

Instruções de uso

RealStar[®]

Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

11/2018 PT

RealStar®

Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

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)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



441013



96



11 2018



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	7
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	12
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	13
7.	Avisos e Precauções	13
8.	Procedimento	15
8.1	Preparação de Amostras.....	15
8.2	Preparação da Master Mix.....	17
8.3	Preparação da Reação	19
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	20
9.1	Definições	20
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	20
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	21
10.	Análise de Dados	21
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	21
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido	21
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	22
10.2	Interpretação dos Resultados	22
10.2.1	Análise Qualitativa	23
11.	Avaliação do Desempenho.....	23

11.1	Sensibilidade Analítica	23
11.2	Especificidade Analítica	25
11.3	Precisão	27
11.4	Estudo clínico simulado	29
12.	Limitações	31
13.	Controlo de Qualidade.....	31
14.	Apoio Técnico	32
15.	Bibliografia	32
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	32
17.	Explicação de Símbolos	34

1. Utilização Prevista

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ARN específico do vírus Ébola e do vírus de Marburg om Plasma EDTA humano. Destina-se a ser utilizado como um auxiliar de diagnóstico em pessoas com sinais e sintomas de infeção associados a fatores de risco clínicos e epidemiológicos [1]. O teste destina-se a ser utilizado por pessoal qualificado em laboratórios devidamente equipados que cumprem as diretrizes relativas com a biossegurança em laboratório [2].

- [1] Case definition recommendations for Ebola or Marburg Virus Diseases. World Health Organization, 09 August 2014. (<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ebola-case-definition-contact-en.pdf?ua=1>).
- [2] Laboratory diagnosis of Ebola virus disease. World Health Organization, 19 September 2014; WHO reference number: WHO/EVD/GUIDANCE/LAB/14.1. (<http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/laboratory-guidance/en/>).

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	Positive Control Target Ebola	1	250
Laranja	Positive Control Target Marburg	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controle interno

Positive Control (PC) = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, 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 (consulte o capítulo 8.2 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

i

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 *Ebola* e *Marburgvirus* são géneros pertencentes à família *Filoviridae*. O género *Marburgvirus* contém uma única espécie designada *Marburg marburgvirus* (MARV). O género *Ebolavirus* contém cinco espécies: *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Sudan ebolavirus* (SEBOV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV) e *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) [1].

Todas as espécies conhecidas de *Ebola* e *Marburgvirus* são endémicas em África, exceto o RESTV, o qual é endémico no Sudeste Asiático. Os hospedeiros naturais dos filovírus são os morcegos da fruta [2] [3]. Após a transmissão para humanos, os filovírus podem causar uma febre hemorrágica grave com uma taxa de mortalidade relativamente elevada de 20-90% (dependendo da espécie e da estirpe num único surto) [4]. O modo de transmissão é frequentemente difícil de determinar. A caça, abate e consumo de animais selvagens infetados são formas prováveis da introdução do vírus na população humana. O contacto direto com morcegos também foi demonstrado como uma forma possível de infeção [5]. Muitas espécies diferentes de mamíferos são suscetíveis a infeções por filovírus. Particularmente os chimpanzés e gorilas, têm sido fortemente afetados pela epidemia do *Ebolavirus*, o que teve por resultado uma redução significativa das populações de grandes símios [6].

Os sintomas são bastante inespecíficos no início da doença, incluindo, dores em diferentes partes do corpo, febre e mal-estar geral [7]. No início dos surtos, a doença era, desta forma, frequentemente confundida com malária, febre tifoide ou outras doenças febris comuns na África Subariana.

O título de vírus infecciosos e o título de ARN durante uma doença aguda são normalmente elevados e o nível de viremia é relacionado negativamente com as consequências da doença [8]. O sangramento e outras hemorragias são também indicadores das consequências fatais da febre de Marburg e do Ébola [7].

Os diagnósticos laboratoriais são efetuados preferencialmente com recurso à RT-PCR do plasma, soro ou inclusive amostra de sangue completas. Os testes serológicos são úteis como ferramentas de diagnóstico de apoio, mas não são úteis para um diagnóstico primário da doença. De facto, foi demonstrado que muitos doentes (especialmente aqueles com consequências fatais) não desenvolvem quaisquer títulos de anticorpos detetáveis durante o curso da doença [9].

Foram publicados vários protocolos de RT-PCR em tempo real para a deteção de filovírus, mas nenhum deles inclui um controlo de amplificação interna ou é capaz de detetar e categorizar o *Ebola* e *Marburgvirus* numa única reação RT-PCR. O protocolo publicado por Panning e respetivos colegas em 2007 visa o gene *L* e demonstrou ser sensível a um ensaio específico [10]. Desde então, foi utilizado por vários laboratórios de referência a nível mundial para diagnósticos de filovírus. No entanto, a última informação sobre a sequência disponível e a ocorrência da nova espécie de Ebola (BEBOV) demonstrou a necessidade de verificações constantes e de atualizar os métodos existentes. O ensaio sobre o gene *L* em 2007 possui certas fraquezas e, desta forma, foi desenvolvido um novo ensaio baseado no gene *L* do filovírus pela Altona Diagnostics GmbH.

O gene do *filovirus L*, que codifica a polimerase viral, contém elementos de sequências altamente conservadas. Mutações em regiões codificadoras para locais enzimaticamente ativos irão, normalmente, ter por resultado a perda de funções. Estas mutações irão desaparecer das quase espécies do vírus e não terão um impacto negativo na especificidade do ensaio baseado na RT-PCR. Por conseguinte, decidimos utilizar o gene *L* como uma sequência-alvo para o RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0. O conceito de escolher o gene *L* dos vírus ARN como um alvo para o diagnóstico das RT-PCR foi aplicado com sucesso no passado para o *Lassa virus*, *filovirus* e outros vírus ARN [10–12].

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é recomendado como um teste de

primeira linha de diagnóstico. Este foi concebido para detetar todas as espécies de filovírus relevantes. Encontra-se também disponível um ensaio de segunda linha da Altona Diagnostics GmbH. O RealStar® RT-PCR Kit 1.0 do tipo filovírus visa outras sequências, dentro do genoma vírico e, desta forma, oferece a possibilidade de gerar um resultado de diagnóstico de confirmação. Além disso, o RealStar® RT-PCR Kit 1.0 do tipo filovírus permite a diferenciação entre todos os filovírus relevantes até ao nível da espécie.

A suspeita e confirmação de infeções por filovírus tem um grande impacto na saúde pública e gestão de casos. Todos os casos foram comunicados imediatamente às respetivas autoridades responsáveis pela saúde pública e biossegurança (na Alemanha: Robert Koch Institut, Berlim; e o "Landesgesundheitsämter" local). O procedimento de diagnóstico (por ex., o diagnóstico diferencial recomendado, a possível utilização da amostra A e B) deve ser discutido com instituições de referência especializadas.

- [1] Carroll SA, Towner JS, Sealy TK, McMullan LK, Khristova ML, Burt FJ, et al. Molecular Evolution of Viruses of the Family Filoviridae Based on 97 Whole-Genome Sequences. *J Virol* 2013;87:2608–16.
- [2] Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SAR, Comer JA, Kemp A, et al. Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000536.
- [3] Leroy EM, Epelboin A, Mondonge V, Pourrut X, Gonzalez J-P, Muyembe-Tamfum J-J, et al. Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2009;9:723–8.
- [4] Kortepeter MG, Bausch DG, Bray M. Basic Clinical and Laboratory Features of Filoviral Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 2011;204:S810–S816.
- [5] Van Paassen J, Bauer MP, Arbous MS, Visser LG, Schmidt-Chanasit J, Schilling S, et al. Acute liver failure, multiorgan failure, cerebral oedema, and activation of proangiogenic and antiangiogenic factors in a case of Marburg haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2012;12:635–42.

- [6] Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment J-M, et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* 2004;303:387–90.
- [7] Roddy P, Howard N, Van Kerkhove MD, Lutwama J, Wamala J, Yoti Z, et al. Clinical Manifestations and Case Management of Ebola Haemorrhagic Fever Caused by a Newly Identified Virus Strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008. *PLoS ONE* 2012;7:e52986.
- [8] Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, et al. Rapid Diagnosis of Ebola Hemorrhagic Fever by Reverse Transcription-PCR in an Outbreak Setting and Assessment of Patient Viral Load as a Predictor of Outcome. *J Virol* 2004;78:4330–41.
- [9] Gupta M, MacNeil A, Reed ZD, Rollin PE, Spiropoulou CF. Serology and cytokine profiles in patients infected with the newly discovered Bundibugyo ebolavirus. *Virology* 2012;423:119–24.
- [10] Panning M, Laue T, Ölschlager S, Eickmann M, Becker S, Raith S, et al. Diagnostic Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Kit for Filoviruses Based on the Strain Collections of all European Biosafety Level 4 Laboratories. *J Infect Dis* 2007;196:S199–S204.
- [11] Blasdel KR, Adams MM, Davis SS, Walsh SJ, Aziz-Boaron O, Klement E, et al. A reverse-transcription PCR method for detecting all known ephemeroviruses in clinical samples. *J Virol Methods* 2013;191:128–35.
- [12] Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, et al. RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:1253–64.

NOTA



Devido à formação molecular relativamente rápida e aos vírus ARN, existe um risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de uma acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ARN específico do vírus Ébola e do vírus de Marburg om Plasma EDTA humano.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

O ensaio foi concebido para detetar todas as espécies de filovírus, que são agentes patogénicos humanos relevantes e o vírus Reston.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcríptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para EBOV ARN estão marcadas com o fluoróforo FAM™, ao passo que as sondas específicas para MARV ARN estão marcadas com o fluoróforo Cy®5. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do EBOV e ARN específico do MARV, assim como do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

- Transcríptase reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Dois Controlos Positivos:
 - Controlo Positivo EBOV
 - Controlo Positivo MARV
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcriptase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do EBOV, ARN específico do MARV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização 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)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

NOTA



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

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)
 - Rotulagem 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 em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança. Consulte a diretriz da OMS “Laboratory diagnosis of Ebola virus disease” (Diagnóstico em laboratório da doença por vírus Ébola) (Organização Mundial de Saúde, 19 de setembro de 2014; número de referência da OMS:WHO/EVD/GUIDANCE/LAB/14.1; <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/laboratory-guidance/en/>).
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (ADNase/ARNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- 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 amplificões.
- 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. Consulte também “Fact Sheet: Safe Handling, Treatment, Transport and Disposal of Ebola-Contaminated Waste” (Ficha informativa: operações seguras de manuseamento, tratamento, transporte e eliminação de resíduos contaminados por Ébola) (Occupational Safety and Health Administration (OSHA - Administração de Segurança e Saúde Ocupacional), OSHA-DEM FS-3766, 03.2016; <https://www.osha.gov/pls/publications/publication.athruz?pType=Industry&pID=527>).

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O tipo de espécime seguinte está validado para uso com o RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0:

- Plasma EDTA humano

A título de orientação com respeito ao processamento de amostras, consulte

“Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks” (Diretrizes para a colheita de espécimes clínicos durante investigação de surtos no terreno) (Organização Mundial de Saúde, 2000; Número de referência da OMS: WHO/CDS/CSR/EDC/2000.4; [http:// www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_2000_4/en/](http://www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_2000_4/en/)).

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0.

TA qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário 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® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System 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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 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 capítulo 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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controlo Interno	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno 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 Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume da Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno

ATENÇÃO

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

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da 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 (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos um controlo negativo por processamento.
- ▶ 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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 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
Ramp Rate	Predefinição
Referência passiva	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do EBOV	EBOV	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do MARV	MARV	Cy®5	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	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:sec]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	00:45
			-	72	00:15

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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 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

Um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é **válido**, se as seguintes condições de controlo estiverem presentes:

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Controlo Positivo EBOV	+	-	+/-*
Controlo Positivo MARV	-	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

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

No caso de um processamento de teste de diagnóstico **inválido** repita o teste utilizando 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™	Cy®5	JOE™	
+	-	+*	Foi detetado o ARN específico do EBOV.
-	+	+*	MARV specific ARN detected.
-	-	+	Não foi detetado o ARN específico do EBOV nem do MARV. A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico do EBOV ou MARV.
-	-	-	RT-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™ ou no canal de deteção Cy®5. Carga(s) elevada(s) do ARN do EBOV e/ou MARV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

11. Avaliação do Desempenho

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias por µl de eluato) de moléculas de ARN específico do *Ébola* ou *vírus de Marburg* que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de transcrições *in vitro* (TIV) específicas de MARV Popp, SEBOV Gulu e ZEBOV Gabon 2003 em concentrações conhecidas.

Os dados gerados pelo cálculo de LDD de 95% estão resumidos na tabela 1, 2 e 3 abaixo para o MARV Popp, ZEBOV Gabon 2003 e SEBOV Gulu, respetivamente.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico de MARV

Concentração inserida [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31.622	12	12	100
10.000	12	12	100
3.162	12	12	100
1.000	12	12	100
0.316	12	8	67
0.100	12	2	17
0.032	12	0	0
0.010	12	1	8

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico de ZEBOV

Concentração inserida [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31.622	12	12	100
10.000	12	12	100
3.162	12	12	100
1.000	12	11	92
0.316	12	7	58
0.100	12	4	33
0.032	12	1	8
0.010	12	0	0

Tabela 3: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico de SEBOV

Concentração inserida [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31.622	12	12	100
10.000	12	12	100
3.162	12	7	58
1.000	12	1	8
0.316	12	0	0
0.100	12	0	0
0.032	12	0	0
0.010	12	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ARN específico do MARV, a sensibilidade analítica é de 1.16 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0.22 - 11.67 cópias alvo/ μ l]
- Para a deteção de ARN específico do ZEBOV, a sensibilidade analítica é de 1.39 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0.69 - 5.32 cópias alvo/ μ l]
- Para a deteção de ARN específico do SEBOV, a sensibilidade analítica é de 6.75 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 4.25 - 24.58 cópias alvo/ μ l]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do vírus Ébola e de Marburg serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN extraído de diferentes agentes patogênicos relacionados com Marburg- e Ebolavirus e/ou que podem causar sintomas semelhantes.

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogênicos:

- CCHFV Afg09-2990
- Dengue virus serotype 1
- Dengue virus serotype 2
- Dengue virus serotype 3
- Dengue virus serotype 4
- Vírus Hantaan 76-118
- Vírus da hepatite A
- Vírus da hepatite C
- Vírus da hepatite E
- Vírus da encefalite japonesa
- Junin virus XJ
- Vírus Lassa AV
- Vírus Lassa CSF
- Vírus Lassa Lib05-1580/121
- Vírus Lassa Nig08-A37
- Vírus Machupo Carvalho
- Vírus da encefalite Murray Valley
- Vírus da febre do Vale do Rift MP 12
- Vírus Sabia SPH114202
- Vírus da encefalite de St. Louis
- Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
- Vírus Usutu
- VSV Indiana
- Vírus do Nilo Ocidental, NY99 D
- Vírus do Nilo Ocidental, NY99
- Vírus do Nilo Ocidental, Uganda
- Vírus da febre amarela
- Vírus Zika

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base no ciclo limiar - valores (C_i). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, variabilidade Inter-ensaio e variabilidade Inter-lote.

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção de ARN específico do ZEBOV

ZEBOV	Concentração da Amostra [cópias/ μ l]	Concentração Média (cópias/ μ l)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	30	31.56	0.17	0.54
	10	32.80	0.12	0.36
Variabilidade Inter-ensaio	30	31.85	0.32	1.02
	10	33.07	0.34	1.04
Variabilidade Inter-lote	30	31.76	0.40	1.26
	10	33.03	0.44	1.35
Variabilidade Total	30	31.70	0.35	1.10
	10	32.95	0.38	1.16

Tabela 5: Dados de precisão para a detecção de ARN específico do MARV

MARV	Concentração da Amostra [cópias/ μ l]	Concentração Média (cópias/ μ l)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	30	30.71	0.27	0.88
	10	31.82	0.25	0.80
Variabilidade Inter-ensaio	30	30.86	0.24	0.79
	10	32.06	0.32	0.99
Variabilidade Inter-lote	30	30.83	0.21	0.69
	10	32.03	0.30	0.93
Variabilidade Total	30	30.79	0.23	0.75
	10	31.96	0.29	0.92

Os dados de precisão gerados para o sistema de detecção CI são resumidos nas tabelas 6 e 7 para amostras que contenham 30 e 10 cópias alvo virais, respetivamente.

Tabela 6: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control), analisando amostras com 30 cópias alvo/ μ l

ZEBOV e MARV	30 cópias/ μ l	Concentração Média (cópias/ μ l)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	ZEBOV	28.98	0.05	0.19
	MARV	28.90	0.09	0.32
Variabilidade Inter-ensaio	ZEBOV	29.32	0.36	1.23
	MARV	29.26	0.39	1.32
Variabilidade Inter-lote	ZEBOV	29.26	0.43	1.48
	MARV	29.22	0.43	1.47
Variabilidade Total	ZEBOV	29.16	0.37	1.29
	MARV	29.11	0.38	1.31

Tabela 7: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control), analisando amostras com 10 cópias alvo/ μ l

ZEBOV e MARV	10 cópias/ μ l	Concentração Média (cópias/ μ l)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	ZEBOV	29.09	0.05	0.17
	MARV	29.02	0.07	0.26
Variabilidade Inter-ensaio	ZEBOV	29.41	0.34	1.16
	MARV	29.34	0.34	1.17
Variabilidade Inter-lote	ZEBOV	29.32	0.43	1.48
	MARV	29.28	0.41	1.40
Variabilidade Total	ZEBOV	29.24	0.37	1.26
	MARV	29.19	0.35	1.21

11.4 Estudo clínico simulado

Para avaliar o desempenho clínico do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0, o ARN genómico do vírus *Ébola do Zaire* 2014/Gueckedou-C05 foi diluído em solução tampão AE e depois adicionado a 45 amostras de plasma EDTA humano negativas de vírus Ébola e vírus de Marburg independentes. Cada grupos de quinze espécimes foi adicionado até uma concentração final de 2,25 PFU/ml, 3 PFU/ml e 200 PFU/ml, respetivamente. Além disso, foram testadas 100 amostras de plasma EDTA individuais negativas de vírus Ébola e vírus de Marburg. Ocultou-se a identificação de todas as amostras, estas foram entregues a um operador imparcial e sujeitas a extração usando o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Os ácidos nucleicos extraídos foram analisados com o RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 no LightCycler® 480 Instrument II (Roche), no CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio- Rad) e no ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). A chave de marcação ocultada foi revelada depois de os resultados estarem completos.

Os resultados da análise com o RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 estão resumidos na Tabela 8 abaixo.

Table 8: Estudo clínico simulado - estatísticas sumárias

RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 utilizado em combinação com	CFX96™ Real-Time PCR Detection System		Light Cycler® 480 Instrument II		ABI Prism® 7500 SDS	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Amostras positivas (2,25 PFU/ml, 15 amostras)	15	0	15	0	14	1
Amostras positivas (3 PFU/ml, 15 amostras)	15	0	15	0	15	0
Amostras positivas (200 PFU/ml, 15 amostras)	15	0	15	0	15	0
Amostras negativas (100 amostras)	0	100	0	100	0	100
Total (145 amostras)	45	100	45	100	44	101
Acordo positivo percentual	100% (45/45)	92,1% - 100%*	100% (45/45)	92,1% - 100%*	97,8% (44/45)	88,4% - 99,6%*
Acordo negativo percentual	100% (100/100)	96,3% - 100%*	100% (100/100)	96,3% - 100%*	100% (100/100)	96,3% - 100%*

* 95% IC (= intervalo de confiança)

O RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o sistema de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit e o LightCycler® 480 Instrument II, o CFX96™ Real-Time PCR Detection System e o instrumento ABI Prism® 7500 SDS, respetivamente, identificaram corretamente 97,8% a 100% das amostras positivas do vírus *Ébola do Zaire* 2014/Gueckedou-C05 RNA. Nenhum dos espécimes não adicionados apresentou um sinal positivo.

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 em 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 RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma EBOV e MARV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: 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® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com marcação CE de acordo com a diretiva europeia de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC

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

Não disponível em todos os países.

© 2018 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Cor cap
	Número do produto
	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

Notes:

Notes:

Notes:

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

www.altona-diagnostics.com

