

**REF**
**201501 NeuMoDx™ EBV Quant Test Strip 2.0**
**R only**

CUIDADO: Apenas para exportação dos EUA

**IVD**
**Para utilização em diagnóstico *in vitro* no NeuMoDx 288 e NeuMoDx 96 Molecular System**

 Para obter mais informações sobre atualizações do folheto informativo, aceder a: [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu)

Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do Operador NeuMoDx 288 Molecular System; P/N 40600108

Para obter instruções detalhadas, consultar o Manual do Operador NeuMoDx 96 Molecular System; P/N 40600317

## UTILIZAÇÃO PREVISTA

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 é um teste *in vitro* automatizado de amplificação de ácidos nucleicos para a quantificação de ADN do vírus Epstein-Barr humano (EBV) em plasma com EDTA de pacientes transplantados imunocomprometidos.

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 como implementado no NeuMoDx 288 Molecular System e no NeuMoDx 96 Molecular System integra a extração automatizada do ADN para isolar os ácidos nucleicos-alvo do espécime e PCR em tempo real, tendo como alvo duas regiões altamente conservadas do genoma do EBV.

O ensaio destina-se a ser utilizado como um auxiliar na monitorização de níveis de ADN do EBV no sangue periférico para avaliar a resposta ao tratamento viral. Este ensaio destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores de laboratório da progressão da doença para a gestão e monitorização clínicas da infeção por EBV.

O ensaio não se destina a ser utilizado como teste de rastreamento para a presença de ADN do EBV no sangue ou em produtos sanguíneos. O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratórios clínicos qualificado especificamente formado e treinado nas técnicas de procedimentos de diagnóstico de PCR em tempo real e *in vitro* e/ou em NeuMoDx Molecular Systems. O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 não se destina a ser utilizado em autotestes ou no local de prestação de cuidados.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

O sangue total humano colhido em tubos de colheita de sangue esterilizados que contém EDTA como agente anticoagulante pode ser utilizado para a preparação de plasma. Para iniciar o teste, o plasma num tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System é colocado num transportador de tubos de espécime e carregado na mesa de trabalho do NeuMoDx System. Por cada espécime, uma alíquota de 550 µL da amostra de plasma é misturada com o NeuMoDx Lysis Buffer 1 e o NeuMoDx System desempenha automaticamente todos os passos necessários para extrair o ácido nucleico-alvo, preparar o ADN isolado para a amplificação PCR em tempo real e, se presentes, amplificar e detetar os produtos de amplificação (duas regiões altamente conservadas no genoma do EBV). O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 inclui um controlo de processo de amostra (Sample Process Control, SPC1) de ADN para ajudar a monitorizar a presença de possíveis substâncias inibidoras e falhas do reagente ou do NeuMoDx System que podem acontecer durante o processo de extração e amplificação.

O EBV é um vírus comum de ADN de cadeia dupla da família de vírus de herpes humano que infeta pessoas de todas as idades. Estima-se que uma percentagem > 90% dos indivíduos em todo o mundo esteja ou tenha sido infetada com o EBV.<sup>1</sup> O EBV é propagado através de fluidos corporais como saliva, sangue, sêmen e transplante de órgãos. Muitas pessoas são infetadas com EBV na infância. Estes indivíduos, embora infetados por EBV, são geralmente assintomáticos. Os indivíduos imunocomprometidos podem desenvolver sintomas e complicações mais graves com a infeção por EBV. A infeção latente por EBV apresenta maior risco para pacientes transplantados. As doenças linfoproliferativas pós-transplante (DLPT) incluem a formação de tumores associados ao EBV em células B devido ao efeito de agentes imunossupressores no controlo imunitário do EBV, uma das causas mais significativas de morbilidade e mortalidade em pacientes submetidos a transplante de qualquer órgão.<sup>2</sup>

A monitorização da carga viral do EBV pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico e gestão da DLPT associada ao EBV. Contudo, o diagnóstico deve ser realizado através de biópsia. A monitorização da carga viral do EBV pode ainda ser utilizada para monitorizar a resposta ao tratamento da DLPT associada ao EBV, geralmente com Rituximab e uma redução na terapia imunossupressora.<sup>3</sup>

## PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 no NeuMoDx System utiliza NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, NeuMoDx EBV Calibrators, NeuMoDx EBV External Controls, NeuMoDx Lysis Buffer 1 e reagentes de utilização geral NeuMoDx para realizar a análise. O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 combina extração de ADN automatizada, amplificação e deteção por PCR em tempo real. Os espécimes de sangue total são colhidos em tubos EDTA para a preparação de plasma. O espécime de plasma, num tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System, é colocado no transportador de tubos de espécime e carregado na mesa de trabalho do NeuMoDx System para processamento. Não é necessária intervenção adicional do operador.

Os NeuMoDx Systems utilizam uma combinação de calor, enzimas líticas e reagentes de extração para desempenhar automaticamente a lise celular, a extração de ADN e a remoção de inibidores. Os ácidos nucleicos libertados são capturados por microsferas de afinidade magnética. As microsferas, com os ácidos nucleicos ligados, são carregadas no NeuMoDx Cartridge, onde componentes não ADN e não ligados são retirados por lavagem através do NeuMoDx Wash Reagent e o ADN ligado é eluído utilizando o NeuMoDx Release Reagent. Os NeuMoDx Systems utilizam o ADN eluído para reidratar os reagentes de amplificação NeuDry™ patenteados que contêm todos os elementos necessários para a amplificação PCR dos alvos específicos do EBV e SPC1. Após a reconstituição de reagentes NeuDry PCR, o NeuMoDx System dispensa a mistura preparada e pronta para PCR no NeuMoDx Cartridge. A amplificação e a deteção das sequências de ADN de controlo e alvo (se presentes) ocorrem na câmara de PCR do NeuMoDx Cartridge. O NeuMoDx Cartridge foi também concebido para conter o amplificação decorrente de PCR em tempo real, eliminando essencialmente o risco de contaminação após a amplificação.

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 tem como alvo duas regiões altamente conservadas, BALF5 e BXFL1, no genoma do EBV. A conceção de duplo alvo reduz o risco de resultados falso-negativos em caso de mutação numa região alvo, aumentando assim a robustez do ensaio. Os alvos amplificados são detetados em tempo real utilizando química de sondas de hidrólise (habitualmente referida como química TaqMan®), utilizando moléculas de sonda fluorogénica de oligonucleotídeos específicas dos amplicões para os respetivos alvos.

As sondas TaqMan consistem num fluoróforo covalentemente ligado à extremidade 5' da sonda de oligonucleotídeos e a um supressor na extremidade 3'. Enquanto a sonda estiver intacta, o fluoróforo e o supressor estão próximos, o que faz com que a molécula supressora suprima a fluorescência emitida pelo fluoróforo via transferência ressonante de energia por fluorescência (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

As sondas TaqMan foram concebidas de forma a hibridizar dentro de uma região de ADN amplificada por um conjunto específico de iniciadores. À medida que a polimerase Taq de ADN expande o iniciador e sintetiza a nova cadeia, a atividade exonuclease 5' a 3' da polimerase Taq de ADN degrada a sonda que foi hibridizada com o modelo. A degradação da sonda liberta o fluoróforo e provoca a perda de proximidade com o supressor, ultrapassando assim o efeito de supressão devido ao FRET e permitindo a deteção de fluorescência do fluoróforo. O sinal de fluorescência resultante detetado é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e pode ser correlacionado com a quantidade de ADN alvo presente.

Uma sonda TaqMan marcada com um fluoróforo (excitação: 490 nm e emissão: 521 nm) na extremidade de 5' e um supressor de fluorescência na extremidade de 3' são utilizados para detetar os alvos de ADN de EBV. Para deteção do SPC1, a sonda TaqMan é marcada com um marcador fluorescente alternativo (excitação: 535 nm e emissão: 556 nm) na extremidade de 5' e um supressor de fluorescência na extremidade de 3'. O software do NeuMoDx System monitoriza o sinal fluorescente emitido pelas sondas TaqMan no final de cada ciclo de amplificação. Quando a amplificação estiver concluída, o software do NeuMoDx System analisa os dados e comunica um resultado (POSITIVE [POSITIVO]/NEGATIVE [NEGATIVO]/INDETERMINATE [INDETERMINADO]/NO RESULT [SEM RESULTADOS]/UNRESOLVED [NÃO RESOLVIDO]). Se um resultado for POSITIVE (POSITIVO), o software do NeuMoDx System também fornece um valor quantitativo associado à amostra ou comunica se a concentração calculada estiver fora do intervalo linear.



## REAGENTES/CONSUMÍVEIS

### Material fornecido

REF	Conteúdo	Unidades por embalagem	Testes por unidade	Testes por embalagem
201501	<b>NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0</b> <i>Reagentes de RT-PCR secos contendo iniciadores e sonda TaqMan específicos de EBV e SPC1.</i>	6	16	96

### Materiais necessários, mas não fornecidos (disponibilizados em separado pela QIAGEN)

REF	Conteúdo
800501	<b>NeuMoDx EBV Calibrators</b> <i>Conjuntos de utilização única de calibradores altos e baixos de EBV para estabelecer a validade da curva-padrão (1 frasco de cada controlo = 1 conjunto)</i>
900502	<b>NeuMoDx EBV External Controls</b> <i>Conjuntos de utilização única de controlos de EBV baixo-positivos, alto-positivos e negativos para estabelecer a validade diária do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 (1 frasco por cada controlo = 1 conjunto)</i>
100200	<b>NeuMoDx Extraction Plate</b> <i>Partículas paramagnéticas, enzimas líticas e controlos de processo de amostra secos</i>
400500	<b>NeuMoDx Lysis Buffer 1</b>
400100	<b>NeuMoDx Wash Reagent</b>
400200	<b>NeuMoDx Release Reagent</b>
100100	<b>NeuMoDx Cartridge</b>
235903	<b>Pontas Hamilton® CO-RE/CO-RE II (300 µL) com filtros</b>
235905	<b>Pontas Hamilton CO-RE/CO-RE II (1000 µL) com filtros</b>

### Instrumentos necessários

NeuMoDx 288 Molecular System [REF 500100] ou NeuMoDx 96 Molecular System [REF 500200]

NeuMoDx System Software versão 1.9.2.6 ou posterior



## AVISOS E PRECAUÇÕES

- A NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 destina-se apenas para utilização em diagnóstico *in vitro* com os NeuMoDx Systems.
- Não utilizar os reagentes ou consumíveis depois da data de validade indicada.
- Não utilizar quaisquer reagentes que tenham o selo de segurança aberto ou cuja embalagem tenha sido danificada ao chegar ao destino.
- Não utilizar consumíveis ou reagentes cuja bolsa protetora tenha sido aberta ou danificada ao chegar ao destino.
- Deve estar disponível uma calibração de teste válida (gerada através do processamento de calibradores altos e baixos NeuMoDx EBV Calibrators [REF 800501]) antes de os resultados de teste poderem ser criados para as amostras clínicas.
- É necessário processar NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502] a cada 24 horas ao longo da testagem com o NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
- O volume mínimo de espécime de alíquotas secundárias de plasma com EDTA encontra-se detalhado a seguir na secção Preparação para teste. Volumes inferiores ao mínimo especificado poderão resultar num erro "Quantity Not Sufficient" (Quantidade insuficiente).

- A utilização de espécimes armazenados a temperaturas inadequadas ou para além dos períodos de armazenamento especificados poderá produzir resultados inválidos ou erróneos.
- Evitar a contaminação microbiana e por ribonuclease (DNase) de todos os reagentes e consumíveis. É recomendada a utilização de pipetas de transferência descartáveis, estéreis e isentas de DNase ao utilizar tubos secundários. Utilizar uma nova pipeta para cada espécime.
- Para evitar a contaminação, não manusear nem destruir um NeuMoDx Cartridge após a amplificação. Não recuperar NeuMoDx Cartridges do contentor de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 288 Molecular System) ou do recipiente de resíduos de risco biológico (NeuMoDx 96 Molecular System) em quaisquer circunstâncias. O NeuMoDx Cartridge foi concebido para prevenir a contaminação.
- Nos casos em que são também realizados testes de PCR em tubo aberto pelo laboratório, é necessário ter especial cuidado para que a NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0, os consumíveis e reagentes adicionais necessários para teste, o equipamento de proteção individual como luvas e batas de laboratório e o NeuMoDx System não sejam contaminados.
- Devem ser utilizadas luvas de nitrilo, sem pó e limpas durante o manuseio de reagentes e consumíveis NeuMoDx. É necessário ter especial cuidado para não tocar na parte superior da superfície do NeuMoDx Cartridge, na superfície da película de alumínio da NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 e da NeuMoDx Extraction Plate ou na parte superior da superfície do contentor do NeuMoDx Lysis Buffer. O manuseamento dos consumíveis e reagentes deve ser feito tocando apenas nas superfícies laterais.
- Existem fichas de dados de segurança (FDS) disponíveis para cada reagente (conforme aplicável) em [www.qiagen.com/neumodx-ifu](http://www.qiagen.com/neumodx-ifu).
- Lavar muito bem as mãos depois de realizar o teste.
- Não pipetar com a boca. Não fumar, beber ou comer em áreas onde estiverem a ser manuseados espécimes ou reagentes.
- Manusear sempre os espécimes como se fossem infecciosos e de acordo com procedimentos laboratoriais seguros, tal como os descritos na publicação *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>4</sup> e no documento M29-A4 do CLSI.<sup>5</sup>
- Ao trabalhar com químicos, usar sempre uma bata de laboratório, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (FDS) relevantes.
- Descartar reagentes não utilizados e resíduos em conformidade com os regulamentos nacionais, federais, regionais, estaduais e locais. Seguir as recomendações da Ficha de dados de segurança (FDS).

## NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0



Contém: ácido bórico. Perigo! Provoca irritação ocular grave. Pode prejudicar a fertilidade ou o nascituro. Obter instruções especiais antes da utilização. Não manusear até ter lido e compreendido todas as precauções de segurança. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Procurar assistência/aconselhamento médico. Armazenar num local totalmente seguro. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado.

### Informações de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e Canadá +1 703-527-3887



### ARMAZENAMENTO, TRATAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

1. As NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 permanecem estáveis dentro da embalagem primária até à data de validade indicada na etiqueta do produto, quando armazenadas a temperaturas entre 15 e 28 °C.
2. Uma vez carregada, a NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 pode permanecer a bordo do NeuMoDx System durante 14 dias. O prazo de validade restante de tiras de teste carregadas é controlado pelo software e comunicado ao utilizador em tempo real. O sistema irá solicitar a remoção das tiras de teste que tenham sido utilizadas para além do período permitido.
3. Apesar de os NeuMoDx EBV Calibrators e os NeuMoDx EBV External Controls não serem infecciosos, devem ser descartados no recipiente de resíduos de risco biológico do laboratório após a utilização para reduzir o risco de contaminação.

### COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES

*Manuseie todos os espécimes como se fossem passíveis de transmitir agentes infecciosos.*

1. Não congele espécimes de sangue total ou quaisquer outros armazenados em tubos primários.
2. Para preparar espécimes de plasma, o sangue total deve ser colhido em tubos estéreis, utilizando EDTA como anticoagulante. Siga as instruções do fabricante do tubo para colheita de espécimes.
3. O sangue total colhido nos dispositivos listados acima deve ser armazenado e/ou transportado até 24 horas a temperaturas entre 2 °C e 25 °C, antes da preparação do plasma. A preparação do plasma deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante.
4. Os espécimes de plasma preparados podem permanecer no NeuMoDx System até 8 horas antes do processamento. Se for necessário tempo adicional de armazenamento, é recomendado que os espécimes sejam refrigerados ou congelados.
5. Os espécimes de plasma preparados devem ser armazenados a temperaturas entre 2 e 8 °C até 7 dias antes do teste e durante um máximo de 8 horas à temperatura ambiente.
6. Os espécimes de plasma preparados podem ser armazenados a -20 °C até 8 semanas; as amostras de plasma não devem ser sujeitas a mais do que 2 ciclos de congelamento/descongelamento antes de serem utilizadas.
  1. Se os espécimes estiverem congelados, permitir que descongelem à temperatura ambiente (15 a 30 °C); agitar em vórtex para gerar uma amostra uniformemente distribuída. As amostras devem estar à temperatura ambiente antes de serem testadas.
  2. Assim que as amostras congeladas estiverem descongeladas, o teste deverá ocorrer num espaço de 8 horas.
7. Se os espécimes forem expedidos, estes devem ser embalados e rotulados em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis.

## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### Preparação para teste

1. Aplicar a etiqueta de código de barras de espécime a um tubo de espécime compatível com o NeuMoDx System, conforme descrito abaixo.
2. Transferir uma alíquota do espécime para um tubo de espécime com código de barras compatível com o NeuMoDx System conforme os volumes definidos abaixo:
3. *Para espécimes de plasma:*
  - Transportador de tubos de espécime (32 tubos): 11–14 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento  $\geq 750 \mu\text{L}$
  - Transportador de tubos de espécime (24 tubos): 14,5–18 mm de diâmetro e 60–120 mm de altura, volume mínimo de enchimento  $\geq 1100 \mu\text{L}$
  - Transportador de tubos de espécime de baixo volume (32 tubos): Tubo de microcentrífuga com base cônica de 1,5 mL, volume mínimo de enchimento  $\geq 650 \mu\text{L}$

### Operação do NeuMoDx System

*Para obter instruções detalhadas, consulte os Manuais do Operador do NeuMoDx 288 e do 96 Molecular System (P/N 40600108 e 40600317)*

1. Preencher um ou mais transportadores de tiras de teste NeuMoDx System com a(s) NeuMoDx EBV Quant Test Strip(s) 2.0 e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) de tiras de teste no NeuMoDx System.
2. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, adicionar os consumíveis necessários aos transportadores de consumíveis do NeuMoDx System e utilizar o ecrã tátil para carregar o(s) transportador(es) no NeuMoDx System.
3. Se solicitado pelo software do NeuMoDx System, repor NeuMoDx Wash Reagent, NeuMoDx Release Reagent, esvaziar os resíduos de iniciação, o contentor de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 288 Molecular System), o recipiente de resíduos de pontas (apenas NeuMoDx 96 Molecular System) ou o recipiente de resíduos de risco biológico (apenas NeuMoDx 96 Molecular System), conforme apropriado.
4. Se tal for solicitado pelo software do NeuMoDx System, processar os Calibrators [REF 800501] e/ou os External Controls [REF 900502] conforme necessário. Podem ser encontradas mais informações acerca dos calibradores e controlos na secção *Processamento de resultados*.
5. Carregar o(s) tubo(s) de espécime no transportador de tubos de espécime e certificar-se de que as tampas e os esfregaços foram removidos de todos os tubos.
6. Colocar os transportadores de tubos de espécime na prateleira do carregador automático e utilizar o ecrã tátil para carregar os transportadores no NeuMoDx System. Tal irá iniciar o processamento dos espécimes carregados para o(s) teste(s) identificado(s), desde que esteja presente no sistema um pedido de teste válido.

## LIMITAÇÕES

1. A NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 apenas pode ser utilizada em NeuMoDx Systems.
2. O desempenho da NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 foi estabelecido para espécimes de plasma preparados a partir de sangue total colhido com EDTA como anticoagulante. A utilização da NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0 com outras fontes não foi avaliada e as características de desempenho são desconhecidas com outros tipos de espécimes.
3. Uma vez que a deteção de EBV está, geralmente, dependente do número de partículas virais presentes na amostra, a obtenção de resultados fiáveis depende da colheita, do tratamento e do armazenamento adequados do espécime.
4. Podem ocorrer resultados erróneos devido à colheita, ao manuseamento ou ao armazenamento inadequados de espécimes, a erros técnicos ou à mistura de tubos de espécime. Além disso, podem ocorrer falsos resultados negativos devido ao facto de o número de partículas virais presente na amostra estar abaixo do limite de deteção do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.
5. A operação do NeuMoDx System apenas pode ser realizada por pessoal com formação para utilizar o NeuMoDx System.
6. Se os alvos EBV e SPC1 não forem amplificados, é comunicado um resultado inválido (Indeterminate [Indeterminado] ou Unresolved [Não resolvido]) e o teste deverá ser repetido.
7. Se ocorrer um erro do sistema antes da conclusão do processamento de amostras, será comunicado "No Result" (Sem resultados) e o teste deverá ser repetido.
8. Se o ADN do EBV detetado estiver acima do LSdQ, o NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pode ser repetido com uma alíquota diluída do espécime original. É recomendada uma diluição de 1:100 ou 1:1000 em plasma negativo para EBV ou Basematrix 53 Diluent (Basematrix, SeraCare®, Milford, MA). O sistema irá calcular automaticamente a concentração do espécime original da seguinte forma: Concentração original do espécime =  $\text{Log}_{10}$  (fator de diluição) + concentração indicada da amostra diluída, desde que o fator de diluição tenha sido corretamente selecionado no software antes da repetição.
9. A presença dos inibidores de PCR em plasma pode resultar num erro de quantificação do sistema; se isto ocorrer, é recomendável repetir o teste com o mesmo espécime diluído em Basematrix a 1:10 ou 1:100.
10. Um resultado positivo indica a presença de ADN de EBV.
11. Embora a possibilidade seja baixa, eliminações ou mutações nas regiões conservadas visadas pelo NeuMoDx EBV Quant Assay podem afetar a deteção e/ou quantificação e originar um resultado incorreto.
12. Os resultados do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 podem ser utilizados como complemento às observações clínicas e outras informações à disposição do médico; o teste não foi concebido para o diagnóstico da infeção.
13. São recomendadas boas práticas de laboratório, incluindo a troca de luvas entre o manuseamento de espécimes de pacientes para evitar a contaminação.

## PROCESSAMENTO DE RESULTADOS

Os resultados disponíveis podem ser visualizados ou impressos a partir do separador "Results" (Resultados) na janela Results (Resultados) do ecrã tátil do NeuMoDx System. Os resultados do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 são gerados automaticamente pelo software do NeuMoDx System, utilizando o algoritmo de decisão e os parâmetros de processamento de resultados especificados no ficheiro de definição do NeuMoDx EBV Quant Assay (EBV Quant ADF versão 4.0.0 ou posterior). Um resultado do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 pode ser reportado como Negative (Negativo), Positive (Positivo) com uma concentração de ADN do EBV declarada, Indeterminate (Indeterminado), No Result (Nenhum resultado) ou Unresolved (Não resolvido), de acordo com o estado de amplificação do alvo e do controlo de processo de amostra. Os resultados são comunicados com base no algoritmo de decisão de processamento de resultados do ADF, resumido na *Tabela 1* abaixo.

Tabela 1: Interpretação de resultados do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Resultado	Alvos de EBV	Controlo de processo de amostra (Sample Process Control 1, SPC1)
<b>Positive (Positivo)</b>	<b>AMPLIFIED (AMPLIFICADO)</b> [2 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR > 1,3 AND (E) EP > 1200] OR (OU) [28 < Ct < 38 AND (E) EP > 1200]	N/A (N/D)
<b>Positive (Positivo), acima do limite superior de quantificação (LSdQ) (Log10 UI/mL)</b>	[CONC] > 8,0 Log10 UI/mL, SEM QUANT.	N/A (N/D)
<b>Positive (Positivo), abaixo do limite inferior de quantificação (LidQ) (Log10 UI/mL)</b>	[CONC] < 1,48 Log10 UI/mL, SEM QUANT.	N/A (N/D)
<b>Negative (Negativo)</b>	<b>NOT AMPLIFIED (NÃO AMPLIFICADO)</b> N/A (N/D) <b>OR (OU)</b> [2 ≤ Ct < 28 AND (E) EPR ≤ 1,3 AND (E) EP > 1200] <b>OR (OU)</b> [28 ≤ Ct < 38 AND (E) EP > 1200] <b>OR (OU)</b> Ct > 38	<b>AMPLIFIED (AMPLIFICADO)</b> [29 < Ct < 35 and (e) EP ≥ 2000]
<b>No Result (Sem resultados)*</b>	Not Amplified (Não amplificado), System Error Detected (Erro do sistema detetado), Sample Processing Aborted (Processamento de amostras interrompido)	
<b>Indeterminate (Indeterminado)*</b>	Not Amplified (Não amplificado), System Error Detected (Erro do sistema detetado), Sample Processing Completed (Processamento de amostras completo)	
<b>Unresolved (Não resolvido)*</b>	Not Amplified (Não amplificado), No System Error Detected (Nenhum erro do sistema detetado)	

EP = Fluorescência de ponto final; EPR = Relação de fluorescência de ponto final; Ct = Limiar do ciclo;

Quant = quantidade calculada de EBV presente expressa em Log<sub>10</sub> UI/mL. Ver Cálculo do teste na secção abaixo.

\* O System possui a capacidade adicional de Rerun/Repeat (Reexecutar/repetir) que permite o reprocessamento automático em caso de ocorrência de um resultado inválido para minimizar atrasos na comunicação de resultados.

### Cálculo do teste: Amostras

- Para amostras dentro do intervalo linear do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, a concentração de ADN do EBV nas amostras é calculada utilizando a curva-padrão armazenada em conjunto com o coeficiente de calibração.
  - O "coeficiente de calibração" é calculado com base nos resultados dos NeuMoDx EBV Calibrators processados para estabelecer a validade da curva-padrão para cada lote de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 num NeuMoDx System em particular.
  - O coeficiente de calibração é integrado automaticamente pelo sistema na determinação final da concentração de ADN do EBV.
- Os resultados do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 são comunicados em UI/mL e Log<sub>10</sub> UI/mL.
- A quantificação resultante das amostras desconhecidas é rastreável de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.

### Cálculo do teste: Calibradores

É necessária uma calibração válida com base na curva-padrão para quantificar o ADN do EBV presente nos espécimes. Para gerar resultados válidos, deve ser concluída uma calibração de teste utilizando os calibradores fornecidos pela NeuMoDx Molecular, Inc.

- Os NeuMoDx EBV Calibrators são fornecidos num kit [REF 800501] e contêm alvo EBV encapsulado não infeioso preparado em Basematrix.
- É necessário processar um conjunto de calibradores de EBV com cada novo lote de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 se for carregado um novo ficheiro de definição de ensaio de EBV no NeuMoDx System, se o conjunto atual de calibradores estiver fora do prazo de validade (definido em 90 dias) ou no caso de o software do NeuMoDx System ter sido modificado.
- O software do NeuMoDx System irá notificar o utilizador quando os calibradores precisarem de ser processados; um novo lote de tiras de teste não pode ser utilizado para teste até que os calibradores tenham sido processados com êxito.

4. A validade da calibração é estabelecida da seguinte forma:
  1. É necessário processar um conjunto de dois calibradores (alto e baixo) de forma a estabelecer a validade.
  2. Para gerar resultados válidos, pelo menos 2 das 3 réplicas devem originar resultados dentro dos parâmetros predefinidos. O alvo nominal do calibrador baixo é de 3 Log<sub>10</sub> UI/mL e o alvo nominal do calibrador alto é de 5 Log<sub>10</sub> UI/mL.
  3. É calculado um coeficiente de calibração para ter em conta a variação esperada entre lotes de tiras de teste; este coeficiente de calibração é utilizado na determinação da concentração final de ADN do EBV.
5. Se um ou ambos os calibradores falharem na verificação de validade, repita o processamento dos calibradores que falharam utilizando um novo frasco. No caso de um calibrador falhar a validade, é possível repetir apenas o calibrador que falhou porque o sistema não necessita que o utilizador processe novamente ambos os calibradores.
6. Se os calibradores falharem a verificação de validade uma segunda vez consecutiva, contactar a Assistência técnica QIAGEN.

#### Resultados inválidos

Se um NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 processado no NeuMoDx System não produzir um resultado válido, será comunicado como Indeterminate (Indeterminado), No Result (Sem resultado) ou Unresolved (Não resolvido) com base no tipo de erro que ocorreu, e o teste deve ser repetido para ser obtido um resultado válido.

Caso seja detetado um erro do NeuMoDx System durante o processamento da amostra, será comunicado um resultado Indeterminate (Indeterminado). É recomendada a realização de um novo teste no caso de ser comunicado um resultado Indeterminate (Indeterminado).

Caso seja detetado um erro do NeuMoDx System, será comunicado um resultado No Result (Sem resultado) e o processamento da amostra será interrompido. Recomenda-se repetir o teste caso seja comunicado um resultado No Result (Sem resultados).

Caso não seja detetado um alvo e não haja amplificação do controlo de processo de amostra, o que indica uma possível falha do reagente ou a presença de inibidores, será comunicado um resultado Unresolved (Não resolvido). Caso seja comunicado um resultado Unresolved (Não resolvido), é recomendada, como primeiro passo, a realização de um novo teste. Se o novo teste falhar, pode ser utilizado um espécime diluído para mitigar os efeitos de uma possível inibição (ver a secção relativa às limitações para obter instruções mais detalhadas).

Consulte o Manual do operador do NeuMoDx 288 Molecular System (P/N: 40600108) ou o Manual do utilizador do operador do NeuMoDx 96 Molecular System (P/N: 40600317) para obter uma lista dos códigos de erro que podem estar associados a resultados inválidos.

#### Controlo de qualidade

Os regulamentos locais geralmente especificam que o laboratório é responsável pelos procedimentos de controlo que monitorizam o rigor e precisão de todo o processo analítico e deve estabelecer o número, tipo e frequência dos materiais de controlo do teste, utilizando especificações verificadas de desempenho para um sistema de teste aprovado e não modificado.

#### Controlos externos

1. Os controlos externos que contêm alvo EBV encapsulado não infeccioso em Basematrix para controlos positivos ou Basematrix para controlos negativos são fornecidos pela QIAGEN num kit que contém os NeuMoDx EBV External Controls [REF 900502].
2. Os controlos positivos e negativos externos precisam de ser processados uma vez a cada 24 horas. Se não existir um conjunto válido de controlos externos, o software do NeuMoDx System irá solicitar ao utilizador que processe esses controlos antes de poderem ser comunicados os resultados da amostra:

NeuMoDx EBV External Controls	Expected Concentration (Concentração esperada)	Esquema de cores da etiqueta
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	1,5E4 UI/mL (4,18 Log <sub>10</sub> UI/mL)	Vermelho
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	150 UI/mL (2,18 Log <sub>10</sub> UI/mL)	Cinza
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	N/A (N/D)	Preto

3. Ao processar controlos externos, colocar os controlos num transportador de tubos de espécime e utilizar o ecrã tátil para carregar o transportador no NeuMoDx System a partir da prateleira do carregador automático. O NeuMoDx System irá reconhecer os códigos de barras e iniciar os controlos de processamento, exceto quando não estiverem disponíveis os reagentes ou consumíveis necessários para o teste.
4. A validade destes controlos externos irá ser avaliada pelo NeuMoDx System com base nos resultados previstos.

NeuMoDx EBV External Controls	Resultado Quantitativo do EBV	Resultado do SPC1
NeuMoDx EBV High Positive Control (C1EBV)	EBV POSITIVE (EBV POSITIVO) [Conc] 3,68–4,68 Log <sub>10</sub> UI/mL	SPC1 Positivo
NeuMoDx EBV Low Positive Control (C2EBV)	EBV POSITIVE (EBV POSITIVO) [Conc] 1,58–2,78 Log <sub>10</sub> UI/mL	SPC1 Positivo
NeuMoDx EBV Negative Control (NCEBV)	EBV NEGATIVE (EBV NEGATIVO)	SPC1 Positivo

5. O tratamento de resultados discrepantes de controlos externos deve ser realizado da seguinte forma:
  1. Um resultado de teste Positivo (Positivo) comunicado para uma amostra de controlo negativo pode indicar uma contaminação e os procedimentos de controlo de qualidade do laboratório terão de ser analisados para encontrar a causa raiz. Certifique-se de utilizar áreas separadas para a preparação de amostras, tratamento de controlo e configuração de RT-PCR. Consultar o *Manual do Operador do NeuMoDx 288 Molecular System ou do 96 Molecular System* para dicas adicionais sobre resolução de problemas.
  2. Um resultado Negative (Negativo) para uma amostra de controlo positivo pode indicar um problema relacionado com o reagente ou com o instrumento.

3. Em ambos os casos acima ou no caso de um resultado No Result (Sem resultado, NR), Unresolved (Não resolvido, UNR) ou Indeterminant (Indeterminado, IND), repetir os controlos falhados com frascos recém-descongelados dos controlos que falharam o teste de validade.
4. Se o controlo externo positivo continuar a comunicar um resultado Negative (Negativo), contactar a assistência técnica da QIAGEN.
5. Se o controlo externo negativo continuar a comunicar um resultado Positive (Positivo), tentar eliminar todas as potenciais fontes de contaminação, incluindo substituir todos os reagentes e repetir o processamento antes de contactar a assistência técnica da QIAGEN.
6. Se os controlos externos não fornecerem os resultados esperados, será necessário repetir um conjunto de controlos positivo e negativo. Os resultados de amostra não serão comunicados se os controlos não fornecerem os resultados esperados.
7. O NeuMoDx System possui capacidade de Rerun/Repeat (Reexecução/Repetição) automática que pode ser utilizada pelo utilizador para assegurar que um resultado INVALID (Inválido) é reprocessado automaticamente para minimizar atrasos na comunicação de resultados.

### Controlos (internos) de processamento de amostras

Um controlo de processo de amostra (SPC1) exógeno está integrado na NeuMoDx Extraction Plate e passa por todo o processo de extração do ácido nucleico e de amplificação RT-PCR em tempo real com cada amostra/controlo/calibrador. Os iniciadores e a sonda específicos para o SPC1 estão incluídos em cada NeuMoDx EBV Quant Test Strip 2.0. Este SPC1 permite que o NeuMoDx System monitorize a eficácia dos processos de extração de ADN e de amplificação RT-PCR.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

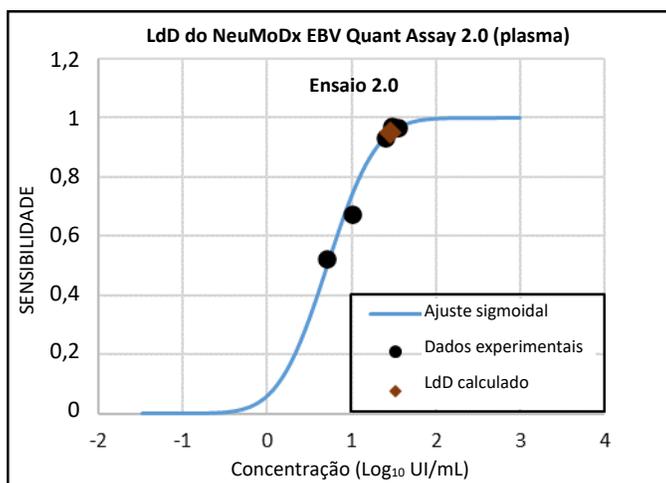
#### SENSIBILIDADE ANALÍTICA – Limite de deteção

A sensibilidade analítica do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 caracterizou-se em duas fases sequenciais: 1. Avaliação do Limite de deteção (LdD) preliminar (análise de probit) seguida pela 2. Confirmação do LdD. Na parte 1, os espécimes negativos e série de diluições do 1.º padrão internacional da OMS em plasma humano analisado negativo para EBV foram testados para determinar o LdD preliminar nos NeuMoDx Systems. O LdD foi definido como o nível de alvo mais baixo detetado a uma taxa de 95%, tal como determinado pela análise de Probit. Na parte 2, o LdD preliminar foi confirmado ao testar um painel artificial ao nível do LdD. Ambas as fases do estudo foram realizadas ao longo de 3 dias, em diversos sistemas, com vários lotes de reagentes do NeuMoDx. Na parte 1, foi processado um total de 144 réplicas a cada nível de diluição. As taxas de deteção estão descritas na *Tabela 2*.

**Tabela 2:** Determinação do LdD preliminar do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0

Concentração do alvo [UI/mL]	Concentração do alvo [ $\log_{10}$ UI/mL]	PLASMA		
		Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de deteção
35	1,54	144	139	96,5%
30	1,48	144	140	97,2%
25	1,40	143	133	93,0%
10	1,00	144	97	67,4%
5	0,70	143	75	52,4%
NEG	---	144	0	0,0%

O LdD do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 em plasma utilizando o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV foi determinado como sendo de 29,3 UI/mL ( $1,47 \log_{10}$  UI/mL) com um intervalo de confiança (IC) de 95% de 24,4–37,1 UI/mL, ( $1,39$ – $1,57 \log_{10}$  UI/mL) [Figura 1]. Esse LdD foi subsequentemente confirmado pela análise da taxa de identificação descrita na *Tabela 3*.



**Figura 1:** Análise de estilo Probit utilizada para determinar o LdD do NeuMoDx EBV Quant 2.0 em amostras de plasma

**Tabela 3: Confirmação do LdD do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0**

Sistema	Concentração do alvo [UI/mL]	Concentração do alvo [log <sub>10</sub> UI/mL]	Número de testes válidos	Número de positivos	Taxa de detecção
N96	29,3	1,47	96	94	97,9%
N288			96	92	95,8%
Tudo			192	186	96,9%

O LdD para o genótipo 2 (GT2) do EBV foi confirmado como sendo de 29,3 UI/mL [1,47 Log<sub>10</sub> UI/mL], como determinado pela análise da taxa de identificação.

Com base no resultado destes estudos, o LdD e o NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foram ambos determinados como sendo de 29,3 UI/mL [1,47 Log<sub>10</sub> UI/mL].

#### SENSIBILIDADE ANALÍTICA – Limite inferior de quantificação (LidQ)

O LidQ é definido como o nível de alvo mais baixo a que uma detecção > 95% é alcançada e o erro analítico total (Total Analytical Error, TAE) é ≤ 1,0. De forma a determinar o LidQ, o TAE foi calculado para cada um dos níveis do alvo EBV que apresentaram uma detecção > 95% como parte do cálculo do LdD. O TAE é definido da seguinte forma:

$$\text{TAE} = \text{tendência} + 2 \cdot \text{DP} \text{ (Estatística de Westgard)}$$

A tendência é o valor absoluto da diferença entre a média da concentração calculada e a concentração prevista. O DP refere-se ao desvio-padrão do valor quantificado da amostra.

Os resultados compilados para os 5 níveis do 1.º padrão internacional da OMS para espécimes de plasma do EBV utilizados no estudo do LidQ são apresentados na *Tabela 4*. Com base neste conjunto de dados e no LdD anteriormente determinado, o LidQ foi determinado como sendo de 30,0 UI/mL (1,48 Log<sub>10</sub> UI/mL) e confirmado para o genótipo 2 (GT2) do EBV.

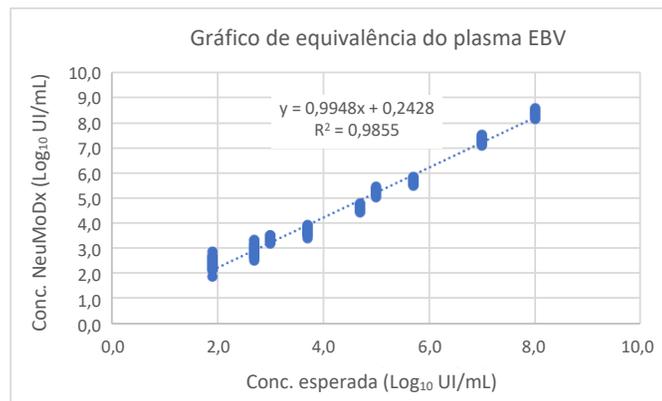
**Tabela 4: LidQ do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 com tendência e TAE**

Conc. do alvo [UI/mL]	Conc. do alvo [log <sub>10</sub> UI/mL]	Plasma				
		Conc. média [log <sub>10</sub> UI/mL]	Taxa de detecção	DP	Tendência	TAE
35	1,54	2,05	96,5%	0,23	0,50	0,96
30	1,48	1,97	97,2%	0,24	0,49	0,98
25	1,40	1,93	93,0%	0,24	0,53	1,02
10	1,00	1,96	67,4%	0,31	0,96	1,59
5	0,70	1,83	52,4%	0,27	1,13	1,68

Com base nos resultados desses estudos, o LdD do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi determinado como sendo de 29,3 UI/mL (1,47 log<sub>10</sub> UI/mL) e o LidQ foi determinado como sendo de 30,0 UI/mL [1,48 log<sub>10</sub> UI/mL].

#### Linearidade e determinação do limite superior de quantificação (LSdQ)

A linearidade e o limite superior de quantificação (LSdQ) do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foram estabelecidos em plasma, preparando uma série de diluições utilizando o alvo EBV encapsulado do NeuMoDx e a cultura ATCC de EBV (ATCC, Manassas, VA) com rastreabilidade estabelecida de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV, para além do 1.º padrão internacional da OMS para o EBV. Um painel de 10 membros foi preparado em plasma negativo para EBV agrupado em pools de forma a criar um painel que abrangesse um intervalo de concentração de 1,48-8,0 Log<sub>10</sub> UI/mL. O LSdQ do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi determinado como sendo de 8,0 Log<sub>10</sub> UI/mL. Foi preparado um painel de confirmação para avaliar a linearidade da curva-padrão e as concentrações do ensaio EBV comunicadas pelo NeuMoDx System em comparação com os valores esperados são apresentadas na *Figura 2*.

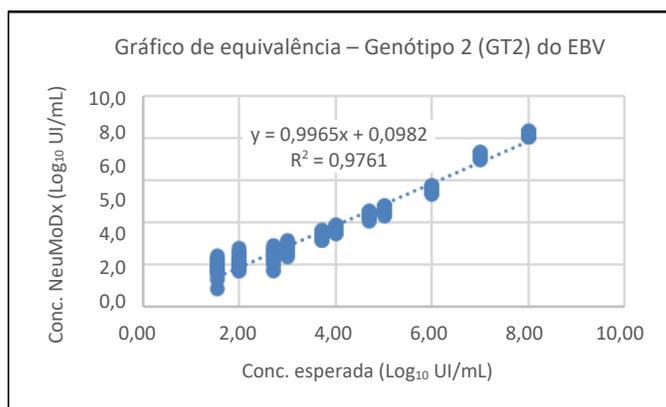

**Figura 2: Linearidade do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0**

### Linearidade do genótipo 2 (GT2) do EBV

A linearidade do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 no genótipo 2 (GT2) do EBV caracterizou-se ao testar 11 concentrações diferentes do GT2 do EBV com rastreabilidade estabelecido conforme o 1.º padrão internacional da OMS para o EBV, preparadas em plasma negativo para EBV agrupado. O estudo foi realizado ao testar 36 réplicas às 11 concentrações em 2 NeuMoDx Systems e 3 lotes de EBV Quant Test Strips 2.0. A linearidade para o genótipo 2 (GT2) do EBV é apresentada na *Tabela 5* e na *Figura 3*.

**Tabela 5:** Linearidade do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 para o genótipo 2 do EBV

Genótipo	Equação de linearidade y = Quantificação do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 x = Quantificação esperada	R <sup>2</sup>
GT2	y = 0,9965x – 0,0982	0,9761



**Figura 3:** Linearidade do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 para o genótipo 2 do EBV

### Especificidade analítica – Reatividade cruzada

A especificidade analítica foi demonstrada através da análise de 36 organismos que podem ser encontrados em espécimes de sangue/plasma, assim como espécies filogeneticamente semelhantes ao EBV no que diz respeito à reatividade cruzada. Os organismos a concentrações elevadas foram preparados em pools de 5–6 organismos. Os organismos testados são apresentados na *Tabela 6*. Nenhuma reatividade cruzada foi observada com qualquer um dos organismos testados, confirmando uma especificidade analítica de 100% do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

**Tabela 6:** Agentes patogênicos utilizados para demonstrar a especificidade analítica

Organismos não alvo					
Poliomavírus BK	Adenovírus tipo 5	Vírus do herpes simplex tipo 1	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Citomegalovírus	Vírus da hepatite C	Vírus do herpes simplex tipo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Vírus herpes humano tipo 6	Parvovírus B19	Vírus varicela-zoster	<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Vírus herpes humano tipo 7	Vírus JC	HIV 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Vírus herpes humano tipo 8	Vírus do papiloma humano 16	HIV 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Vírus da hepatite B	Vírus do papiloma humano 18	SV 40	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>

### Especificidade analítica – Substâncias interferentes, organismos comensais

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi avaliado em relação à interferência na presença de organismos não alvo, utilizando os mesmos pools de organismos preparados para o teste de reatividade cruzada listados acima, na *Tabela 6*. O plasma negativo para EBV foi enriquecido com organismos agrupados em pools de 4-7; estes pools foram, em seguida, enriquecidos com alvo EBV a uma concentração de 90 UI/mL [1,95 Log<sub>10</sub> UI/mL]. Nenhuma interferência significativa foi observada na presença destes organismos, tal como indicado pelo desvio mínimo da quantificação dos espécimes de controle que não continham qualquer agente interferente.

**Especificidade analítica – Substâncias interferentes, substâncias endógenas e exógenas**

O NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi avaliado na presença de substâncias endógenas e exógenas interferentes típicas, encontradas nos espécimes clínicos de plasma com EBV. Estas incluíam níveis anormalmente elevados de componentes sanguíneos, assim como medicamentos antivirais e imunossupressores comuns, classificados na *Tabela 7*. Cada uma das substâncias foi adicionada ao plasma humano analisado negativo para EBV, enriquecido com 90 UI/mL [ $1,95 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ ] de EBV, e as amostras foram analisadas em relação à interferência comparando a concentração comunicada com o controlo positivo. Além disso, foi também testado plasma comum em estado de doença associada à infeção por EBV em relação a possíveis interferências. A concentração e a tendência médias de todas as substâncias testadas em relação a amostras de controlo enriquecidas com o mesmo nível de EBV são indicadas na *Tabela 8*. Nenhuma das substâncias endógenas e exógenas afetou a especificidade do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0.

**Tabela 7: Teste de interferência – Agentes exógenos (classificação de medicamentos)**

Pool	Nome do medicamento	Classificação	Pool	Nome do medicamento	Classificação
Pool 1	Azatioprina	Imunossupressor	Pool 4	Trimetoprima	Antibiótico
	Ciclosporina	Imunossupressor		Vancomicina	Antibiótico
	Foscarnet	Antiviral (Herpesviridae)		Tacrolimus	Imunossupressor
	Ganciclovir	Antiviral (EBV)		Everolimus	Imunossupressor
	Cloridrato de valganciclovir	Antiviral (EBV)		Clavulanato de potássio	Antibiótico
Pool 2	Prednisona	Corticosteróide/ Imunossupressor	Pool 5	Famotidina	Antagonista do recetor de histamina
	Cidofovir	Antiviral (EBV)		Sulfametoxazol	Antibiótico
	Cefotetan	Antibiótico (largo espectro)		Valaciclovir	Antiviral (Herpesviridae)
	Cefotaxima	Antibiótico (largo espectro)		Letermovir	Antiviral (EBV)
	Fluconazol	Antifúngico		Ticarcilina dissódica	Antibiótico
Pool 3	Micofenolato mofetil	Imunossupressor	Leflunomida	Imunossupressor	
	Micofenolato de sódio	Imunossupressor			
	Piperacilina	Antibiótico			
	Sirolimus/Rapamicina	Imunossupressor			
	Tazobactam	Antibiótico modificado			

**Tabela 8: Teste de interferência – Agentes endógenos e exógenos**

Endógenos + Estado de doença	Conc. média	Tendência
	$\text{Log}_{10} \text{ UI/mL}$	$\text{Log}_{10} \text{ UI/mL}$
Hemoglobina	2,19	0,32
Triglicéridos	1,90	0,02
Bilirrubina	2,12	0,24
Albumina	1,95	0,07
Lúpus eritematoso sistémico (LES)	2,08	0,20
Anticorpo antinuclear (ANA)	2,36	0,48
Artrite reumatoide (AR)	1,89	0,01
Controlo positivo	1,88	N/D
Exógenos (medicamentos)	Conc. média	Tendência
	$\text{Log}_{10} \text{ UI/mL}$	$\text{Log}_{10} \text{ UI/mL}$
Pool 1: Azatioprina, Ciclosporina, Foscarnet, Ganciclovir, Cloridrato de valganciclovir	2,19	0,09
Pool 2: Prednisona, Cidofovir, Cefotetan, Cefotaxima, Fluconazol	2,11	0,01
Pool 3: Micofenolato mofetil, Micofenolato de sódio, Piperacilina, Sirolimus/Rapamicina, Tazobactam	2,16	0,06
Pool 4: Trimetoprim, Vancomicina, Tacrolimus, Everolimus, Clavulanato de potássio	2,24	0,14
Pool 5: Famotidina, Sulfametoxazol, Letermovir, Valaciclovir, Ticarcilina dissódica, Leflunomida	2,26	0,16
Controlo positivo	2,10	N/D

### Precisão intralaboratorial

A precisão do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi determinada testando 3 réplicas de um painel de 6 membros de espécimes de EBV preparados com NeuMoDx EBV Positive Control e cultura de EBV (ATCC, Manassas, VA) duas vezes por dia, utilizando dois NeuMoDx 288 Systems e dois NeuMoDx 96 System ao longo de 12 dias. Foram caracterizadas as precisões intraensaio, intradiária e intrassistema e o desvio padrão geral foi determinado como sendo  $\leq 0,18 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ . Foi demonstrada uma precisão excelente entre sistemas, dias e ensaios, tal como apresentado na *Tabela 9*. A precisão entre operadores não foi determinada, uma vez que o operador não desempenha um papel significativo no processamento de amostras utilizando o NeuMoDx System.

**Tabela 9:** Precisão intralaboratorial – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 nos NeuMoDx Systems

Conc. do alvo EBV [Log <sub>10</sub> UI/mL]	Conc. média de EBV [Log <sub>10</sub> UI/mL]	DP intrassistema	DP intradiário	DP intraensaio	DP geral (intralaboratorial)
7,70	7,82	0,10	0,08	0,08	0,11
6,00	6,07	0,12	0,11	0,11	0,13
5,00	4,75	0,13	0,12	0,11	0,13
4,00	3,78	0,13	0,11	0,11	0,14
3,00	2,93	0,15	0,14	0,13	0,16
1,95	2,19	0,17	0,16	0,16	0,18

### Reprodutibilidade lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi determinada avaliando 3 lotes de NeuMoDx EBV Quant Test Strips 2.0 como parte do teste de qualificação de Precisão intralaboratorial. Foi utilizado um painel de 6 membros de plasma positivo para EBV para avaliar o desempenho (*Tabela 10*). Os resultados gerados entre lotes foram analisados e são apresentados na *Tabela 10*. A tendência máxima foi de  $0,29 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ , e o DP máximo foi de  $0,18 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$  para as NeuMoDx EBV Quant Assay Test Strips 2.0. A equivalência de desempenho foi demonstrada entre lotes, uma vez que a quantificação de todos os membros do painel se encontrava dentro da especificação de tolerância.

**Tabela 10:** Reprodutibilidade lote a lote – NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0, Test Strip

Conc. esperada (Log <sub>10</sub> UI/mL)	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Conc. média (Log <sub>10</sub> UI/mL)	Conc. Logarítmica DP	Tendência Abs.	Conc. média (Log <sub>10</sub> UI/mL)	Conc. Logarítmica DP	Tendência Abs.	Conc. média (Log <sub>10</sub> UI/mL)	Conc. Logarítmica DP	Tendência Abs.
7,70	7,82	0,11	0,12	7,84	0,10	0,14	7,79	0,09	0,09
6,00	6,08	0,12	0,08	6,10	0,10	0,10	6,04	0,10	0,04
5,00	4,77	0,13	0,23	4,78	0,13	0,22	4,71	0,10	0,29
4,00	3,80	0,15	0,20	3,81	0,13	0,19	3,74	0,11	0,26
3,00	2,96	0,16	0,04	2,96	0,15	0,04	2,87	0,16	0,13
1,95	2,20	0,18	0,25	2,22	0,18	0,27	2,16	0,16	0,21

### Eficácia do controle de processo de amostra

O controle de processo de amostra (Sample Process Control 1, SPC1) está incluído no NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 para comunicar falhas nos passos do processo ou inibição que afeta o desempenho do ensaio. Utilizando o NeuMoDx CMV Quant Assay como modelo, a eficácia do SPC1 foi testada para espécimes de plasma em condições representativas de falhas críticas nos passos do processo que podem potencialmente ocorrer durante o processamento de amostras e que *poderão não ser detetadas* pelos sensores de monitorização do desempenho do NeuMoDx System. Os espécimes positivos (a  $3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ ) e os espécimes negativos para citomegalovírus foram contestados nas seguintes condições: presença do inibidor, sem fornecimento da solução de lavagem e sem expulsão da solução de lavagem. As ineficácias do processo que tiveram um efeito adverso na detecção/quantificação do alvo viral foram refletidas pelo desempenho do alvo de SPC1, tal como apresentado na *Tabela 11*. Em todos os casos testados, foi demonstrado que o controle de processo de amostra monitorizou adequadamente as ineficácias do processo e a presença dos inibidores ou a ineficácia antecipada do processo não teve um efeito adverso significativo, quer na detecção do SPC1, quer na detecção e quantificação do alvo viral. Por este motivo, o SPC1 demonstrou ser bem-sucedido na monitorização eficaz do desempenho do ensaio no NeuMoDx System.

**Tabela 11:** Eficácia do controle de processo de amostra para ADN viral em plasma\*

Passo do processo Falha testada	Estado de amplificação do controle de processo de amostra 1	Alvo de CMV Estado de amplificação	Resultado do ensaio
Presence of Inhibitor (Presença do inibidor)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Delivered (Sem fornecimento da solução de lavagem)	Not Amplified (Não amplificado)	Not Amplified (Não amplificado)	Unresolved (Não resolvido)
No Wash Blowout (Sem expulsão da solução de lavagem)	Amplified (Amplificado)	Amplified (Amplificado)	Positive (Positivo) com quantificação dentro de $0,3 \text{ Log}_{10} \text{ UI/mL}$ do controle

\*O citomegalovírus (CMV) presente em espécimes de plasma foi utilizado como sistema modelo para a avaliação da eficácia do controle de processo de amostra.

### Contaminação cruzada

A taxa de contaminação cruzada para espécimes de plasma foi determinada processando alternadamente amostras altamente positivas e negativas do EBV. Foram realizados cinco conjuntos de testes com este padrão com um total de 60 réplicas de plasma negativo para EBV e 60 réplicas de plasma enriquecido com EBV a 6,0 Log<sub>10</sub> UI/mL nos NeuMoDx 288 e 96 Molecular Systems. Em ambos os tipos de sistemas, todas as 120 réplicas do espécime negativo foram comunicadas como negativas, o que demonstra que não houve contaminação cruzada durante o processamento de amostras de plasma nos NeuMoDx Systems.

### Equivalência da matriz de espécimes

O teste foi realizado para demonstrar a equivalência entre espécimes recém-colhidos e congelados de plasma, utilizando um vírus semelhante que circula na corrente sanguínea, o CMV, como modelo. Os espécimes recém-colhidos foram mantidos a 4 °C até serem enriquecidos com três níveis de CMV e testados em relação à equivalência. As amostras foram congeladas durante um mínimo de 24 horas a -20 °C. Após este período de armazenamento congelado, os espécimes foram descongelados e novamente testados. Os resultados dos espécimes de plasma recém-colhidos vs. congelados foram comparados em relação à equivalência através de uma análise de regressão. Os dados demonstraram uma equivalência excelente entre espécimes de plasma recém-colhidos e congelados com um declive a 1,0 e tendência (intersecção) muito baixa, tal como apresentado na *Tabela 12* abaixo.

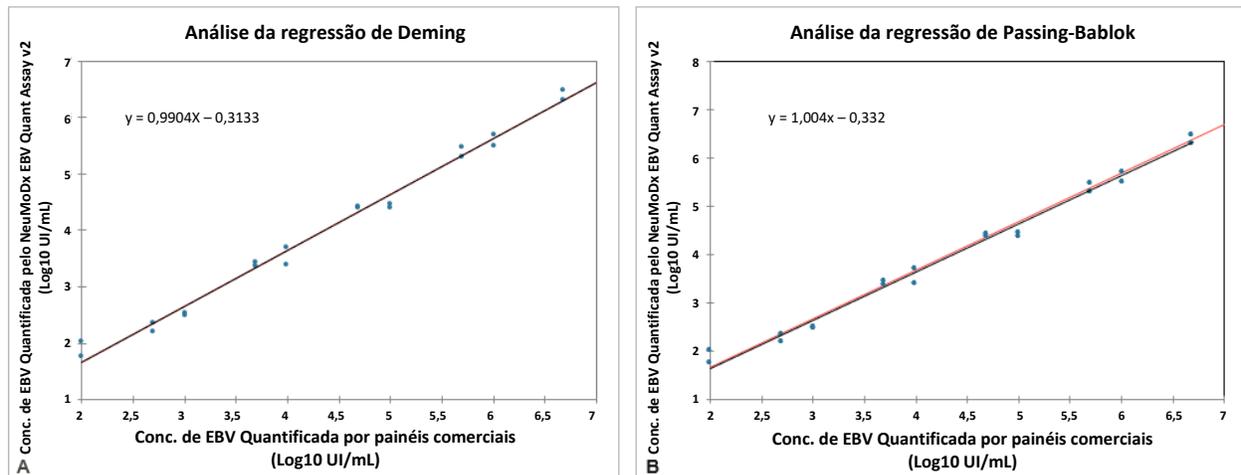
**Tabela 12:** Equivalência da matriz de espécimes

Requisito de parâmetro	EDTA recém-colhido vs. congelado
Inclinação [0,9–1,1]	1,000
Intersecção < 0,5 Log <sub>10</sub> UI/mL	0,020
valor <i>p</i> > 0,05	0,631

### Caracterização do desempenho quantitativo

O desempenho quantitativo do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 foi caracterizado processando dois painéis comerciais de verificação de EBV da AcroMetrix e da Exact Diagnostics (rastreadáveis de acordo com o 1.º padrão internacional da OMS para EBV) nos NeuMoDx Molecular Systems.

Foi obtida uma excelente correlação entre o NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 e os dois painéis comerciais de verificação de EBV (*Figura 4*), quando analisados com o método de regressão de Deming (*Figura 4A*) ou de Passing-Bablok (*Figura 4B*).



**Figura 4.** Gráfico de equivalência entre os painéis de verificação da AcroMetrix e Exact Diagnostics Verification e o NeuMoDx EBV Quant Assay. A. Análise de regressão linear utilizando o método de Deming. B. Análise de regressão linear utilizando o método de Passing-Bablok.

A qualidade do ajuste de regressão de Deming é ilustrada pelo coeficiente de inclinação geral de 0,990 e uma intersecção (tendência) de -0,313, demonstrando que os resultados de concentração obtidos entre o NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 e os painéis de verificação de EBV estão correlacionados com uma tendência aceitável. O ajuste linear de Passing-Bablok também apoia a importância da correlação entre os resultados obtidos do NeuMoDx EBV Quant Assay 2.0 e dos painéis de verificação de EBV com um coeficiente de inclinação geral de 1,004 e uma intersecção (tendência) de -0,332. O valor *p* da análise de Passing-Bablok foi calculado como sendo de 0,988.

**Tabela 13:** Resumo da análise de regressão linear de Deming e de Passing-Bablok

Análise de Deming		Análise de Passing-Bablok	
Intersecção	Coefficiente de inclinação	Intersecção	Coefficiente de inclinação
-0,313	0,990	-0,332	1,004
IC de 95% (-0,620, -0,007)	IC de 95% (0,928, 1,053)	IC de 95% (-0,548, -0,116)	IC de 95% (0,950, 1,047)

## REFERÊNCIAS

1. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
2. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant Direct*. 2016 Jan; 2(1): e48.
3. About Epstein-Barr Virus (EBV).” Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 28 Sept. 2020, www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html
4. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
5. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4; May 2014.

## MARCAS COMERCIAIS

NeuMoDx™ é uma marca comercial da NeuMoDx Molecular, Inc.

NeuDry™ é uma marca comercial da NeuMoDx Molecular, Inc.

Seracare® é uma marca comercial da Seracare Life Sciences, Inc.

TaqMan® é uma marca comercial da Roche Molecular Systems, Inc.

Todos os outros nomes de produto, marcas comerciais e marcas registradas que possam ser referidos neste documento pertencem aos seus respectivos proprietários.

## SÍMBOLO

	Sujeito a receita médica		Contém o suficiente para <n> testes
	Fabricante		Consultar as instruções de utilização
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Cuidado
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Perigo para a saúde
	Número de catálogo		Marcação CE
	Código de lote		Contém
	Data de validade		Contém material biológico de origem animal
	Limite de temperatura		Ácido bórico
	Não reutilizar		



NeuMoDx Molecular, Inc.  
1250 Eisenhower Place  
Ann Arbor, MI 48108, USA



Emergo Europe B.V.  
Westervoortsedijk 60  
6827 AT Arnhem  
The Netherlands

Assistência técnica/relatórios de vigilância: [support@qiagen.com](mailto:support@qiagen.com)

Patente: [www.neumodx.com/patents](http://www.neumodx.com/patents)

