

freemove

ECDTL2

Instruções de utilização do kit de Teste

Versão 13
Emitido em 27 de setembro de 2023

*Early*CDT[®]
LUNG

Índice

1. Utilização prevista.....	3
2. Introdução e noções básicas sobre o teste	3
3. Grupos de doentes recomendados.....	4
4. Limitações de utilização.....	4
5. Princípio do teste	4
6. Reagentes e materiais fornecidos	5
7. Equipamento, consumíveis e materiais necessários mas que não são fornecidos.....	7
8. Armazenamento e estabilidade	8
9. Indicações de instabilidade.....	8
10. Precauções de segurança	8
11. Armazenamento e manuseamento da recolha de amostras	9
12. Protocolo do ensaio	9
Passo 1: Preparação de reagentes e amostras.....	11
Passo 2: Incubação de amostras de doentes e de controlo	12
Passo 3: Adição de anticorpo secundário	14
Passo 4: Adição do substrato.....	14
Passo 5: Adição da solução de paragem.....	15
Passo 6: Medição espectralométrica.....	15
Passo 7: Cálculo de resultados do teste	15
13. Cálculo e Interpretação de resultados	16
14. Resumo dos resultados do estudo clínico	18
15. Rastreabilidade metrológica	18
16. Abordagem matemática.....	19
17. Intervalos de referência	19
18. Características de desempenho do ensaio.....	19
19. Resumo do Método.....	24
20. Glossário de termos para o EarlyCDT Lung.....	25
21. Glossário de símbolos	26
22. Referências.....	27
23. Garantia	27
24. Assistência Técnica e Serviço de apoio ao cliente	27
25. Resumo da segurança e do desempenho.....	27
26. Notificação de incidentes graves	27
27. Historial de revisões	28

1. Utilização prevista

O kit de teste EarlyCDT Lung destina-se a ser utilizado como um imunoensaio de deteção *in vitro* de um painel de sete autoanticorpos contra o cancro do pulmão em seres humanos, para ajudar na deteção precoce do cancro do pulmão em doentes de alto risco e na estratificação do risco de doentes com nódulos pulmonares indeterminados identificados por TC.

O kit de teste EarlyCDT Lung foi concebido para utilização profissional e os resultados analíticos deverão ser interpretados por profissionais médicos juntamente com todas as outras informações clínicas disponíveis. O teste destina-se a ser utilizado com soro humano recolhido em tubos com ativador de coagulação ou com gel ou utilizado com plasma recolhido em tubos com EDTA.

2. Introdução e noções básicas sobre o teste

O cancro do pulmão é a principal causa de todas as mortes relacionadas com o cancro em todo o mundo, afetando anualmente milhões de doentes. O cancro do pulmão é responsável por 13% dos casos de cancro e por 19% de todas as mortes por cancro, em ambos os géneros, em todo o mundo.¹ O tabagismo é a causa predominante do cancro do pulmão; no entanto, os seguintes fatores também são fatores de risco:

- Idade
- Género
- História de tabagismo
- Enfisema/DPOC
- História familiar de cancro do pulmão em familiares de primeiro grau
- Exposição ambiental, incluindo poeiras, amianto e radiação ionizante, incluindo gás radão

Os dados do National Lung Screening Trial² realizado nos EUA mostraram que a deteção precoce através do rastreio anual com tomografia computadorizada de baixa dose (TCBD) resulta numa melhoria de 20% na mortalidade por cancro do pulmão. Assim, a deteção precoce salva vidas. No entanto, o rastreio por TCBD tem desvantagens, na medida em que 96,4% das TCBD positivas são resultados benignos (falsos positivos).² Adicionalmente, fornece uma dose de radiação potencialmente nociva.

As células tumorais expressam proteínas em formas alteradas ou suprarreguladas em comparação com as suas homólogas normais (não malignas). Estas proteínas são conhecidas como antigénios associados a tumores (AAT) e algumas são libertadas na circulação do doente com cancro. Vários investigadores demonstraram que o sistema imunitário do doente com cancro reconhece frequentemente o estado alterado (por exemplo, mutação, sobreexpressão ou glicosilação aberrante) dos AAT como não sendo do organismo e cria uma resposta de anticorpos contra eles. Assim, esta resposta de anticorpos atua como um sinal precoce amplificado *in vivo* da presença de TAA (e, conseqüentemente, de tumores) no organismo. Estes anticorpos são designados por autoanticorpos (AAc), uma vez que são produzidos contra as proteínas alteradas do próprio hospedeiro e são estes os anticorpos que o teste EarlyCDT Lung foi concebido para medir. Por conseguinte, os resultados do teste EarlyCDT Lung podem ser utilizados como um auxiliar na identificação precoce da presença de cancro do pulmão. Em estudos de validação, o teste EarlyCDT Lung demonstrou uma elevada especificidade (> 90%)^{3, 4} e não é invasivo, é apenas necessária a colheita de uma amostra de sangue.

O ensaio é realizado através da realização de vários passos manuais e automatizados associados a equipamento de laboratório frequentemente utilizado na realização de testes de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA). A amostra diluída do doente é colocada nos poços da placa de ensaio revestida com antigénio e é incubada. Após vários passos de adição de reagentes, de incubação e de lavagem, os autoanticorpos ligados são finalmente detetados através da adição de um reagente colorimétrico e o sinal resultante de densidade ótica (DO) é medido através da utilização de um espetrofotómetro de placas. O leitor de placas exporta os dados de saída de DO para um ficheiro Excel para o cálculo de resultados do teste. O kit inclui um dispositivo USB que contém um modelo Excel bloqueado. Os resultados são transferidos manualmente para o modelo Excel, no qual o resultado do teste é gerado automaticamente. O ensaio aplica limiares de pontos de corte aos resultados quantitativos para obter uma resposta ordinal (Negativo, Moderado, Elevado) e, como tal, é semi-quantitativo.

3. Grupos de doentes recomendados

O kit de teste EarlyCDT Lung é recomendado para utilização em seres humanos com elevado risco de cancro do pulmão devido a uma combinação de fatores de risco, tais como, idade, género, história de tabagismo e outros fatores, tais como exposições ambientais (poeiras, amianto, substâncias radioativas), pessoas com história de enfisema/DPOC ou história familiar de cancro do pulmão num familiar de primeiro grau.

As recomendações atuais da Freenome são as seguintes:

- Doentes com ≥ 50 anos de idade, com história de tabagismo, de pelo menos, um maço-20 anos (equivalente a fumar um maço de cigarros por dia durante 20 anos).
- Doentes com 40-49 anos de idade com história de tabagismo, de pelo menos um maço-20 anos e pelo menos mais um fator de risco adicional (consultar a secção introdutória).

O kit de teste EarlyCDT Lung também pode ser utilizado em juntamente com técnicas de diagnóstico por imagem para avaliar melhor o risco de cancro do pulmão nos casos em que tenham sido detetados nódulos pulmonares indeterminados, que não tenham sido diagnosticados como malignos.

4. Limitações de utilização

Os doentes com uma história anterior de cancro de qualquer tipo não devem realizar o teste EarlyCDT Lung. A exceção a esta recomendação é para os doentes com antecedentes de carcinoma basocelular (CBC). Foi realizado um estudo e os dados demonstraram que o CBC não tem impacto no resultado do teste EarlyCDT Lung (dados em arquivo na Freenome).

O kit de teste EarlyCDT Lung não deve ser utilizado em doentes com doenças que resultem num nível elevado de proteínas séricas totais, por exemplo, mieloma, amiloidose, gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI).

5. Princípio do teste

Os doentes com cancro do pulmão podem produzir uma resposta humoral à sua doença⁵⁻⁸ e, em alguns casos, foram descritos autoanticorpos até quatro anos antes do diagnóstico clínico⁹⁻¹¹. O kit de teste EarlyCDT Lung da Freenome destina-se à deteção *in vitro* de autoanticorpos para um painel de sete antigénios do cancro do pulmão (CAGE, GBU4-5, HuD, MAGE A4, NY-ESO-1, p53 e SOX2) que estão presentes nas fases mais iniciais do cancro do pulmão^{3,12}. A partir de amostras pré-diagnósticas de doentes com cancro do pulmão colhidas no ensaio clínico UKCTOCS¹³, foi demonstrado que os níveis de autoanticorpos detetados pelo EarlyCDT Lung podiam estar elevados até 9 anos antes do diagnóstico clínico do cancro do pulmão, com um tempo médio de deteção de 4 anos.¹⁴

O kit de teste EarlyCDT Lung é realizado como um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto. Os reagentes fornecidos são utilizados em conjunto para a medição do painel dos sete autoanticorpos acima descritos num máximo de dez amostras de doentes. As placas são pré-revestidas com antigénios associados a tumores e com uma proteína de controlo (controlo VOL) em duas diluições: 50 nM e 160 nM, consultar a figura 1. A amostra diluída do doente é colocada nos poços da placa revestida e é incubada. Em cada placa fornecida podem ser utilizadas até cinco amostras de doentes. Após vários passos de adição de reagentes, de incubação e de lavagem, os autoanticorpos são finalmente detetados através da adição de um reagente colorimétrico e o sinal resultante é medido através da utilização de um espetrofotómetro de placas.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controlo de VOL	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		50 nM	160 nM	50 nM	160 nM	50 nM	160 nM	50 nM	160 nM	50 nM	160 nM	50 nM	160

Figura 1: Esquema da placa de microtitulação do EarlyCDT Lung. Uma fila inteira é revestida com o mesmo AAT, alternando entre 50 nM e 160 nM de proteína em cada poço. Os poços da fila H são revestidos com uma proteína de controlo para permitir a correção da ligação não específica.

6. Reagentes e materiais fornecidos

- Cada kit de teste EarlyCDT Lung contém os reagentes indicados na tabela 1, em quantidades suficientes para um máximo de oito ou dez testes, consoante a utilização:
 - Se ambas as placas de um kit estiverem a ser utilizadas ao mesmo tempo, podem ser processadas até dez amostras de doentes no total:
 - Cinco amostras de doentes na placa 1 juntamente com o Controlo A e cinco amostras de doentes na placa 2 juntamente com o Controlo B
 - Se as placas de um kit estiverem a ser utilizadas em momentos diferentes, podem ser processadas até oito amostras de doentes no total:
 - Quatro amostras de doentes na placa 1, juntamente com o Controlo A e o Controlo B
 - Quatro amostras de doentes na placa 2, juntamente com o Controlo A e o Controlo B
 - Uma vez que as placas de microtitulação parcialmente usadas devem ser eliminadas, a utilização mais eficiente deste kit é conseguida através do processamento de quatro ou dez amostras de doentes ao mesmo tempo.
- O prazo de validade do kit está indicado no rótulo fora da caixa.
- NÃO utilizar o kit após o prazo de validade.
- NÃO utilizar o kit se o selo exterior estiver violado após a receção e contactar earlycdt@freenome.com para comunicar a ocorrência.
- NÃO utilizar qualquer reagente, aberto ou fechado, após o prazo de validade.
- NÃO misturar reagentes de kits com lotes diferentes.

Tabela 1. Componentes do kit de teste EarlyCDT Lung ECDTL2

Referência do Componente	Componente	Quantidade	Armazenamento e estabilidade após a primeira utilização
ECDTL2-SD	Solução de diluição de amostras	1x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,1% de caseína bovina e 0,05% de ProClin 950.		
ECDTL2-SA	Anticorpo secundário	1x 0,27 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas (refere-se a solução mãe não diluída)
	Fração purificada de imunoglobulina de antissoro de coelho para IgG humana conjugada com peroxidase de rábano. Fornecida como uma solução mãe 100x (aproximadamente 0,02 g/L) numa solução salina tamponada com fosfato com 0,1% de caseína bovina. Contém 0,05% de ProClin 950.		
ECDTL2-AD	Solução de diluição de anticorpos	1x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,1% de caseína bovina e 0,05% de ProClin 950.		
ECDTL2-WB	Tampão de lavagem (20x)	1x 55 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas (refere-se a solução mãe não diluída). Diluir antes de utilizar.
	Solução concentrada de tampão fosfato salino e 2% de Tween 20. Contém 0,05% de ProClin 950.		
ECDTL2-MTP	Placas de 96 poços	2x placas	Eliminar após a primeira utilização
	Placas de poliestireno de 96 poços revestidas com proteínas humanas recombinantes e caseína bovina. Fornecidas secas numa bolsa de alumínio com excicante, estabilizador e conservante.		
ECDTL2-CA	Controlo A	2x 1,8 ml	Eliminar após a primeira utilização
	Um pool de fluidos humanos diluídos com solução de diluição de amostras até à concentração de trabalho. Formulado para ser reativo aos antígenos p53, SOX2, CAGE e NY-ESO-1. A concentração relativa de imunoglobulinas reativas para cada antígeno (expressa em unidades relativas) é fornecida no folheto específico do lote. Contém 0,1% de ProClin 950. Não necessita de diluição adicional.		
ECDTL2-CB	Controlo B	2x 1,8 ml	Eliminar após a primeira utilização
	Um pool de fluidos humanos diluídos com solução de diluição de amostras até à concentração de trabalho. Formulado para ser reativo aos antígenos MAGE A4, GBU4-5 e HuD. A concentração relativa de imunoglobulinas reativas a cada antígeno (expressa em unidades relativas) é fornecida no folheto específico do lote. Contém 0,1% de ProClin 950. Não necessita de diluição adicional.		
ECDTL2-SEAL	Películas adesivas	4x películas	Eliminar após a primeira utilização
ECDTL2-SUB	Substrato	1x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas Manter afastado da luz direta do sol
	Substrato para a peroxidase de rábano. Contém uma preparação pronta a usar de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Não necessita de diluição adicional.		
ECDTL2-SS	Solução de paragem	1x 27,5 ml	+2 a +8 °C durante 4 semanas
	Solução de fluoreto de sódio a 1g/L. Fornecida pronta a usar.		
ECDTL2-USB	Dispositivo USB	1x	+2 a +8 °C ou temperatura ambiente

Contém: Instruções de utilização (ECDTL2-IFU); Folheto específico do lote (ECDT2-LSI); Ficha De Dados De Segurança do Material; Certificado de análise; e software de cálculo de resultados do teste EarlyCDT Lung.

7. Equipamento, consumíveis e materiais necessários mas que não são fornecidos

Para realizar o teste EarlyCDT Lung, são necessários equipamentos, consumíveis e materiais adicionais, que não são fornecidos com o kit. Estes estão indicados na tabela 2.

Tabela 2. Equipamento, consumíveis e materiais necessários mas que não são fornecidos

Item	Descrição
1. Proveta graduada	50 ml e 1000 ml: Para medir e preparar o tampão de lavagem e a solução de anticorpos secundários.
2. Água desionizada	Para a preparação do tampão de lavagem.
3. Tubo de 50 ml com tampa	Para utilização durante a diluição da solução de anticorpos secundários.
4. Pipetas	<p>20 μL: Para a preparação de amostras de doentes.</p> <p>Pipeta de 8 canais de 100 μL: Para colocar a solução de anticorpos secundários, o substrato e a solução de paragem nos poços de cada coluna da placa.</p> <p>Nota: A Freenome recomenda a utilização de uma pipeta eletrónica multicanal de 50 – 1200 μL, se disponível, para colocar os reagentes.</p> <p>100-1000 μL: Para preparação dos anticorpos secundários e colocação das amostras de doentes.</p> <p>1-5 ml: Para a diluição dos anticorpos secundários e amostras de doentes.</p> <p>Nota: De modo a garantir a precisão da pipetagem, todas as pipetas utilizadas devem ser calibradas e deve ser realizada a sua manutenção.</p>
5. Pontas de pipeta	Adequadas para uma pipetagem precisa com as pipetas acima mencionadas.
6. Recipientes para reagentes	São necessários 3 recipientes limpos, com capacidade de até 25 ml, para guardar a solução de anticorpos secundários, o substrato ou a solução de TMB durante a pipetagem com uma pipeta multicanal.
7. Agitador de placas de microtitulação	Com uma órbita de agitação de 1,5 a 4,5 mm. Consultar a tabela 3 para obter informações sobre a velocidade adequada a utilizar consoante a órbita de agitação.
8. Lavadora de placas de microtitulação ou frasco de lavagem	Um frasco dispensador de lavagem com capacidade para 0,5 L de solução. Ou, uma lavadora automática de placas capaz de realizar 4 ciclos de lavagem consecutivos com um volume de enchimento de 300 μ L/poço.
9. Temporizador	Para garantir que os passos de incubação são realizados durante o tempo especificado no protocolo do ensaio.
10. Papel absorvente	Para remover qualquer líquido residual dos poços após a lavagem.
11. Espectrofotómetro de placas de microtitulação	Com um comprimento de onda de leitura de 650 nm e um intervalo mínimo de funcionamento de 0-3 DO. Nota: O teste foi validado no espectrofotómetro de placas Tecan Infinite M200
12. Portátil com ligação USB e	Para o cálculo de resultados do teste, utilizando o dispositivo

o Microsoft Excel 2007 ou USB fornecido com o kit.
mais recente

Nota: Se o laboratório que estiver a realizar o kit de teste EarlyCDT Lung, implementar qualquer automatização de equipamento, esta automatização deve ser validada de acordo com os procedimentos do sistema de gestão da qualidade do laboratório.

Tabela 3. Velocidade de agitação a utilizar baseada na órbita de agitação

Órbita de agitação (mm)	Velocidade (RPM)
1,5-2,0	600
2,5-3,0	500
3,5-4,5	400

8. Armazenamento e estabilidade

O kit de teste EarlyCDT Lung é estável até à data do prazo de validade indicado no rótulo da caixa, desde que os reagentes sejam armazenados, conforme indicado, a uma temperatura entre +2 e +8 °C.

Os reagentes do kit que não foram abertos devem ser armazenados de acordo com as instruções da embalagem individual dos reagentes e são estáveis tal como fornecidos até à data do prazo de validade do kit. Uma vez aberto, cada reagente é estável durante o período indicado na tabela 1.

Os kits ou os componentes do kit que não tenham sido armazenados de acordo com as condições acima mencionadas não devem ser utilizados.

9. Indicações de instabilidade

O substrato deve ser incolor. Uma cor azul indica que o reagente pode ter sido contaminado e deve ser eliminado.

10. Precauções de segurança

Utilização em diagnóstico *in vitro*:

- Os produtos sanguíneos são potencialmente infecciosos e devem ser manuseados, armazenados e eliminados de acordo com os regulamentos locais relativos a riscos biológicos.
- Os reagentes de controlo fornecidos com este kit são de origem humana. Foram testados e considerados não reativos para o Anticorpo VIH-1/2, Anticorpo VHC e Antigénio de Superfície da Hepatite B (HBsAg). Uma vez que nenhum método pode excluir completamente a presença de agentes patogénicos transmitidos pelo sangue, o manuseamento e a eliminação dos reagentes de controlo deste kit devem ser realizados como se estes reagentes fossem potencialmente infecciosos.
- A ficha de dados de segurança do material (FDSM) fornece informações detalhadas sobre a eliminação e o manuseamento corretos e os perigos associados ao kit de teste EarlyCDT Lung. A FDSM está incluída no dispositivo USB fornecido com o kit e também está disponível na Freenome (número de telefone: +44 (0)115 784 0501 ou e-mail: earlycdt@freenome.com).

Os seguintes componentes: Anticorpo secundário, Tampão de lavagem, solução de diluição de anticorpos e de amostras, Controlo A, Controlo B e placas de microtitulação de 96 poços são classificados como sensibilizantes para a pele (categoria 1A) e podem causar uma reação alérgica cutânea. Ao manusear estes componentes, deve ser utilizado Equipamento de Proteção Individual (EPI) adequado. Para obter informações adicionais, consulte as Fichas de Dados de Segurança fornecidas.

11. Armazenamento e manuseamento da recolha de amostras

O kit de teste EarlyCDT Lung destina-se a ser utilizado com soro ou plasma humanos, recolhidos num dos seguintes tubos:

- Soro: tubos com ativador de coagulação ou com gel.
- Plasma: recolha em tubos com EDTA.
- **Nota:** O plasma recolhido em tubos com heparina e citrato **não deve ser utilizado.**

Realizar a colheita de sangue por punção venosa ou picada no dedo e processar de acordo com as instruções do fabricante do tubo de colheita para separar o soro ou o plasma do material celular e coagulado. As amostras de sangue total devem ser armazenadas à temperatura ambiente (+18 a +25 °C) e devem ser processadas no prazo de quatro dias. Se as amostras de soro ou plasma não forem analisadas imediatamente, podem ser armazenadas numa das seguintes opções: +2 a +8 °C durante 14 dias ou a -25 °C a -15 °C ou a -85 a -65°C durante até 12 meses. As amostras não devem ser submetidos a mais de 5 ciclos de congelação-descongelação. Antes da análise, permitir que as amostras congeladas atinjam a temperatura ambiente e misturar bem, através de inversão suave.

12. Protocolo do ensaio

Precauções e notas sobre o ensaio para ler ANTES de iniciar um ensaio do kit de teste EarlyCDT Lung



Certifique-se que o ensaio é realizado a uma temperatura entre +18 e +22 °C e que todos os reagentes estão a esta temperatura antes de serem utilizados.



Cada passo de incubação cronometrada deve ser realizado exatamente durante o período indicado. Assim que uma placa estiver preenchida, deve ser iniciado um temporizador.



Todo o equipamento utilizado deve ser adequadamente mantido, calibrado e validado para garantir o seu correto funcionamento.



Certifique-se que não ocorre mistura de reagentes, através da utilização de recipientes limpos para cada reagente.



Não utilize o kit se o selo exterior estiver violado após a receção.



Não utilize quaisquer reagentes do kit se estiverem danificados, parecerem ter derramado ou estiverem abertos.



Não armazene os reagentes em embalagens diferentes daquelas em que foram recebidos.



O kit de teste EarlyCDT Lung foi desenvolvido para ser realizado em ambiente laboratorial por um técnico de laboratório qualificado*. Certifique-se de compreender totalmente o protocolo antes de iniciar um ensaio.



Elimine as soluções, especialmente as que contêm material biológico, de acordo com os regulamentos locais de eliminação.



Verifique o conteúdo do kit e compare-lo com a listagem incluída na tabela 1 para confirmar que estão presentes todos os componentes necessários.



As informações do doente podem ser introduzidas no software fornecido com este dispositivo. Os utilizadores devem garantir que o hardware do computador utilizado para executar o software do kit tem medidas de segurança e acesso adequadas implementadas de acordo com os requisitos locais de proteção de dados dos doentes. Estas medidas devem incluir o controlo do acesso físico e eletrónico do utilizador. Para funcionar, o software do kit não precisa de acesso à rede informática.



A fiabilidade dos resultados do ensaio não pode ser garantida se existirem quaisquer desvios ao protocolo fornecido neste documento.

Contacte o serviço de apoio ao cliente da Freenome através do número de telefone +44 (0)115 784 0501 ou através do e-mail earlycdt@freenome.com para obter assistência, se o selo exterior estiver violado após a receção, se o kit ou os componentes tiverem sido armazenados fora do intervalo especificado ou se os reagentes estiverem danificados ou apresentarem derrames.

*Um técnico de laboratório qualificado é definido como um indivíduo com experiência de realização de testes ELISA, com formação e competência para a execução de procedimentos laboratoriais gerais, tais como, a preparação de tampões e a utilização de pipetas e, que seja capaz de seguir meticulosamente as instruções.

Passo 1: Preparação de reagentes e amostras

 Leia as seguintes notas importantes associadas a este passo.

- a. Registe, na tabela 4 seguinte, o número do LOTE indicado no rótulo da caixa do kit e os números de identificação da sua amostra:

Número do LOTE do kit: _____ (será necessário para utilizar o software de cálculo de resultados)

Tabela 4: IDs das amostras

Placa 1	ID da amostra	Placa 2	ID da amostra
Amostra 1		Amostra 6	
Amostra 2		Amostra 7	
Amostra 3		Amostra 8	
Amostra 4		Amostra 9	
Amostra 5		Amostra 10	

- b. Retire todos os componentes da caixa do kit e deixe equilibrar a temperatura a +18 a +22 °C durante, **pelo menos, duas horas antes da utilização**.
- c. Dependendo do número de placas a utilizar no ensaio, prepare os reagentes do ensaio e as amostras de doentes conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5: Preparação dos reagentes do ensaio

Preparação	Ensaio com 1 placa (Máx. 4 amostras)	Ensaio com 2 placa (Máx. 10 amostras)
Tampão de lavagem	Misture 25 ml de Tampão de lavagem (ECDTL2-WB) com 475 ml de água desionizada	Misture 50 ml de Tampão de lavagem (ECDTL2-WB) com 950 ml de água desionizada
Anticorpo secundário	Misture 0,12 ml de solução concentrada de anticorpos (ECDTL2-SA) com 12 ml de solução de diluição de anticorpos (ECDTL2-AD)	Misture 0,24 ml de solução concentrada de anticorpos (ECDTL2-SA) com 24 ml de solução de diluição de anticorpos (ECDTL2-AD)
Amostras de doentes	Misture 20 µL de amostra do doente com 2,2 ml de solução de diluição de amostras (ECDTL2-SD)	

- d. Retire uma ou ambas as placas de microtitulação das suas respectivas bolsas de alumínio (Referência do Componente: ECDTL2-MTP), dependendo do número de amostras de doentes.



Passo 1 - notas importantes:

- Devido à elevada concentração de sais no tampão de lavagem fornecido, pode observar-se cristalização. Se isto ocorrer, é apenas necessário aquecer antes da utilização para dissolver novamente os sais, colocando o frasco diretamente num banho de água a 37 °C ou mantendo o frasco selado sob água corrente quente até que a cristalização deixe de ser visível.

- É recomendado que centrifugue, de forma breve, o frasco da solução concentrada do conjugado de anticorpos secundários durante 5 segundos utilizando uma microcentrifuga, ou que bata com o frasco na bancada para que se solte qualquer conteúdo que possa ter ficado preso na tampa do frasco, durante o transporte.
- Dilua a solução concentrada do conjugado de anticorpos secundários num tubo de 50 ml e fechar. Misture por inversão 5 vezes antes de utilizar.
- Inverta as amostras de doentes e as soluções controlo várias vezes para misturar antes da utilização.
- Certifique-se que é utilizada uma ponta de pipeta limpa para manusear cada amostra de doente ou controlo.
- Armazenar os reagentes e as amostras diluídas à temperatura ambiente no dia da utilização; caso contrário, conservar entre +2 e +8 °C.
- Certifique-se que as placas estão equilibradas à temperatura ambiente **antes** de abrir a bolsa de alumínio.

Passo 2: Incubação de amostras de doentes e de controlo

- a. Certifique-se que as placas estão orientadas de modo a que o poço A1 se encontre no canto superior esquerdo.
- b. Dependendo do número de placas a utilizar no seu ensaio, adicione as amostras do doente e o controlo do kit à placa 1 e/ou 2, da seguinte forma:

Ensaio com uma placa

- i. Seguindo o esquema da Placa 1 na figura 2 seguinte, coloque 100 µL de Controlo A (tampa VERMELHA, Referência do Componente: ECDTL2-CA) em cada poço das colunas 1 e 2.
- ii. Coloque 100 µL de Controlo B (tampa AZUL, Referência do Componente: ECDTL2-CB) em cada poço das colunas 3 e 4.
- iii. Coloque 100 µL da amostra 1 de doente diluída em cada poço das colunas 5 e 6. REPITA com as amostras 2, 3 e 4 de doentes, tal como apresentado para a Placa 1.
- iv. Assim que a placa estiver preenchida, inicie um temporizador para 90 minutos. Avance para o passo c).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control A		Control B		Specimen 1		Specimen 2		Specimen 3		Specimen 4	

Figura 2: Esquema da Placa quando é utilizada uma placa de microtitulação num ensaio.

Ensaio com duas placas

- i. Seguindo o esquema da Placa 1 na figura 3 seguinte, coloque 100 μ L de Controlo A (tampa VERMELHA, Referência do Componente: ECDTL2-CA) em cada poço das colunas 1 e 2.
- ii. Coloque 100 μ L da amostra 1 de doente diluída em cada poço das colunas 3 e 4. REPITA com as amostras 2, 3, 4 e 5 de doentes, tal como apresentado para a Placa 1.
- iii. Assim que a Placa 1 estiver preenchida, inicie um temporizador para 90 minutos.
- iv. Seguindo o esquema da Placa 2 na figura 4 seguinte, coloque 100 μ L de Controlo B (tampa AZUL, Referência do Componente: ECDTL2-CB) em cada poço das colunas 1 e 2.
- v. Coloque 100 μ L da amostra 6 de doente diluída em cada poço das colunas 3 e 4. REPITA com as amostras 7, 8, 9 e 10 de doentes, tal como apresentado para a Placa 2.
- vi. Assim que a Placa 2 estiver preenchida, inicie outro temporizador para 90 minutos. Avance para o passo c).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control A		Specimen 1		Specimen 2		Specimen 3		Specimen 4		Specimen 5	

Figura 3: Esquema da Placa 1 quando são utilizadas simultaneamente as duas placas de microtitulação fornecidas num único kit.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SOX2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CAGE	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NY-ESO-1	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GBU4-5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MAGE A4	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HuD	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
VOL control	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		Control B		Specimen 6		Specimen 7		Specimen 8		Specimen 9		Specimen 10	

Figura 4: Esquema da Placa 2 quando são utilizadas simultaneamente as duas placas de microtitulação fornecidas num único kit.

- c. Assim que os reagentes de controlo e as amostras de doentes sejam adicionados à(s) placa(s) de microtitulação, cubra cada placa com uma película adesiva (Referência do Componente: ECDTL2-SEAL), tendo o cuidado de se certificar que a película adesiva cobre adequadamente todos os poços da placa.
- d. Coloque a placa coberta num agitador de placas de microtitulação à velocidade de agitação adequada (consultar a tabela 3), incube durante um intervalo de tempo total de 90 minutos (de acordo com o temporizador já iniciado) a +18 a +22 °C.
 - Se o seu agitador de placas não tiver uma definição de velocidade, utilize uma velocidade de agitação "moderada", que poderá ter de ser ajustada conforme necessário.

Passo 3: Adição de anticorpo secundário

- a. Retire cuidadosamente a película adesiva de cada placa e deite o conteúdo dos poços num recipiente adequado para resíduos biológicos. Bata sobre papel absorvente para remover totalmente o líquido.
- b. Utilize um frasco dispensador e, encha cada poço com o tampão de lavagem preparado e, em seguida, deite o conteúdo num recipiente adequado para resíduos biológicos. Bata firmemente a placa sobre papel absorvente para remover totalmente o líquido dos poços.
 - REPITA todo este passo de lavagem mais três vezes.
 - Se utilizar uma lavadora automática de placas, realize uma lavagem de quatro ciclos (300 µL/poço) utilizando o tampão de lavagem fornecido com o kit.
- c. Com a utilização de uma pipeta de 8 canais, coloque 100 µL de solução de trabalho de anticorpos secundários em cada poço da placa, em cada coluna sequencialmente (isto é, 1, 2, 3, 4...etc.).
- d. Assim que uma das placa tiver sido preenchida, inicie um temporizador para 60 minutos.
- e. Cubra cada placa e colocá-la num agitador de placas de microtitulação. Incube durante 60 minutos (de acordo com o temporizador já iniciado) a +18 a +22 °C, à velocidade de agitação adequada.

Passo 4: Adição do substrato

 Leia as seguintes notas importantes associadas a este passo.

- a. Retire cuidadosamente a película adesiva de cada placa e deite o conteúdo dos poços num recipiente adequado para resíduos biológicos. Bata sobre papel absorvente para remover totalmente o líquido.
- b. Utilize um frasco dispensador e, encha cada poço com o tampão de lavagem preparado e, em seguida, deite o conteúdo num recipiente adequado para resíduos biológicos. Bata firmemente a placa sobre papel absorvente para remover totalmente o líquido dos poços.
 - REPITA todo este passo de lavagem mais três vezes.
 - Se utilizar uma lavadora automática de placas, realize uma lavagem de quatro ciclos (300 µL/poço) utilizando o tampão de lavagem fornecido com o kit.
- c. Com a utilização de uma pipeta de 8 canais, colocar 100 µL de substrato (Referência do Componente: ECDTL2-SUB) em cada poço da placa, em cada coluna sequencialmente (isto é, 1, 2, 3, 4...etc.).
- d. **Imediatamente** após a colocação do substrato em todos os 96 poços da primeira placa, inicie um temporizador para 15 minutos e deixe a placa a incubar a +18 a +22°C, protegida da luz.
- e. No fim da incubação de 15 minutos, bata na parte lateral da(s) placa(s) durante aproximadamente 10 segundos para garantir que a cor desenvolvida em cada poço é homogénea (ou seja, não é visível qualquer aglomeração).



Passo 4 - notas importantes:

- É muito importante que o substrato não seja deixado a incubar durante um intervalo de tempo superior a 15 minutos.
 - Certifique-se que, durante a incubação de 15 minutos a +18 a +22 °C, a exposição à luz seja limitada, tanto quanto possível.
-

Passo 5: Adição da solução de paragem

- a. Adicione 100 µL de Solução de paragem (Referência do Componente: ECCTL2-SS) a cada poço, seguindo a mesma ordem em que foi adicionado o substrato.
 - Nota: quando a solução de paragem é adicionada, não haverá alteração visível de cor.
- b. A placa de microtitulação pode ser lida imediatamente após a adição da solução de paragem. Para realizar a leitura da placa, avance para o Passo 6.
 - Nota: Antes da leitura, as placas podem ser deixadas durante um intervalo de tempo máximo de 30 minutos a +18 a +22 °C.

Passo 6: Medição espectrofotométrica

 Leia as seguintes notas importantes associadas a este passo.


- a. Insira a primeira placa de microtitulação num leitor de placas, certificando-se que o poço A1 é colocado no canto superior esquerdo.
- b. Meça a densidade ótica de cada poço da placa de microtitulação por espectrofotometria a um comprimento de onda de 650 nm.
- c. Exporte os valores da densidade ótica (DO) resultantes para um ficheiro Excel para cálculo de resultados do teste.



Passo 6 - notas importantes:

- Não realize a leitura da placa com um comprimento de onda diferente de 650 nm.
- Se for necessário um comprimento de onda de referência, é recomendada a utilização de 480 nm.

Passo 7: Cálculo de resultados do teste

 Leia as seguintes notas importantes associadas a este

- a. Introduza o dispositivo USB (Referência do Componente: ECCTL2-USB) num portátil e abra o ficheiro "Ensaio com 2 placas" ou "Ensaio com 1 placa", dependendo do número de placas utilizadas.
- b. No separador "Passo 1. Introdução de dados", faça o seguinte:
 - Introduza o número do LOTE do kit no campo "Introduzir LOTE do kit" (consulte a figura 5(A)).
 - Introduza a data do ensaio no campo "Introduzir Data do Ensaio" (consulte a figura 5(A)).
 - Introduza uma identificação para cada amostra no campo adequado (consulte a figura 5(B)).
 - Introduza os valores de DO do ficheiro Excel produzido no passo 6 nos campos adequados (consulte a figura 5(C))
- c. No separador "Passo 2. Informação do Doente", introduza todas as informações relevantes sobre o doente.
- d. Selecione o separador "Passo 3a. Resultados" para ver o resultado do teste EarlyCDT Lung para cada doente.
- e. Selecione os separadores "Passo 3b. Relatório do doente" para imprimir um relatório do teste para cada doente.
 - Para obter informações sobre o significado do resultado do teste, consulte a secção "Interpretação dos resultados", tabela 6, nestas Instruções de utilização, ou consulte as informações fornecidas no relatório do teste do doente.

ENTER KIT LOT:	
ENTER ASSAY DATE:	

Use input fields

Test Kit result calculation (ONE plate format)

Important: This test result calculation file should be used in accordance with Step 6 of the Assay protocol within the IFU.

Plate 1	Enter an ID for your sample:
Sample 1	
Sample 2	
Sample 3	
Sample 4	

PLATE 1													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
p53	A												
SOX2	B												
CAGE	C												
NY-ESO-1	D												
GBU4-5	E												
MAGE A4	F												
HuD	G												
VCL	H												
Sample ID		Control A	Control B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4						

Step 1. Data Input | Step 2. Patient Information | Step 3a. Results | Step 3b. Patient Report | Step 3b. Patient Report (nb) | Step 3b1. Patient Report 1

Figura 5. Página de abertura do software de cálculo de resultados do kit de teste EarlyCDT Lung. (A) Para utilizar o software, é necessário introduzir o número correto do LOTE do kit. (B) As identificações das amostras devem ser registadas. (C) Os dados de DO exportados são introduzidos nos campos relevantes.



Passo 7 - Notas importantes:

- O software transferido para o dispositivo USB é específico para cada LOTE de kits de teste EarlyCDT Lung. Por conseguinte, deve certificar-se de que é utilizado o dispositivo USB fornecido com o kit para o cálculo dos resultados. Se não for utilizado o software correto, o resultado do teste será incorreto. O número do LOTE do kit está indicado no rótulo da caixa exterior do kit.

13. Cálculo e Interpretação de resultados

O kit de teste EarlyCDT Lung não requer cálculos manuais, uma vez que os cálculos são automatizados no software fornecido na pen USB com o kit.

O kit de teste EarlyCDT Lung foi concebido para utilização profissional e os resultados analíticos deverão ser interpretados por profissionais médicos qualificados juntamente com todas as outras informações clínicas disponíveis. Um resultado moderado ou elevado indica que o risco de o doente ter cancro do pulmão é superior ao previsto apenas pelo seu género, idade, história de tabagismo e outros fatores de risco. As estimativas do aumento do risco após um resultado positivo moderado ou elevado são tabuladas no fim do relatório do doente (o aumento é maior após um resultado positivo elevado em comparação com um resultado positivo moderado). Os cálculos foram baseados na adição de um teste de diagnóstico a um risco de base utilizando o rácio de probabilidade de diagnóstico¹⁵. O aumento do risco pode justificar uma recomendação para a realização de testes adicionais, que podem incluir a imagiologia por TC. Um resultado de teste negativo indica que o risco do doente ter cancro do pulmão se mantém inalterado. Assim, quaisquer estimativas do risco de cancro do pulmão realizadas antes do teste, baseadas apenas em fatores de risco, continuam a ser aplicáveis. A tabela 5 apresenta uma descrição dos resultados do teste e dos termos que podem ser visualizados no software do kit.

Tabela 6: Descrição dos resultados do teste e dos termos utilizados no software do kit

Intervalo de aceitação do CQ

Os controlos utilizados com o kit têm um intervalo de aceitação que é definido na "Ficha específica do lote" incluída no dispositivo USB fornecido com o kit.

Resultado do controlo	Descrição
Aprovado pelo CQ	Os dados do controlo estão dentro do intervalo de aceitação.
Não aprovado pelo CQ	Os dados do controlo estão fora do intervalo de aceitação e o teste deve ser repetido. Isto pode dever-se a várias razões. Contacte a Freenome para obter assistência técnica através de earlycdt@freenome.com
Resultados do teste	Descrição
Elevado	Um ou mais autoanticorpos no painel EarlyCDT Lung estão acima do valor do limiar superior. O aumento do risco é muito significativo e é provável que influencie a via de cuidados de saúde do doente.
Moderado	Um ou mais autoanticorpos no painel EarlyCDT Lung estão acima do valor do limiar inferior, no entanto, todos estão abaixo do valor do limiar superior. O aumento do risco é significativo e poderá ser suficiente para influenciar a via de cuidados de saúde do doente.
Não foi detetado um nível significativo de autoanticorpos	Todos os autoanticorpos no painel EarlyCDT Lung estão abaixo do valor do limiar inferior. Nota: Um resultado do teste de "Não foi detetado um nível significativo de autoanticorpos" indica uma menor probabilidade de cancro do pulmão do que um resultado positivo, mas não significa que o doente não tenha, ou não venha a desenvolver, cancro do pulmão. Para ser elegível para o teste, o doente já tem um risco elevado de cancro do pulmão, tal como previsto pela idade, género, história de tabagismo e outros fatores de risco. Este resultado não exclui a presença de cancro do pulmão nem altera a influência destes fatores no risco do doente.
Inválido	Não foi possível determinar um resultado para este autoanticorpo. Todos os outros autoanticorpos permanecem válidos. Se uma placa ou uma amostra específica não for aprovada pelas verificações do CQ, o resultado do teste para a(s) amostra(s) do respetivo doente será "Inválido" e o teste EarlyCDT Lung deve ser repetido para essa(s) amostra(s). Contacte a Freenome para obter assistência técnica através de earlycdt@freenome.com

14. Resumo dos resultados do estudo clínico

O teste EarlyCDT Lung foi validado clinicamente em quatro estudos de caso-controlo separados que envolveram um total de 1153 doentes com cancro do pulmão e 937 controlos normais. Os casos e os controlos foram comparados de acordo com a idade, o género e história de tabagismo. A sensibilidade e a especificidade clínicas do teste de sete autoanticorpos em dois estádios (negativo, positivo) foram de 35% e 91%, respetivamente, tendo sido também calculados os rácios de probabilidade diagnóstica; 3,81 para o positivo (DLRp) e 0,72 para o negativo (DLRn). Num contexto de rastreio (1% de prevalência), o cálculo da precisão foi de 90%, o valor preditivo positivo (VPP) de 3,7% e um valor preditivo negativo (VPN) de 99,3%. Num contexto de nódulo (taxa de malignidade de 25%), o cálculo da precisão foi de 78%, o VPP de 55,3% e o VPN de 80,6%. Foram também calculadas as características de desempenho clínico, avaliando a positividade em três estratos (negativo, positivo moderado e positivo elevado); a sensibilidade e a especificidade foram de 14% e 94% para os positivos de nível moderado e de 21% e 97% para os positivos de nível elevado. A respetiva DLRp foi de 2,1 e 8,7; a DLRn foi de 0,9 e 0,8. Para um cenário de rastreio (prevalência de 1%), o VPP foi de 2,0% para os positivos de nível moderado e de 8,0% para os positivos de nível elevado. Os respetivos VPN foram de 99,1% e 99,2% e a precisão foi de 92,7% e 96,2%. Num contexto de nódulo (taxa de malignidade de 25%), o VPP foi de 40,6% para os positivos de nível moderado e de 70,9% para os positivos de nível elevado. Os respetivos VPN foram de 76,4% e 78,7% e a precisão foi de 73,5% e 78,0%. Estes resultados foram entretanto confirmados em oito grupos de doentes separados, num total de 451 doentes com cancro do pulmão e 8831 doentes normais em contexto do mundo real. A sensibilidade e a especificidade do dispositivo também demonstraram ser independentes do estádio ou do grau do cancro do pulmão e mantiveram-se para o cancro do pulmão em estádio inicial, em estádio tardio, de pequenas células e de não-pequenas células.⁴

Numa auditoria de resultados clínicos de 1.613 doentes dos EUA com elevado risco de cancro do pulmão, cujos médicos pediram o EarlyCDT Lung, o desempenho (sensibilidade, especificidade e precisão global) foi consistente com os dados de validação. Na ronda de prevalência, > 50% dos cancros detetados por um teste positivo eram doenças em estadio inicial.¹⁶

Uma auditoria separada da mesma coorte de doentes identificou 269 doentes com nódulos pulmonares não calcificados identificados por um radiologista no prazo de seis meses após a realização do EarlyCDT Lung. Deste grupo, 52 doentes apresentavam cancro do pulmão, enquanto os nódulos identificados nos restantes 217 doentes eram benignos. Globalmente, um teste EarlyCDT Lung positivo foi associado a um risco 2,2 vezes superior de cancro do pulmão e, em doentes com nódulos entre 4 e 20 mm (os que têm maior probabilidade de cura), o risco relativo de cancro do pulmão foi 2,7 vezes superior. O efeito cumulativo nos modelos de risco baseados em nódulos de Gould, Brock e Swensen também foi demonstrado para nódulos de 4 a 20 mm.¹⁷

O kit de teste EarlyCDT Lung foi validado clinicamente contra o LDT EarlyCDT Lung em dois estudos de caso-controlo, o primeiro com um total de 236 casos de cancro (C) e 236 controlos normais (N), divididos em fases de treino (154C/154N) e validação (82C/82N), e um segundo estudo de maior dimensão com um total de 366 casos de cancro e 472 controlos normais, também divididos em fases de treino (163C/163N) e validação (203C/309N), para confirmar a semelhança entre o LDT e o kit e para definir os limiares de diagnóstico para o kit. O kit EarlyCDT Lung teve um desempenho equivalente ao do teste LDT EarlyCDT Lung, com uma concordância > 90%.

Com o teste EarlyCDT Lung, verifica-se uma mudança significativa para a deteção em estadio inicial. Aos dois anos, o ensaio clínico ECLS na Escócia demonstrou uma redução significativa da deteção em estadio tardio no braço de intervenção do EarlyCDT Lung em relação ao braço de controlo (padrão de cuidados de saúde)¹⁶. No braço de intervenção, 33 em 56 (58,9%) cancros do pulmão foram diagnosticados no estadio III/IV, em comparação com 52 em 71 (73,2%) no braço de controlo (redução de 37% no estadio tardio). O rácio de risco para a apresentação em estadio III/IV foi de 0,64 (IC 95%, 0,41-0,99).¹⁸

15. Rastreabilidade metrológica

O EarlyCDT é um ensaio funcional que fornece valores inteiramente específicos para o sistema de medição ELISA em causa. Para os autoanticorpos utilizados no EarlyCDT não estão disponíveis materiais de referência externos com potência atribuída. Por conseguinte, não é possível atribuir potências absolutas aos materiais de calibração do ensaio ou ao próprio resultado do ensaio. Isto

significa que não é possível preparar materiais experimentais de concentração conhecida para estudos de veracidade, recuperação ou enviesamento. Adicionalmente, não está disponível nenhum ensaio funcional de títulos de autoanticorpos alternativo para comparação direta com o ELISA EarlyCDT.

Em vez de padrões de referência externos, foi utilizado um sistema de calibração com amostras humanas que se sabe conterem anticorpos correspondentes a cada analito medido pelo dispositivo.

Cada kit de teste EarlyCDT Lung contém Controlos de Qualidade que são executados pelo utilizador juntamente com soros de doentes sempre que o teste é utilizado. Estes controlos (A e B) são amostras agrupadas de soros e de fluidos pleurais que foram formulados para conter níveis mensuráveis de cada analito medido pelo dispositivo e têm um intervalo de aceitação que é determinado durante o CQ do lote. Os níveis de analito dos controlos devem estar dentro deste intervalo em cada execução, caso contrário o resultado do teste é inválido. Se os controlos estiverem fora do intervalo de aceitação, isto significa que o desempenho do dispositivo não está de acordo com as especificações e deve ser repetido.

16. Abordagem matemática

As DO em bruto são corrigidas primeiro para ligação não específica por subtração do respetivo resultado VOL e, em seguida, calibradas para unidades relativas (UR) utilizando curvas padrão específicas de antigénio pré-estabelecidas. As curvas padrão foram formadas por representação gráfica das DO observadas *versus* uma série de diluições de fluidos calibradores e, em seguida, por adaptação de modelos logísticos de quatro parâmetros utilizando regressão não linear. A conversão das DO observadas em UR previstas utiliza as fórmulas inversas da respetiva curva padrão. É aplicada uma correção de potência em cada novo lote. Em cada lote, as curvas padrão permanecem fixas.

17. Intervalos de referência

No estado de doença, espera-se que os níveis de autoanticorpos sejam elevados para, pelo menos, um antigénio numa proporção dos doentes. A decisão quanto à positividade desta elevação não é tomada com base em intervalos de referência, mas sim em pontos de corte otimizados específicos do antigénio. Por conseguinte, não são apresentados intervalos de referência ou valores esperados em populações normais ou afetadas, de modo a evitar confusão quanto ao significado da positividade.

18. Características de desempenho do ensaio

Exatidão e veracidade (enviesamento)

Para os analitos sem materiais de referência certificados ou procedimentos de medição de referência disponíveis, não é possível demonstrar a exatidão ou a veracidade. Uma vez que não existem padrões externos ou materiais de referência adequados para o ensaio, estas características não são aplicáveis e não podem ser determinadas.

Precisão

A precisão foi determinada utilizando sete amostras de soro que se sabe conterem sinais positivos de autoanticorpos, que foram testadas seis vezes na mesma placa, sendo cada placa executada duas vezes por dia (kits separados) em seis dias diferentes. A repetibilidade ou a precisão intra-ensaio de cada medição de autoanticorpos baseou-se na variação entre replicados da mesma amostra na mesma placa (e, por conseguinte, no mesmo kit e dia). Os coeficientes de variação (CV) para a precisão intra-ensaio, baseados na variação entre todos os replicados no mesmo dia e agrupados em todas as placas ao longo dos seis dias, são apresentados na tabela 7.

A precisão intermédia ou inter-ensaio baseou-se na variação entre os kits e as placas executados durante vários dias com as mesmas amostras. O CV da precisão inter-ensaio, baseado na variação entre replicados em dias diferentes, é apresentado na tabela 8.

A precisão dos controlos A e B é determinada para cada lote e fornecida com cada kit.

Tabela 7: Precisão intra-ensaio

Autoanticorpo	50 nM		160 nM	
	DO média	% CV	DO média	% CV
p53	1,116	10,3	1,735	3,1
SOX2	2,443	3,1	2,782	2,4
CAGE	2,133	4,9	1,568	11,7
NY-ESO-1	3,046	1,4	3,039	1,3
GBU4-5	1,133	7,9	1,462	3,4
MAGE A4	1,418	4,0	1,723	2,1
HuD	1,352	12,9	2,073	2,4

Tabela 8: Precisão inter-ensaio

Autoanticorpo	50 nM		160 nM	
	DO média	% CV	DO média	% CV
p53	1,116	13,1	1,735	4,2
SOX2	2,443	3,8	2,782	3,1
CAGE	2,133	5,1	1,568	12,4
NY-ESO-1	3,046	3,3	3,039	3,6
GBU4-5	1,133	11,5	1,462	5,1
MAGE A4	1,418	5,6	1,723	3,3
HuD	1,352	12,9	2,073	4,5

Intervalo de medição e Limites de Quantificação

O intervalo de medição dos autoanticorpos do dispositivo foi determinado como correspondendo a aproximadamente 7,5% do máximo da curva do calibrador para os limites inferiores de quantificação. Os limites superiores de quantificação foram determinados como sendo aproximadamente 92,5% do máximo da curva do calibrador ou 3,0 DO, o que for menor, para todos os 7 autoanticorpos medidos pelo dispositivo. Também foi determinado que os limites de corte moderado e elevado estavam dentro dos limites de quantificação para todos os anticorpos que o dispositivo deteta. No entanto, a calibração é específica de cada lote (ref.ª: secção 16 Abordagem Matemática acima) e os limites exatos de quantificação e o intervalo de medição também são específicos de cada lote. Por conseguinte, são calculados para cada lote e fornecidos com cada kit..

Os resultados fora deste intervalo são registados como estando abaixo ou acima do limite de quantificação. Estes valores devem ainda ser avaliados quanto ao resultado do teste e são comunicados como “Não foi detetado nenhum nível significativo de autoanticorpos” ou “Elevado”, respetivamente.

Sensibilidade analítica Limites de deteção e Limites de branco

Uma vez que não estão disponíveis materiais de referência independentes de concentração de autoanticorpos conhecida para este ensaio, não é possível avaliar a sensibilidade analítica.

O Limite de Deteção (LdD) é definido como a concentração mais baixa de analito que pode ser detetada de forma consistente, mas não necessariamente quantificada, em amostras típicas e em condições laboratoriais clínicas de rotina.

O Limite de Branco (LdB) é definido como o resultado de medição mais elevado que é suscetível de ser observado com uma probabilidade declarada em amostras de branco.

O LdD e o LdB de cada autoanticorpo para cada concentração do antigénio correspondente utilizado no teste foram determinados e são apresentados na tabela 9. Todos os valores foram substancialmente inferiores aos respetivos limites de corte, também apresentados.

Tabela 9: Limites de deteção e Limites de branco					
Autoanticorpo	Concentração de antigénio (nM)	LdB (UR)	LdD (UR)	Moderado Limiar (UR)	Elevado Limiar (UR)
p53	50	0,88	1,51	3,58	4,652
	160	1,85	2,49	5,50	6,049
SOX2	50	0,87	1,51	6,62	6,785
	160	2,21	2,88	7,82	8,146
CAGE	50	0,65	1,32	4,46	4,570
	160	-0,54	0,13	3,73	4,181
NY-ESO-1	50	-1,25	-0,61	3,01	3,158
	160	-1,86	-1,26	2,40	3,252
GBU4-5	50	1,24	1,91	5,27	5,593
	160	-0,03	0,60	2,82	4,357
MAGE A4	160	1,22	2,05	4,94	5,101
HuD	160	4,42	4,96	8,43	9,703

Linearidade

As amostras que se sabe conterem níveis elevados de autoanticorpos específicos para um ou mais antígenos do painel EarlyCDT Lung foram diluídas em série em tampão de ensaio e analisadas utilizando o protocolo EarlyCDT Lung descrito acima. Assumindo que a diluição mais baixa das amostras é de 100%, a diluição prevista das amostras foi traçada em gráfico em relação à diluição conhecida. O declive e os coeficientes de correlação (R^2) das amostras de sinal representativas são apresentados na tabela 10. Estão todos dentro das especificações, com declives entre 0,9 e 1,1 e coeficientes de correlação, $R^2 > 0,90$.

Tabela 10: Linearidade do teste EarlyCDT Lung através de diluição							
Autoanticorpo	Placa	Antígeno a 50 nM			Antígeno a 160 nM		
		Gradiente de	interseção	R^2	Gradiente de	interseção	R^2
p53	Placa 1	-0,049	0,998	0,979	-0,033	1,000	0,991
p53	Placa 2	-0,036	1,018	0,994	0,030	1,015	0,987
SOX2	Placa 1	-0,040	1,001	0,987	-0,024	1,002	0,996
SOX2	Placa 2	-0,037	1,008	0,991	-0,022	1,004	0,997
CAGE	Placa 1	-0,061	1,000	0,969	0,024	0,962	0,997
CAGE	Placa 2	-0,059	0,996	0,969	0,048	0,940	0,992
NY-ESO-1	Placa 1	-0,066	0,995	0,962	-0,094	0,998	0,931
NY-ESO-1	Placa 2	-0,061	1,003	0,971	-0,100	0,998	0,923
GBU4-5	Placa 1	0,036	1,002	0,977	0,065	1,019	0,951
GBU4-5	Placa 2	0,004	1,006	0,999	-0,047	0,996	0,980
MAGE A4	Placa 1	-0,113	1,016	0,920	-0,115	1,008	0,911
MAGE A4	Placa 2	-0,106	1,023	0,935	-0,109	1,014	0,924
HuD	Placa 1	0,005	0,993	1,000	-0,022	0,995	0,994
HuD	Placa 2	-0,005	0,978	0,995	-0,015	0,996	0,997

Especificidade analítica, Interferências e Reações cruzadas

O efeito de potenciais substâncias interferentes foi avaliado em amostras de soro positivas para autoanticorpos medidos no kit de teste EarlyCDT Lung. Os seguintes interferentes testados (tabela 11) não afetaram o desempenho do ensaio, salvo indicação em contrário.

Tabela 11: Interferentes testados no kit de teste EarlyCDT Lung

Interferente	Concentração de teste do interferente*	Resultado
Triglicerídeos	3274 mg/dl	Sem efeito significativo p < 0,01
Proteína total	120 g/L	Efeito significativo***
Bilirrubina (conjugada)	20 mg/dl	Sem efeito significativo p < 0,01
Bilirrubina (não conjugada)	20 mg/dl	Sem efeito significativo p < 0,01
Hemoglobina	500 mg/dl	Sem efeito significativo p < 0,01
Salbutamol	0,4 µg/ml	Sem efeito significativo p < 0,01
Digoxina	6,09 ng/ml	Sem efeito significativo p < 0,01
Fator reumatoide	1:1**	Sem efeito significativo p < 0,01
Anticorpos humanos anti-ratinho	1:1**	Sem efeito significativo p < 0,01

*As concentrações de testes dos interferentes são as recomendadas pelo CLSI EP7-A219¹⁹.

** Foi adicionado um volume igual de soro positivo para FR ou HAMA ao soro positivo para autoanticorpos medidos no kit de teste EarlyCDT Lung.

*** O kit de teste EarlyCDT Lung não deve ser utilizado em doentes com doenças que resultem num nível elevado de proteínas séricas totais, por exemplo, mieloma, amiloidose, gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI).

19. Resumo do Método

- Equilibre o kit e todos os reagentes a uma temperatura entre +18 e +22 °C (isto irá demorar, pelo menos, 2 horas).
- Prepare os reagentes.
- Coloque 100 µL de cada controlo relevante e de amostra de doente diluída nos poços da(s) placa(s) de microtitulação, conforme descrito.
- Cubra e incube a uma temperatura entre +18 e +22°C durante 90 minutos, com agitação.
- Lave quatro vezes.
- Adicione 100 µL de anticorpo secundário a todos os poços da placa de microtitulação.
- Cubra e incube a uma temperatura entre +18 e +22°C durante 60 minutos, com agitação.
- Lave quatro vezes.
- Adicione 100 µL de substrato a todos os poços da placa de microtitulação.
- Incube a uma temperatura entre +18 e +22°C, no escuro, durante exatamente 15 minutos (sem agitação).
- Adicione 100 µL de solução de paragem a todos os poços da placa de microtitulação.
- Determine a densidade ótica de cada poço num comprimento de onda de 650 nm nos 30 minutos seguintes.
- Calcule os valores de autoanticorpos utilizando o software fornecido no dispositivo USB.

20. Glossário de termos para o EarlyCDT Lung

O glossário de termos utilizados ao longo das Instruções de Utilização, com as respetivas definições, é apresentado na tabela 12.

Tabela 12: Glossário de termos	
Termo	Definição
Precisão	O grau em que o resultado de uma medição, cálculo ou especificação está em conformidade com o valor ou resultado correto.
Antigénio	Proteína ou outra molécula imunogénica.
Autoanticorpo (AAc)	Anticorpo produzido como resposta ao antigénio de um hospedeiro.
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica.
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática.
DO	Densidade ótica medida espectrofotometricamente.
Maço-ano	Vinte cigarros (ou seja, um maço) fumados todos os dias durante um ano.
PBS	Solução salina tamponada com fosfato.
Valor preditivo positivo	A probabilidade de os doentes com um resultado positivo no teste terem efetivamente a doença.
Prevalência	A proporção de uma população que tem uma doença.
Sensibilidade	A proporção de pessoas que se sabe terem um estado de doença e que apresentam um resultado positivo no teste.
Especificidade	A proporção de doentes saudáveis que se sabe não terem um estado de doença e que apresentam um resultado negativo para o mesmo.

21. Glossário de símbolos

	<p>Fabricante Indica o fabricante do dispositivo médico.</p>		<p>Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> Indica um dispositivo médico que se destina a ser utilizado como dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>.</p>
	<p>Consultar as instruções de utilização Indica a necessidade de o utilizador consultar as instruções de utilização.</p>		<p>Riscos biológicos Indica que existem potenciais riscos biológicos associados ao dispositivo médico.</p>
	<p>Data de validade Indica a data após a qual o dispositivo médico não deve ser utilizado.</p>		<p>Código do lote Indica o código do lote do fabricante, para que o lote ou remessa possam ser identificados.</p>
	<p>Número de referência Indica o número de referência do fabricante para que o dispositivo médico possa ser identificado.</p>		<p>Não reutilizar Indica um dispositivo médico que se destina a uma única utilização, ou a ser utilizado num único doente durante um único procedimento.</p>
	<p>Limites de temperatura Indica os limites de temperatura aos quais o dispositivo médico pode ser exposto com segurança.</p>		<p>Contém quantidade suficiente para <n> testes Indica o número total de testes IVD que podem ser realizados com os reagentes do kit IVD.</p>
	<p>Referência do Componente Indica a identidade de um componente do teste do kit</p>		<p>Representante autorizado na comunidade europeia Indica o Representante autorizado na comunidade europeia</p>
	<p>Importador Indica qualquer pessoa singular ou coletiva estabelecida na União Europeia que coloca um dispositivo de um país terceiro no mercado da União Europeia</p>		<p>Manter afastado da luz direta do sol Indica um componente que necessita de proteção contra fontes de luz</p>
	<p>Símbolo de perigo de irritação Pode provocar uma reação alérgica na pele</p>		

22. Referências

1. Stewart BW, Wild CP (Eds.), World Cancer Report 2014, WHO Press, Lyon.
2. The National Lung Screening Trial Research Team, *N Engl J Med* 2011; 365: 395-409.
3. Boyle P et al., *Ann Oncol* 2011; 22: 383-9.
4. Chapman CJ et al., *Tumor Biol* 2012; 33: 1319-26.
5. Chapman CJ et al., *Thorax* 2007; 63, 228-233.
6. Desmetz C et al., *J Cell Mol Med* 2011; 15, 2013-2024.
7. Tan EM. *J Clin Invest* 2001; 108, 1411-1415.
8. Kazarian M & Laird-Offringa IA. *Mol Cancer* 2011; 10, 33.
9. Zhong L et al., *J Thor Oncol* 2006; 1, 513-519.
10. Trivers GE et al., *Clin Cancer Res* 1996; 2, 1767 – 1775.
11. Chapman CJ et al., *Clin Cancer Res* 2010; 17, 1474-80.
12. Lam S et al., *Cancer Prev Res* 2011; 4: 1126-34.
13. Jacobs IJ et al., *Lancet*. 2016 Mar 5; 387(10022): 945-956
14. Jett J et al., *J Thor Oncol* 2017 12:11 Supp 2 S2170 P2.13-013
15. Pepe, M.S. (2003) *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*. OUP, Oxford.
16. Jett JR et al., *Lung Cancer* 2013; 83: 51-5.
17. Massion PP et al., *J Thor Oncol* 2017 Mar;12(3):578-584
18. Sullivan FM et al., *Eur. Respir. J.* 2021 Jan 14;57(1):2000670
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline—second edition*. CLSI document EP7-A2 (ISBN 1-56238-584-4).

23. Garantia

Este produto tem a garantia de funcionar conforme descrito na sua rotulagem e na literatura quando utilizado de acordo com todas as instruções. A Freenome Ltd. REJEITA QUALQUER GARANTIA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO A UM FIM ESPECÍFICO e, em caso algum, a Freenome Ltd. será responsável por danos consequentes. A substituição do produto ou o reembolso do preço de compra é a solução exclusiva para o comprador.

24. Assistência Técnica e Serviço de apoio ao cliente

Para obter assistência técnica ou realizar uma encomenda, contacte a Freenome através do número +44 (0)115 784 0501, envie um e-mail para earlycdt@freenome.com ou consulte o nosso sítio da Internet em www.freenome.com

25. Resumo da segurança e do desempenho

O resumo da segurança e do desempenho do dispositivo deverá estar disponível na EUDAMED (ligação: [Portal Web da EUDAMED](#)) quando o sistema estiver totalmente funcional.

26. Notificação de incidentes graves

Caso tenha ocorrido um incidente grave relacionado com este dispositivo, este deverá ser notificado ao Serviço de Apoio ao Cliente da Freenome através do número +44 (0)115 784 0501 ou de e-mail EarlyCDT@Freenome.com. Nos Estados-Membros da União Europeia, os incidentes graves também devem ser notificados à autoridade competente (o departamento governamental responsável pelos dispositivos médicos) do seu país. Consulte o site do seu governo para obter detalhes sobre como contactar a sua autoridade competente.

Entende-se por “incidente grave” qualquer incidente que, direta ou indiretamente, tenha causado, possa ter causado ou possa causar:

- a morte de um doente, utilizador ou outra pessoa,
- à deterioração grave, temporária ou permanente, do estado de saúde de um doente, utilizador ou de outra pessoa.

27. Historial de revisões

ID da Versão	Data	Resumo das alterações
V10	Set 2021	Atualização para conformidade com os requisitos do Regulamento (UE) 2017/746 IVD
V11	Dez 2021	Atualização da secção Resumo dos resultados do estudo clínico para incluir características adicionais de desempenho clínico.
V12	Jul 2022	Adição da localização do resumo da segurança e do desempenho. Atualização das velocidades do agitador. Informações adicionais sobre a composição do tampão na Tabela 1. Adicionada a recomendação de utilização de pipeta eletrónica multicanal para pipetagem.
V13	Set 2023	Substituição da Oncimmune Ltd pela Freenome Ltd e atualização do representante autorizado

freenome



Freenome Limited
MediCity – D6 Building
1 Thane Road, Nottingham,
NG90 6BH, Reino Unido

+44 (0)115 784 0501
earlycdt@freenome.com
www.earlycdt.com



qtec EuRep GmbH
Curtiusstraße 27,
23568 Lübeck
Alemanha

+49 4 51 80 85 03 71
PRRC@qtec-group.com
www.qtec-group.com

