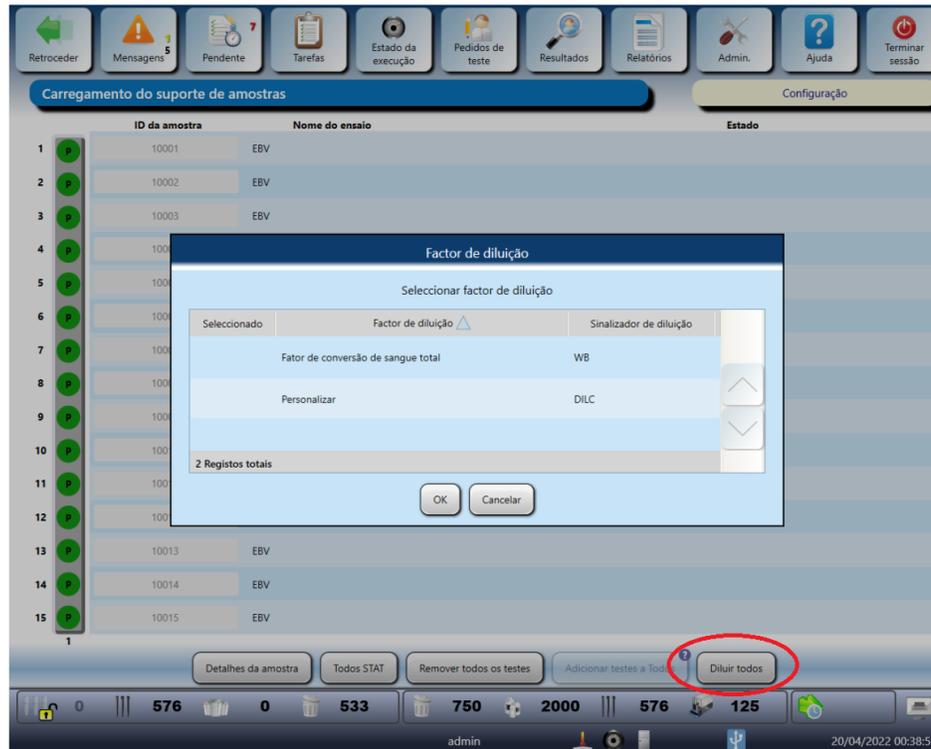


Figura 1. A janela Dilution Factor (Fator de diluição) no ecrã Sample Rack Loading (Carregamento do suporte de amostras) (Exemplo)

- Selecione **Whole Blood Conversion Factor (Fator de conversão de sangue total)**.
- Selecione **OK**.

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

- 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 Figura 2):

- 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.

- No ecrã *Sample Rack Loading* (Carregamento do suporte de amostras), faça duplo clique no espécime relevante.

Aparece o ecrã *Sample Details* (Detalhes da amostra) com os pedidos de teste atuais para o espécime selecionado.

- c. Selecione o pedido de teste relevante no painel *Test Orders* (Pedidos de teste).
- d. Selecione **Apply Dilution** (Aplicar diluição).

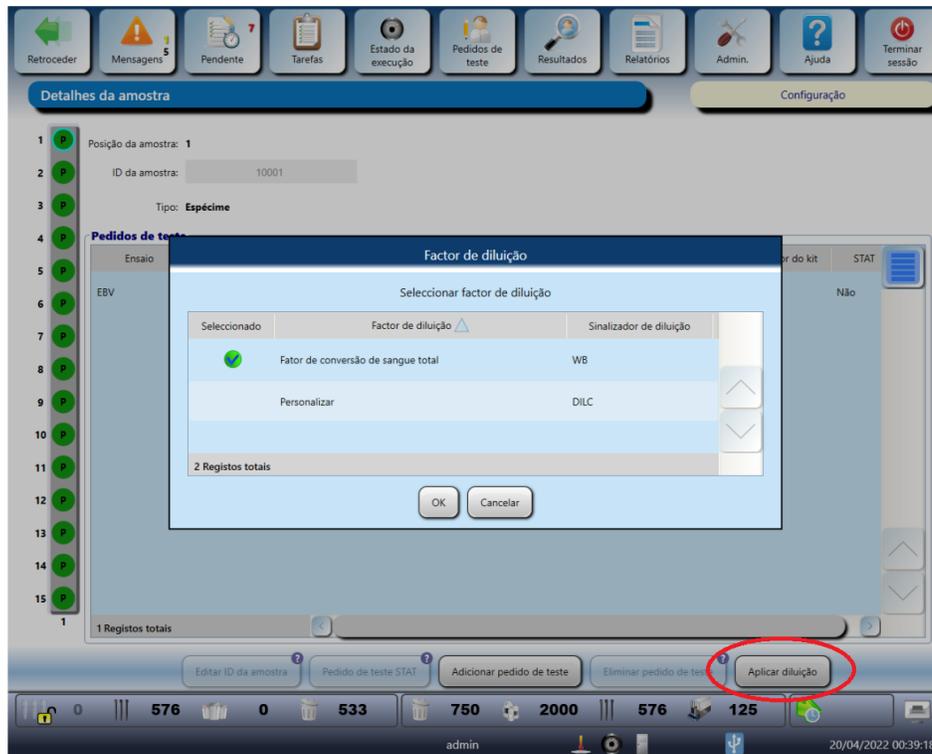


Figura 2. A janela Dilution Factor (Fator de diluição) no ecro Sample Details (Detalhes da amostra) (Exemplo)

- 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 ecro *Sample Rack Bay* (Zona dos suportes de amostras), faça duplo clique no suporte relevante.

é apresentado o ecro *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 **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. Calibradores e controlos

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

Controlo de qualidade

Calibração do ensaio

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

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

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

Controlos negativo e positivo

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

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

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

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

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

Controlo interno

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

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

Interpretação de resultados

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

Tabela 2: Interpretação de resultados do plasma

Resultados do EBV Quant Assay apresentados		
UI/ml	Valor \log_{10}	Interpretação
Não detetado	Não detetado	DNA do EBV não detetado.
< 120 detetado	< 2,08	O DNA do EBV é detetado, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLOQ).
120 a 1,50E09	2,08 a 9,18	A concentração de DNA do EBV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLOQ e o ULOQ UI/ml.
> 1,50E09	> 9,18	A concentração de DNA do EBV situa-se acima do limite superior de quantificação (ULOQ).
Inválido ^a	Inválido ^a	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

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

Tabela 3: Interpretação de resultados do sangue total

Resultados do EBV Quant Assay apresentados		
UI/ml	Valor \log_{10}	Interpretação
Não detetado	Não detetado	DNA do EBV não detetado.
< 350 detetado	< 2,54	O DNA do EBV é detetado, mas a um nível inferior ao limite inferior de quantificação (LLOQ).
350 a 6,0E09	2,54 a 9,78	A concentração de DNA do EBV situa-se dentro do intervalo quantitativo entre o LLOQ e o ULOQ UI/ml.
> 6,0E09	> 9,78	A concentração de DNA do EBV situa-se acima do limite superior de quantificação (ULOQ).
Inválido ^a	Inválido ^a	Ocorreu um erro na produção do resultado. O espécime deve ser novamente testado.

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

Limitações

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

Desempenho

Limite de detecção utilizando o 1.º padrão internacional da OMS

O limite de detecção (LoD) do ensaio é definido como a concentração de DNA do EBV que é detetada com uma probabilidade igual ou superior a 95% de acordo com a norma CLSI EP17-A2.⁸

Limite de detecção utilizando os padrões da OMS no plasma

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC 09/260) para EBV diluído em plasma humano EBV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 4 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Panther Fusion EBV Quant Assay utilizando o 1.º padrão internacional da OMS é 54,1 UI/ml para o plasma.

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

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)
10%	1,5
20%	2,4
30%	3,6
40%	5,1
50%	7,2
60%	10,2
70%	14,8
80%	22,4
90%	38,0
95%	54,1

Limite de detecção utilizando os padrões da OMS no sangue total

O LoD foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS para EBV diluído em sangue total EBV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Realizou-se a análise Probit para gerar os limites de detecção previstos. Os valores de LoD mostrados na Tabela 5 são os resultados do lote de reagentes com o limite de detecção previsto mais elevado. O LoD do Panther Fusion EBV Quant Assay utilizando o 1.º padrão internacional da OMS é 200,9 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 EBV

Limite de detecção previsto	Concentração (UI/ml)
10%	4,9
20%	6,7
30%	9,1
40%	12,6
50%	17,8
60%	26,1
70%	40,2
80%	67,0
90%	129,6
95%	200,9

Intervalo linear

Intervalo linear no plasma

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do EBV diluído em plasma humano EBV-, de acordo com a norma CLSI EP06-A.º A concentração dos painéis variou entre 1,98 log UI/ml e 9,26 log UI/ml. O Panther Fusion EBV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 9,18 log UI/ml conforme mostrado na Figura 3.

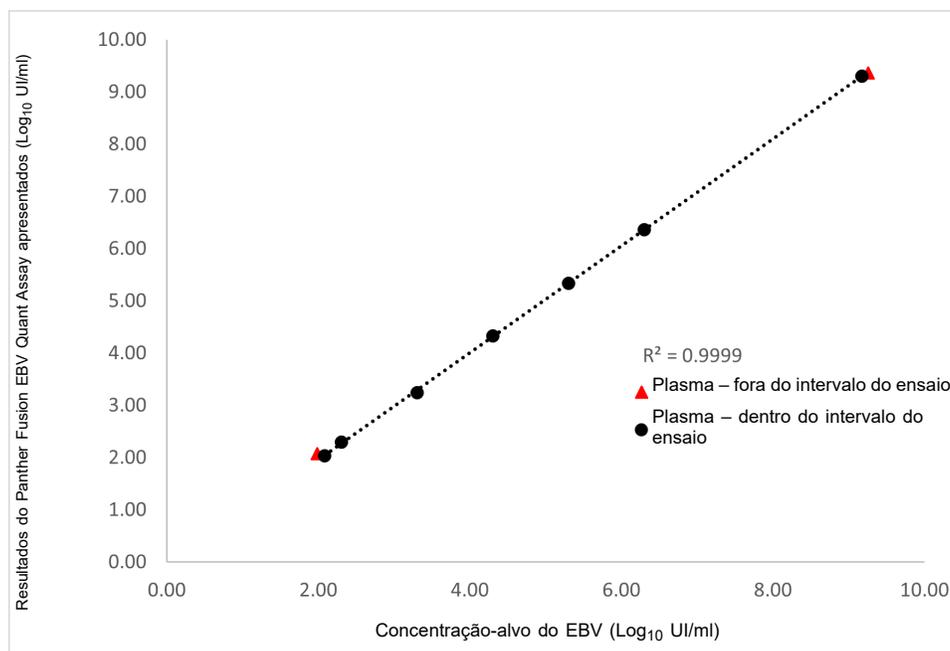


Figura 3. Linearidade no plasma

Intervalo linear no sangue total

O intervalo linear foi estabelecido através do teste de painéis do EBV diluído em sangue total humano EBV-, de acordo com a norma CLSI EP06-A.⁹ A concentração dos painéis variou entre 2,45 log UI/ml a 9,86 log UI/ml. O Panther Fusion EBV Quant Assay demonstrou linearidade em todo o intervalo testado. O limite superior de quantificação (ULoQ) do ensaio é 9,78 log UI/ml conforme mostrado na Figura 4.

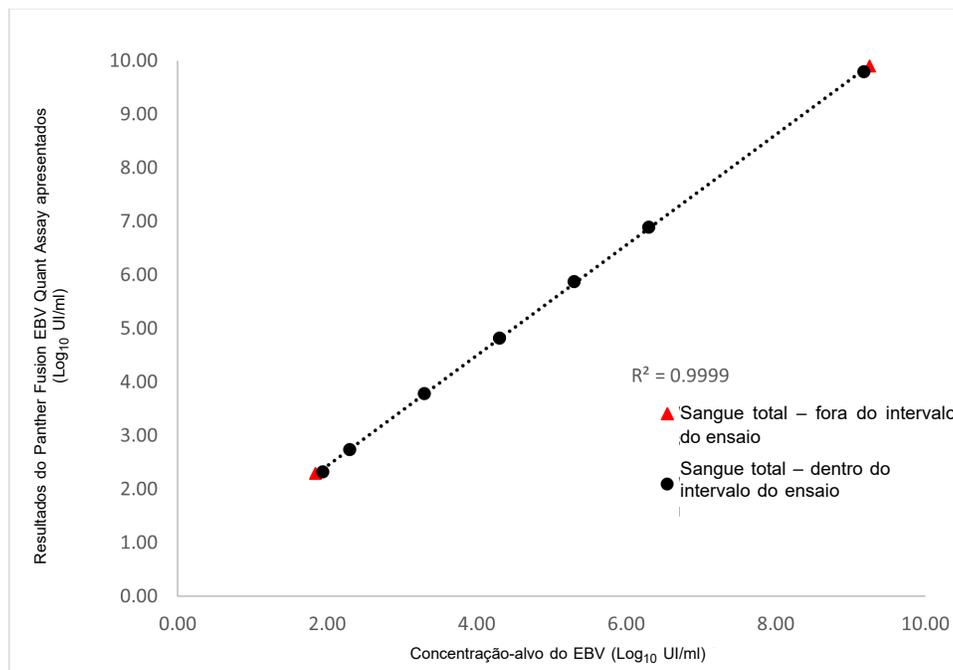


Figura 4. Linearidade no sangue total

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 EBV é quantificado com fiabilidade, de acordo com a norma CLSI EP17-A2.⁸ O erro total foi calculado utilizando o modelo de Westgard: Erro Total (ET) = |desvio sistemático| + 2 DP. Para garantir a exatidão e a precisão das medições, o Erro Total do Panther Fusion EBV Quant Assay foi definido para 1,2 log UI/ml, com um desvio sistemático em relação ao real e um DP que tem de ser ≤ 0,5 log UI/ml e ≤ 0,35 log UI/ml, respetivamente.

Limite inferior de quantificação utilizando o padrão da OMS no plasma

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC 09/260) para EBV diluído em plasma humano EBV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Os resultados do LLoQ para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 6. O LLoQ gerado com o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV no plasma é 120 UI/ml (2,08 log UI/ml).

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

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	EBV Quant Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)	ET calculado (log UI/ml)
1	20	20	1,93	2,06	0,21	0,2	0,6
	20	20	2,08	2,33	0,21	0,3	0,7
	20	20	2,18	2,45	0,13	0,3	0,5
	20	20	2,26	2,44	0,15	0,2	0,5
2	20	20	1,93	1,61	0,30	0,3	0,9
	20	20	2,08	1,79	0,23	0,3	0,8
	20	20	2,18	2,00	0,18	0,2	0,6
	20	20	2,26	2,09	0,17	0,2	0,5
3	20	20	1,93	1,75	0,20	0,2	0,6
	20	20	2,08	1,88	0,25	0,2	0,7
	20	20	2,18	2,09	0,12	0,1	0,4
	20	20	2,26	2,04	0,15	0,2	0,5

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

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

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

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

O LLoQ foi determinado testando painéis do 1.º padrão internacional da OMS (código NIBSC 09/260) para EBV diluído em sangue total humano EBV-. Foram testadas vinte (20) réplicas de cada diluição com cada um dos três lotes de reagentes, perfazendo um total de 60 réplicas por diluição. Os resultados do LLoQ para os três lotes de reagentes são apresentados na Tabela 7. O LLoQ gerado com o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV no sangue total é 350 UI/ml (2,54 log UI/ml).

Tabela 7: Determinação do LLoQ utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV diluído em sangue total

Lote de reagente	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	EBV Quant		Desvio sistemático (log UI/ml)	ET calculado (log UI/ml)
				Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)		
1	20	18	2,40	2,48	0,30	0,3	0,9
	20	20	2,48	2,40	0,33	0,3	0,9
	20	20	2,54	2,50	0,30	0,2	0,8
	20	20	2,62	2,51	0,34	0,3	1,0
2	20	19	2,40	1,94	0,39	0,5	1,2
	20	20	2,48	1,94	0,36	0,5	1,3
	20	20	2,54	2,06	0,26	0,5	1,0
	20	19	2,62	2,16	0,19	0,5	0,9
3	20	20	2,40	1,84	0,48	0,60	1,5
	20	19	2,48	1,90	0,32	0,60	1,2
	20	20	2,54	2,12	0,26	0,40	0,9
	20	20	2,62	2,25	0,29	0,40	1,0

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

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

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

Confirmação do limite inferior de quantificação em vários genótipos do EBV

Limite inferior de quantificação em vários genótipos no plasma

O LLoQ estabelecido utilizando o padrão da OMS foi avaliado testando os genótipos do EBV 1 (Raji, Akata e B95-8) e 2 (AG876, P3H1 e Jijoye) enriquecidos a 3X o LLoQ em plasma humano EBV-. Foram testadas três réplicas de cada membro do painel com um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Confirmação do LLoQ em vários genótipos no plasma

Isolado (genótipo)	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	EBV Quant		Desvio sistemático (log UI/ml)
				Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)	
Raji (genótipo 1)	3	3	2,56	2,84	0,12	0,3
Akata (genótipo 1)	3	3	2,56	2,95	0,11	0,4
B95-8 (genótipo 1)	3	3	2,56	2,59	0,08	0,1
AG876 (genótipo 2)	3	3	2,56	2,72	0,23	0,2
P3H1 (genótipo 2)	3	3	2,56	2,91	0,07	0,4
Jijoye (genótipo 2)	3	3	2,56	2,75	0,16	0,2

DP=desvio padrão.

Limite inferior de quantificação em vários genótipos no sangue total

O LLoQ estabelecido utilizando o padrão da OMS foi avaliado testando os genótipos do EBV 1 (isolados Raji, Akata e B95-8) e o genótipo 2 (isolados AG876, P3H1 e Jijoye) enriquecidos a 3X o LLoQ em sangue total humano EBV-. Foram testadas três réplicas de cada membro do painel com um lote de reagente. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Confirmação do LLoQ em vários genótipos no sangue total

Isolado (genótipo)	N	N detetado	Concentração-alvo (log UI/ml)	EBV Quant Assay (log UI/ml)	DP (log UI/ml)	Desvio sistemático (log UI/ml)
Raji (genótipo 1)	3	3	3,02	3,12	0,06	0,1
Akata (genótipo 1)	3	3	3,02	2,95	0,05	0,1
B95-8 (genótipo 1)	3	3	3,02	3,09	0,11	0,1
AG876 (genótipo 2)	3	3	3,02	3,14	0,08	0,1
P3H1 (genótipo 2)	3	3	3,02	3,45	0,10	0,4
Jijoye (genótipo 2)	3	3	3,02	3,01	0,24	0,2

DP=desvio padrão.

Rastreabilidade ao 1.º Padrão Internacional da OMS

Durante o desenvolvimento e o fabrico do produto, foi utilizada uma série de padrões secundários com concentrações conhecidas para estabelecer a rastreabilidade ao padrão da OMS. O 1.º padrão da OMS para o EBV foi diluído e testado juntamente com os padrões secundários, bem como controlos do ensaio e calibradores utilizados no Panther Fusion EBV Quant Assay para avaliar a rastreabilidade de acordo com a norma CLSI EP32-R.¹⁰ A concentração dos padrões secundários variou entre 2,30 e 6,30 log₁₀ UI/ml.

Rastreabilidade ao padrão da OMS utilizando plasma

As concentrações testadas para o 1.º padrão da OMS para o EBV variaram entre 2,26 e 4,70 log₁₀ UI/ml. Os painéis de plasma da OMS, os padrões secundários, os controlos do ensaio e os calibradores do ensaio recuperaram conforme esperado, em todo o intervalo linear do ensaio, como se pode observar na Figura 5.

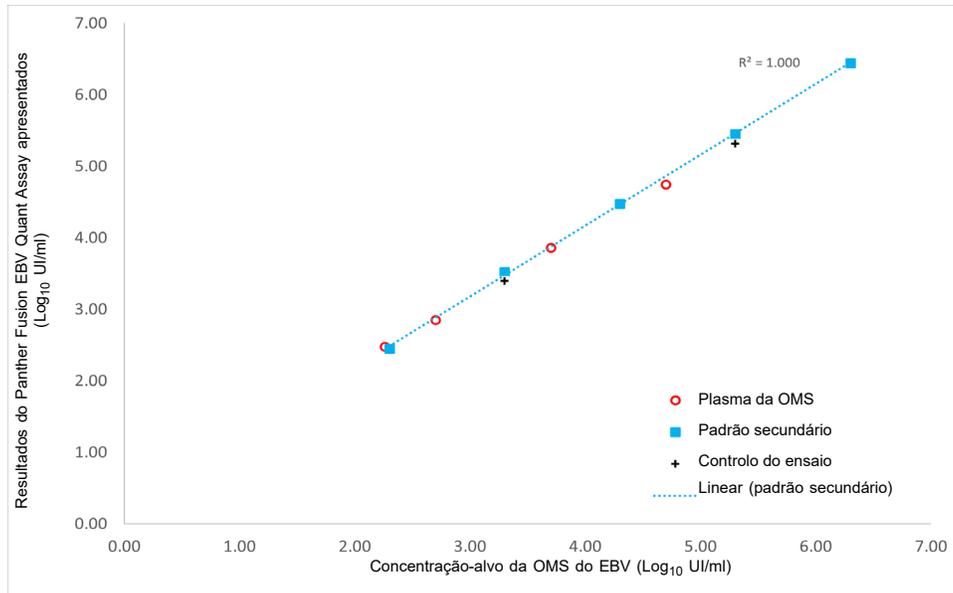


Figura 5. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º padrão da OMS para o EBV e as concentrações apresentadas no Panther Fusion EBV Quant Assay (padrão da OMS diluído em plasma)

Rastreabilidade ao Padrão da OMS utilizando sangue total

As concentrações testadas para o 1.º padrão da OMS para o EBV em sangue total variaram entre 2,72 e 5,30 log₁₀ UI/ml. Os painéis de sangue total 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 6.

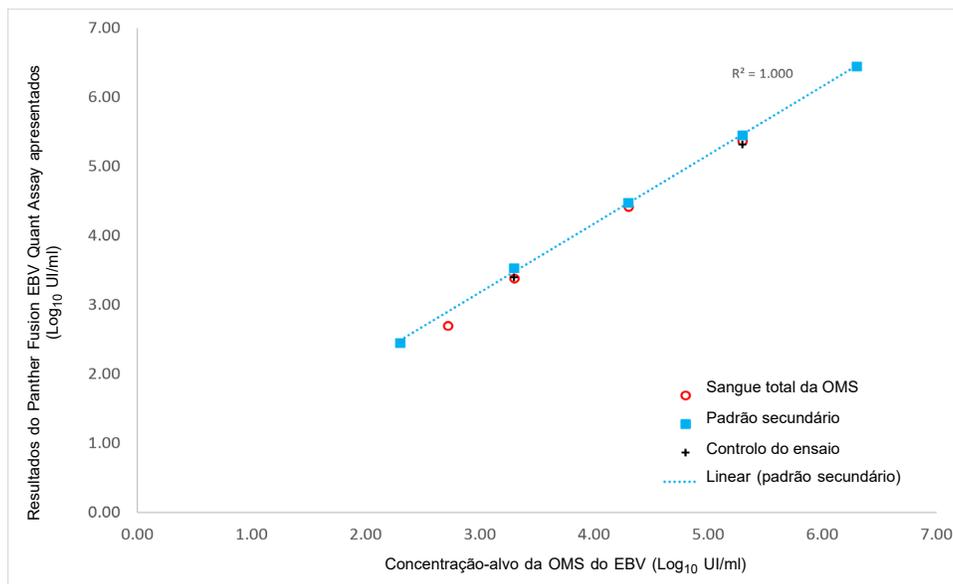


Figura 6. Rastreabilidade entre as concentrações-alvo do 1.º padrão da OMS para o EBV e as concentrações apresentadas no Panther Fusion EBV Quant Assay (padrão da OMS diluído em sangue total)

Precisão no laboratório

Para avaliar a precisão no laboratório, foi elaborado um painel positivo de 3 membros diluindo DNA do EBV em sangue total EBV-. O painel positivo e uma amostra de sangue total negativa foram testados por 2 operadores utilizando 3 lotes de reagentes em 3 Panther Fusion Systems ao longo de 6 dias de testes não consecutivos. Cada operador realizou 2 execuções por dia e cada membro do painel foi testado em triplicado em cada execução. O estudo foi desenhado e analisado seguindo as recomendações da norma CLSI EP-05-A3.¹¹

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

Tabela 10: Reprodutibilidade do Panther Fusion EBV Quant Assay no sangue total

N	Concentração média (log UI/ml)	Entre lotes	Entre instrumentos	Entre operadores	Entre dias	Entre execução	Intra-execução	Total
		DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
52	2,96	0,17	0,04	0,05	0,06	0,12	0,13	0,20
52	4,00	0,15	0,02	0,04	0,04	0,10	0,06	0,15
52	5,03	0,15	0,01	0,05	0,03	0,13	0,04	0,13

DP=desvio padrão.

Em N=54, duas (2) réplicas de cada painel foram inválidas e não foram testadas novamente devido a volume insuficiente.

Substâncias potencialmente interferentes

A suscetibilidade do Panther Fusion EBV Quant Assay a interferência por níveis elevados de substâncias endógenas, anticoagulantes e fármacos geralmente prescritos a pacientes transplantados foi avaliada em matrizes EBV- na presença ou ausência de 2,56 log UI/ml e 3,02 log UI/ml de EBV em plasma e sangue total, respetivamente. 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 EP07¹² e EP37.¹³

Não foi observada qualquer interferência na exatidão da quantificação do ensaio nas amostras de plasma ou de sangue total na presença das substâncias endógenas potencialmente interferentes indicadas na Tabela 11.

Tabela 11: Substâncias endógenas

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Albumina	3	375 mg/dl
Bilirrubina conjugada	3	40 mg/dl
Hemoglobina	3	1000 mg/dl
Heparina	3	0,66 mg/dl
DNA genómico humano	3	0,2 mg/ml
Triglicéridos	3	3,45 mg/dl
Bilirrubina não conjugada	3	0,40 mg/dl

Não foi observada qualquer interferência na exatidão da quantificação do ensaio na presença das substâncias exógenas indicadas na Tabela 12.

Tabela 12: Substâncias exógenas

Substância potencialmente interferente	Número de réplicas	Concentração testada
Aciclovir	3	6,6 mg/dl
Azatioprina	3	0,258 mg/dl
Cefotetano	3	71,1 mg/dl
Cidofovir	3	12,4 mg/dl
Clavulanato de potássio	3	1,47 mg/ml
Ciclosporina	3	0,180 mg/dl
EDTA	3	0,099 mg/dl
Everolímus	3	0,0183 mg/dl
Fluconazol	3	2,55 mg/dl
Foscarnet	3	108 mg/dl
Ganciclovir	3	3,96 mg/dl
Letermovir	3	3,9 mg/dl
Micofenolato de mofetil	3	18,1 mg/dl
Ácido micofenólico	3	18,1 mg/dl
Piperacilina	3	110 mg/dl
Prednisona	3	0,0099 mg/dl
Sirolímus	3	0,0213 mg/dl
Citrato de sódio	3	3200 mg/dl
Sulfametoxazol	3	35,7 mg/dl
Tacrolímus	3	0,0144 mg/dl
Tazobactam sódico	3	10,2 mg/dl
Tenofovir disoproxil fumarato	3	0,0978 mg/dl
Ticarcilina dissódica	3	151 mg/dl
Trimetoprim	3	4,2 mg/dl
Valaciclovir	3	3,83 mg/dl
Valganciclovir	3	4,83 mg/dl
Vancomicina	3	12 mg/dl

Especificidade analítica

A potencial reatividade cruzada com os agentes patogênicos indicados na Tabela 13 foi avaliada em matrizes EBV- na presença ou ausência de 2,56 log UI/ml e 3,02 log UI/ml de EBV em plasma e sangue total, respectivamente. Os agentes patogênicos foram testados à concentração mais alta disponível. Não foi observada qualquer reatividade cruzada ou interferência na exatidão da quantificação.

Tabela 13: Agentes patogênicos testados para a especificidade analítica

Micro-organismo/Agente patogénico	Concentração	Micro-organismo/Agente patogénico	Concentração
ADV-4	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	Vírus parainfluenza humano	1,00E+05 UI/ml
<i>Aspergillus niger</i>	1,00E+06 CFU/ml	Influenza A	1,00E+05 UI/ml
BKV	5,00E+06 cp/ml	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+06 cp/ml
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,00E+06 IFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CCU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,00E+06 cp/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,00E+06 cp/ml
CMV	1,00E+05 cp/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E+06 CFU/ml	Rinovírus	1,00E+06 cp/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Salmonella enterica</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,00E+06 CFU/ml
HBV	1,00E+05 UI/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/ml
HCV	1,00E+04 UI/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HIV-1	1,00E+05 UI/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HPV-18 (infetado com células HeLa)	1,00E+05 células/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
Vírus do herpes humano 6	1,00E+05 cp/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,00E+05 trofozoítos/ml
Vírus do herpes humano 7	1,00E+03 TCID ₅₀ /ml	Vírus da varicela zóster	1,00E+05 cp/ml
Vírus do herpes humano 8	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,00E+06 CFU/ml
Metapneumovírus humano	1,00E+03 UI/ml	Vírus Zika	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml

CCU/ml=unidades modificadoras de colónias/ml.

CFU/ml=unidades formadoras de colónias por ml.

cp/ml=cópias por ml.

IFU/ml=unidades formadoras de inclusão por ml.

UI/ml=unidades internacionais por ml.

TCID₅₀/ml=unidades de dose infecciosa de cultura do tecido por ml.

Correlação de métodos

Este estudo foi desenhado de acordo com a norma CLSI EP09c.¹⁴

Correlação de métodos no plasma

O desempenho do Panther Fusion EBV Quant Assay foi avaliado em relação a um ensaio comparador testando espécimes colhidos retrospectivamente e espécimes artificiais abrangendo todo o intervalo linear. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 121 espécimes dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 7.

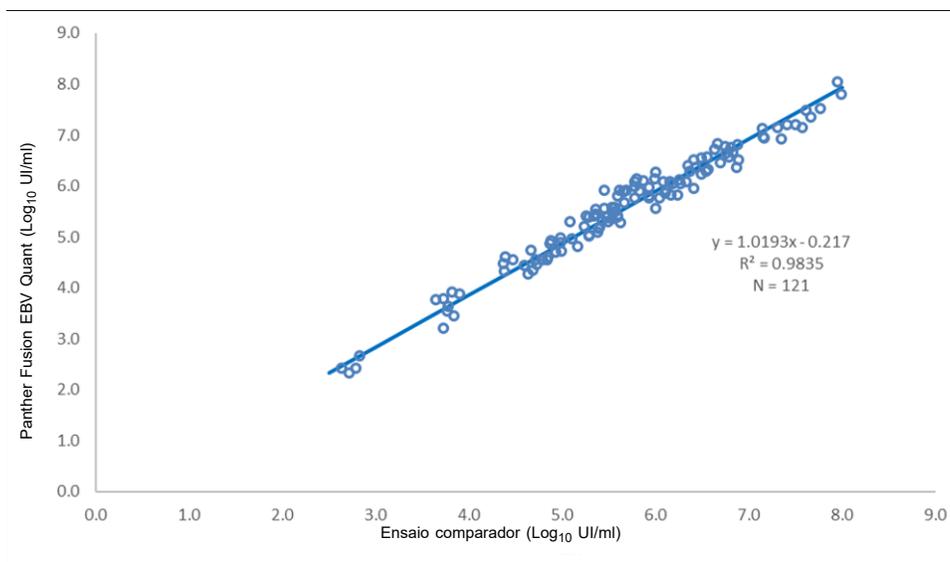


Figura 7. Correlação entre a carga viral de EBV no Panther Fusion EBV Quant Assay e um ensaio comparador nos testes de amostras de plasma

Correlação de métodos no sangue total

O desempenho do Panther Fusion EBV Quant Assay foi avaliado em relação a um ensaio comparador testando espécimes colhidos retrospectivamente e espécimes artificiais abrangendo todo o intervalo linear. Para a regressão de Deming, foi utilizado um total de 147 espécimes dentro do intervalo linear comum a ambos os ensaios, tal como mostrado na Figura 8.

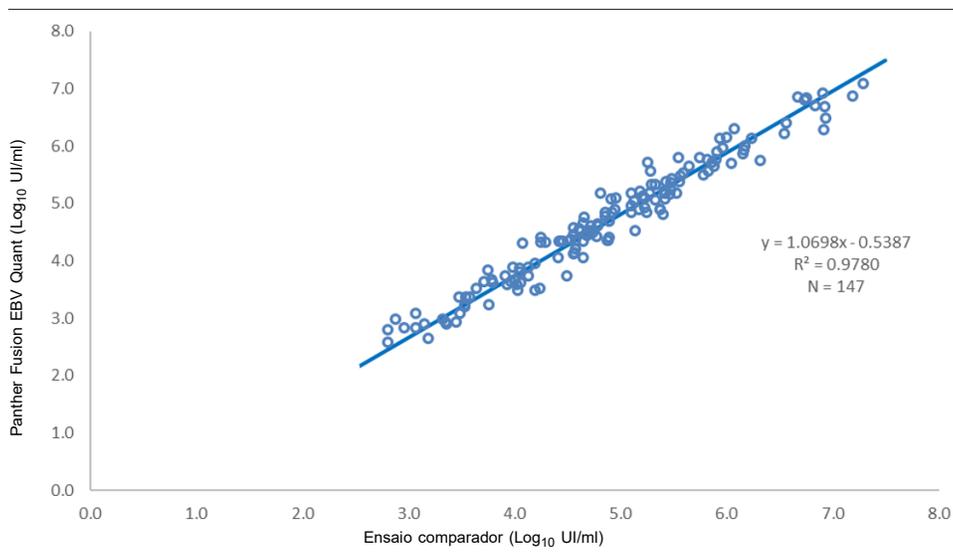


Figura 8. Correlação entre a carga viral de EBV no Panther Fusion EBV Quant Assay e um ensaio comparador nos testes de amostras de sangue total

Contaminação por transferência/cruzada

A contaminação por transferência foi avaliada utilizando amostras em STM enriquecidas com EBV de título elevado ($1,5E+09$ UI/ml) dispersas entre amostras EBV- num padrão em tabuleiro de damas. Os testes foram realizados ao longo de 5 execuções. A taxa geral de contaminação por transferência foi de 0,67% (1/150).

Bibliografia

1. Tzellos S, Farrell PJ. 2012. Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease. *Pathogens*. 1(2):156–174. doi.org/10.3390/pathogens1020156
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. (2016). <https://www.cdc.gov/epsteinbarr/about-mono.html>
3. Kimura H, Kwong Y-L. 2019. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front. Oncol.* 9:62.
4. Nijland, ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, ten Berge JJM. 2016 *Transplantation Direct* 2016;2: e48 doi: 10.1097/TXD.0000000000000557
5. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al., em nome da Sixth European Conference on Infections in Leukemia, uma joint-venture do Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), do Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), da International Immunocompromised Host Society (IHS) e da European Leukemia Net (ELN). 2016 Management of Epstein-Barr Virus Infections and Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders in Patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) Guidelines. *Haematologica*. 107(7):803-811. doi:10.3324/haematol.2016.144428
6. 1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/260, versão 4.0).
7. Clinical & Laboratory Standards Institute. Document M29. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Web site do CLSI <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29/> (4 de abril de 2022)
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidelines – Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelines. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. 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.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Interference Testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Informações de contacto

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



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

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

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

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

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

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

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

©2022 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.

AW-26019-601 Rev. 001
2022-05