

## Instruções de uso

# RealStar<sup>®</sup> EBV PCR Kit 2.0

03/2019 PT



# RealStar<sup>®</sup>

## EBV PCR Kit 2.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)  
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)  
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)  
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)  
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)  
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)  
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)  
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



132013



96



03 2019



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Conteúdo

<b>1.</b>	<b>Utilização Prevista</b> .....	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes do Kit</b> .....	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Armazenamento</b> .....	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos</b> .....	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informação de Base</b> .....	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrição do Produto</b> .....	<b>9</b>
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
<b>7.</b>	<b>Avisos e Precauções</b> .....	<b>11</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimento</b> .....	<b>13</b>
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	14
8.3	Preparação da Reação .....	16
<b>9.</b>	<b>Programação dos instrumentos de PCR em tempo real</b> .....	<b>17</b>
9.1	Definições .....	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes) .....	17
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
<b>10.</b>	<b>Análise de Dados</b> .....	<b>18</b>
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	18
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo) .....	18
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	19
10.1.3	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo).....	19
10.1.4	Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo).....	19
10.2	Interpretação dos Resultados .....	20
10.2.1	Análise Qualitativa .....	20

10.2.2	Análise Quantitativa .....	20
<b>11.</b>	<b>Avaliação do Desempenho.....</b>	<b>22</b>
11.1	Sensibilidade Analítica .....	22
11.2	Especificidade Analítica .....	23
11.3	Intervalo Linear .....	24
11.4	Precisão .....	25
<b>12.</b>	<b>Limitações .....</b>	<b>26</b>
<b>13.</b>	<b>Controlo de Qualidade.....</b>	<b>27</b>
<b>14.</b>	<b>Apoio Técnico .....</b>	<b>27</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>27</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....</b>	<b>28</b>
<b>17.</b>	<b>Explicação de Símbolos.....</b>	<b>29</b>

## 1. Utilização Prevista

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro* baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção e quantificação de ADN específico ao vírus Epstein-Barr (EBV).

## 2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	QS1-4*	4	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

\* O RealStar® BKV PCR Kit 1.0 contém Padrões de Quantificação em quatro concentrações diferentes (veja o capítulo 6. Descrição do Produto)

Internal Control (IC) = Controle interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

## 3. Armazenamento

- O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do

ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

#### 4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (ver capítulo 8.1 Preparação de amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

#### NOTA



*Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.*

#### NOTA



*É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).*

## 5. Informação de Base

O vírus Epstein-Barr (EBV, HHV-4) é um vírus humano omnipresente da família dos *Herpesviridae*. Faz parte da subfamília dos *Gammaherpesvirinae* pertence ao género *Lymphocryptovirus*. [1, 2] O genoma do virião maduro é composto por um ADN linear, de cadeia dupla, com cerca de 170 kbp, mas é conhecido por estar presente na forma circular e episomal quando as células estão infetadas de forma latente. [3, 4]

A transmissão ocorre primordialmente no compartimento tonsilar, mas é igualmente possível por transfusão sanguínea, por transplantação de órgão ou tecido e conduz a uma infeção permanente do anfitrião. [4, 5] Embora as infeções infantis continuem a ser maioritariamente assintomáticas, as infeções durante a adolescência podem conduzir a doenças, tais como mononucleose infecciosa (MI). Estes doentes revelam frequentemente sintomas como edema das pálpebras ou inchaço facial, podendo desenvolver hepatite. Em casos raros, a infeção aguda pode também evoluir para uma infeção EBV cronicamente ativa com elevada morbidade e mortalidade. [4]

Devido ao seu potencial oncogénico, o EBV está associado a vários tipos de cancro, incluindo linfoma de Hodgkin e não Hodgkin e linfoma de Burkitt. As infeções com EBV constituem um risco elevado para os recetores de transplantes EBV negativos, uma vez que podem desenvolver doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD). [5]

Os testes serológicos continuam a constituir um método amplamente utilizado para a deteção do EBV em doentes imunocompetentes, embora este método exiba um elevado nível de variabilidade. [6] Normalmente não é adequado para doentes imunocomprometidos, tais como os recetores de transplantes, uma vez que é necessária uma monitorização permanente da carga viral. Em vez disso, aplica-se PCR em tempo real como sendo um métodos preciso, extremamente sensível e específico. [5]

[1] Young LS (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22: 5108-5121



- [2] Davison AJ (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143: 52-69.
- [3] Niedobitek G, Meru N, Delecluse H-J (2001). Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J ExpPathol*. 82: 149-170.
- [4] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH (2011). Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. *ClinMicrobiolRev*. 24: 193-209.
- [5] Gequelin LCF, Riediger IN, Nakatani SM, Biondo AW, Bonfirm CM (2011). Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. *RevBrasHematolHemoter*. 33: 383-388.
- [6] Hess RD (2004). Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J ClinMicrobiol*. 42: 3381-3387.

## 6. Descrição do Produto

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro* baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção e quantificação de ADN específico ao vírus Epstein-Barr (EBV).

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a deteção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ADN de EBV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ADN específico de EBV e do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste consiste em dois processos num único tubo de ensaio:

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno (Internal Control)

- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 consiste em:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4
- Water (PCR grade)

O Principal A e o Principal B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, sais de magnésio, primers e sondas) para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ADN específico de EBV e um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas de ADN específico ao EBV. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados em conformidade com o 1.º Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde para o Vírus Epstein-Barr para Técnicas de Ampliação dos Ácidos Nucleicos (NAT) (código NIBSC: 09/260). Os Padrões de Quantificação podem ser usados individualmente como controlos positivos, ou em conjunto, para gerar uma **curva padrão**, que pode ser usada para determinar a concentração de ADN específico ao EBV numa amostra.

Os Padrões de Quantificação (QS) contêm as seguintes concentrações:

Padrão de Quantificação (QS)	Concentração [IU/μl/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

## 6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para que ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

## 7. Avisos e Precauções

*Leia as Instruções de Utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.*

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
  - Integridade
  - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
  - Etiquetagem correta
  - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e *procedimentos de diagnósticos in vitro*.
- devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivos, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.

- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

## 8. Procedimento

### 8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® EBV PCR Kit 2.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É recomendado assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- Sistema molecular VERSANT® kPCR SP (Siemens Healthcare)

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® EBV PCR Kit 2.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

**ATENÇÃO**

*Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.*

**ATENÇÃO**

*A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.*

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o 14. Apoio Técnico).

## 8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controle de inibição de PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o CI (IC) **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de espécime/lise. O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**ATENÇÃO**

*Se o IC (Internal Control - Controlo interno) tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.*

**ATENÇÃO**

*Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC diretamente ao espécime.*

**8.3 Preparação da Reação**

- ▶ Pipete 20 µl do Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (padrão de quantificação, controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
<b>Volume Total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo (QS) e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Para fins de quantificação, dos Padrões de Quantificação (QS1 a QS4) deve ser utilizado.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).



## 9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

### 9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

### 9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ADN específico ao EBV	EBV	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (IC)	IC	JOE™	(Nenhum)

### 9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	10:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	01:00

## 10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® EBV PCR Kit 2.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

### 10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

#### 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

Um teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo (QS)	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

\* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

### 10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

Um ensaio de diagnóstico **qualitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

No caso de um ensaio de diagnóstico **inválido**, repita o teste usando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

### 10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)

Um **quantitativo** de diagnóstico é **válido**, se existirem todas as condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo válido** [consulte o capítulo 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)]. Os resultados de **quantificação** são **válidos** se a **curva padrão** gerada atinge o valor do parâmetro seguinte:

Parâmetro de Controlo	Valor Válido
R cuadrado ( $R^2$ )	$\geq 0,98$

#### NOTA



*Nem todos os instrumentos PCR em tempo real apresentam o valor quadrado de R ( $R^2$ ). Para informações pormenorizadas, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.*

### 10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

Um teste de diagnóstico **quantitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um teste de diagnóstico **válido quantitativo** não existir.

No caso de um teste de diagnóstico **inválido**, repita o teste usando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

## 10.2 Interpretação dos Resultados

### 10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
<b>+</b>	<b>+*</b>	ADN específico ao EBV detetado.
<b>-</b>	<b>+</b>	Nenhum ADN específico ao EBV detetado. A mostra não contém montantes detetáveis de ADN específico ao EBV.
<b>-</b>	<b>-</b>	PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

\* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ADN de EBV na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Controlo Interno (Internal Control).

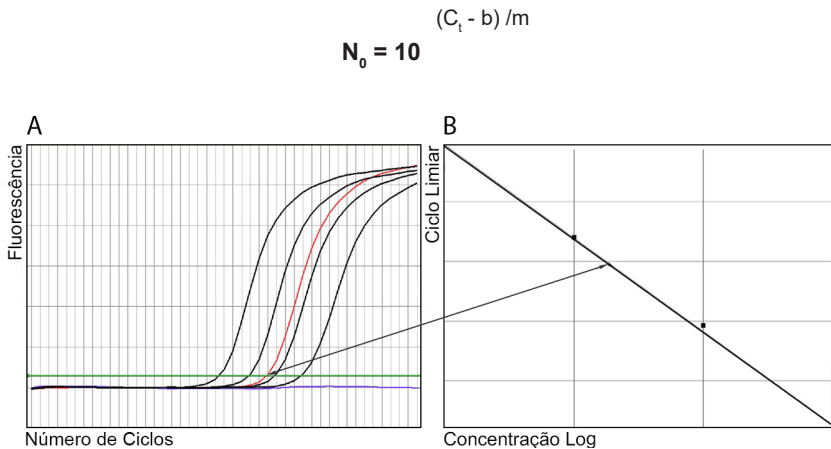
### 10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para poder gerar uma **curva padrão** para análise quantitativa, estes têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (ver capítulo 6. Descrição do Produto). Usando **padrões** de concentrações conhecidas, é possível gerar uma curva padrão para análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \text{registro} (N_0) + b$$

$C_t$  = Ciclo Limiar  
 $m$  = Inclinação  
 $N_0$  = Concentração inicial  
 $b$  = Intersecção

Obtidas a partir da curva padrão, é possível quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.



**Figura 1:** Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelha) e uma amostra negativa (azul) apresentadas no Gráfico de Amplificação [A] e na análise de Curva Padrão [B]

**NOTA**



*A concentração da "Amostra" é apresentada em IU/μl/μl e refere-se à concentração no eluato.*

Para determinar a carga **viral da amostra original**, a seguinte fórmula deve ser aplicada:

$$\text{Carga Viral (Amostra) [IU/\mu\text{l/ml}] = } \frac{\text{Volume (Eluém) } [\mu\text{l}] \cdot \text{Carga Viral (Eluate) [IU/\mu\text{l}/\mu\text{l}]}{\text{Entrada de amostra [ml]}}$$

## 11. Avaliação do Desempenho

A avaliação de desempenho do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando ADN extraído do 1.º Padrão Internacional da OMS para o Vírus Epstein-Barr para Técnicas de Ampliação dos Ácidos Nucleicos (código NIBSC: 09/260).

### 11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (IU/μl/μl do eluato) de moléculas de ADN específico de EBV que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluição de ADN de EBV quantificado.

**Tabela 1:** Resultados PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao EBV

Concentração inserida [IU/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,6000	24	24	100
10,0000	24	24	100
3,1600	24	24	100
1,0000	24	24	100
0,3160	24	10	83,3
0,1000	24	1	4,2
0,0100	24	0	0
0,0010	24	0	0

Concentração inserida [IU/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
0,0001	24	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção do ADN específico ao EBV, a sensibilidade analítica é de 1,59 IU/μl/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 1,04 - 3,37 IU/μl/μl]

## 11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de agentes patogénicos relacionados com EBV, agentes patogénicos provavelmente presentes na mesma matriz de amostras ou que provocam sintomas semelhantes aos do EBV.

O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Adenovirus
- Vírus BK
- Citomegalovirus
- Vírus da hepatite A
- Vírus da hepatite B
- Vírus da hepatite C
- Vírus de herpes simplex 1
- Vírus de herpes simplex 2
- Vírus de herpes humano 6A
- Vírus de herpes humano 6B
- Vírus de imunodeficiência humana 1
- Vírus JC
- Parvovírus B19
- Vírus de varicela-zoster

### 11.3 Intervalo Linear

O intervalo linear de RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi avaliado através da análise de uma série de diluição de ADN específico ao EBV utilizando concentrações entre 1,00E+08 IU/μl/μl e 5,00E+00 IU/μl/μl. Pelo menos quatro réplicas por diluição foram analisadas.

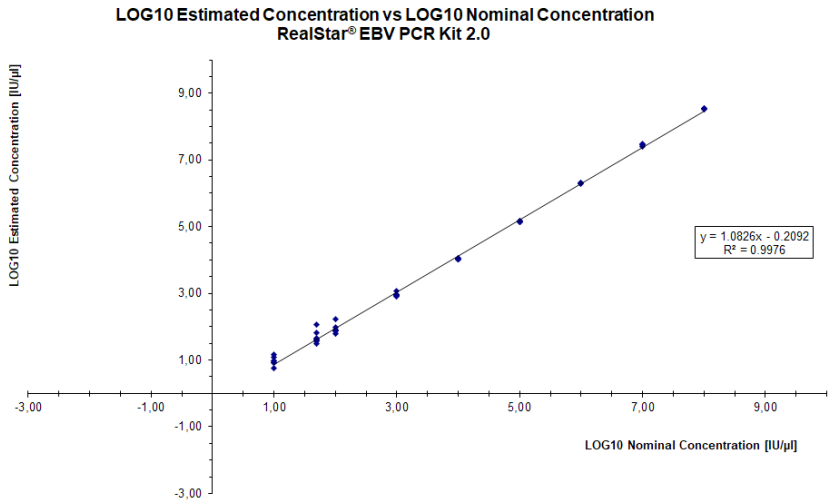


Figura 2: Regressão linear da série de diluição analisada de ADN específico ao EBV.

O intervalo linear de RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi determinado como estando entre 1,00E+08 IU/μl/μl e 1,00E+01 IU/μl/μl.



## 11.4 Precisão

A precisão do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do desvio padrão e do coeficiente de variação. Os dados baseiam-se numa análise de quantificação de concentrações definidas de ADN específico ao EBV (log<sub>10</sub> transformado) e no valor-limite do ciclo (C<sub>t</sub>) em termos de Internal Control (controlo interno). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade inter-ensaio e variabilidade interlote.

**Tabela 2:** Dados de precisão para a deteção de ADN específico ao EBV

EBV	Conc. média log <sub>10</sub> [IU/μl]	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	1,88	0,04	2,30
Variabilidade Inter-Ensaio	1,80	0,09	5,21
Variabilidade Entre Lotes	1,82	0,07	3,92
Variabilidade Total	1,78	0,08	4,44

**Tabela 3:** Dados de precisão para a deteção de Internal Control (controlo interno)

Internal Control	Ciclo limiar médio (C <sub>t</sub> )	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	27,12	0,12	0,44
Variabilidade Inter-Ensaio	27,04	0,13	0,47
Variabilidade Entre Lotes	26,89	0,09	0,33
Variabilidade Total	26,97	0,15	0,55

## 12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as Instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR de (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou sub falsos negativos em sub quantificação.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma dos EBV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em sub quantificação e/ou na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® EBV PCR Kit 2.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

### 13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® EBV PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

### 14. Apoio Técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**Telefone:** +49-(0)40-5480676-0

### 15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

## 16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

















O RealStar® EBV PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2019 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

## 17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>In vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para “n” testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

**Notas:**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

