

Instruções de uso

RealStar[®] HEV RT-PCR Kit 2.0

07/2017 PT

RealStar[®]

HEV RT-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)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)



272013



96



07 2017



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	6
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	9
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
7.	Avisos e Precauções	11
8.	Procedimento	13
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	14
8.3	Preparação da Reação	16
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	17
9.1	Definições	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	17
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	18
10.	Análise de Dados	18
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	19
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	19
10.1.3	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo).....	20
10.1.4	Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo).....	20
10.2	Interpretação dos Resultados	21
10.2.1	Análise Qualitativa	21

10.2.2	Análise Quantitativa	21
11.	Avaliação do Desempenho.....	23
11.1	Sensibilidade Analítica	23
11.2	Especificidade Analítica	24
11.3	Linear Range.....	24
11.4	Precisão	26
12.	Limitações	27
13.	Controlo de Qualidade.....	28
14.	Apoio Técnico	28
15.	Bibliografia	28
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	29
17.	Explicação de Símbolos.....	30

1. Utilização Prevista

O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ARN específico do vírus da hepatite E (VHE).

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	240
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	QS1-4*	4	550
Branco	Water (PCR grade)	1	500

* O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 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® HEV RT-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 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 8.1 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

i

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

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 *vírus da Hepatite E* (VHE) é um vírus de cadeia simples com um genoma ARN de aproximadamente 7,5 kb de comprimento. É o único membro do género *Hepevirus* na família *Hepeviridae*. Consiste num capsídeo icosaédrico, sem invólucro, de aproximadamente 33 nm de diâmetro.

As infeções por VHE são um problema de saúde pública significativo. Estima-se que 2,3 milhões de milhões se encontram infetados a nível global. O VHE é responsável por quase 50% das hepatites virais agudas nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina. As infeções agudas afetam, principalmente, os adultos, com 15 a 40 anos de idade e são normalmente ligeiras. Mas, a taxa de mortalidade é particularmente elevada (10% - 40%) entre mulheres grávidas. Foram comunicadas infeções por VHE crónicas em pessoas imunossuprimidas. Os estudos em regiões endémicas indicam taxas de seroprevalência elevadas, variando entre 15% e 60%.

O VHE foi classificado em quatro grupos de genótipos, divididos em vários subtipos. Enquanto os genótipos 1 e 2 do VHE são hiperendémicos na Ásia e na África, onde causam surtos e hepatite aguda esporádica, o genótipo 3 do VHE é prevacente em nações desenvolvidas, onde foi identificada a hepatite aguda esporádica devido a este vírus.

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 a acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ARN específico do vírus da hepatite E (VHE).

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.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase 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 detecção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ARN do VHE estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do ARN específico do VHE e do Controlo Interno nos canais de detecção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

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

O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Quatro Padrões de Quantificação (QS1 - QS4)
- 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 VHE assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ARN específico do VHE. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados segundo a 1st norma internacional da OMS para o Hepatitis E Virus (Quanti) para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico -Based Assays (PEI código 6329/10). Os Padrões de Quantificação podem ser utilizados individualmente como controlos positivos ou em conjunto para gerar uma **curva padrão**, a qual pode ser utilizada para a determinação da concentração do ARN específico do VHE na amostra

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

Padrões de quantificação	Concentração [IU/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® HEV RT-PCR Kit 2.0 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)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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.
- 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 ARN extraído é o material inicial para o RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0.

A 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® HEV RT-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.



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® HEV RT-PCR Kit 2.0 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	20 µl	240 µl
Controlo Interno	2.5 µl	30 µl
Volume da Master Mix	27.5 µl	330 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	20 µl	240 µl
Volume da Master Mix	25 µl	300 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



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

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 25 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 25 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 25 µl dos controlos (padrão de quantificação, controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	25 µl
Controlo da Amostra	25 µl
Volume Total	50 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo (QS) e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Para fins de quantificação devem ser utilizados todos os Padrões de Quantificação (QS1 a QS4).
- ▶ 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® HEV RT-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	50 µl
Ramp Rate	Predefinição
Predefinição	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- ▶ Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do VHE	VHE	FAM™	(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 Re- petições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Transcristase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplification	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	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® HEV RT-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 processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é **válido**, se as seguintes condições de controlo estiverem presentes:

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 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.

10.1.3 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 **quantitativo 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 quadrado (R^2)	≥ 0.98

NOTA



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

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

Um **quantitativo** 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 **quantitativo 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™	JOE™	
+1	+*	Foi detetado o ARN específico do VHE.
-	+	Não foi detetado o ARN específico do VHE. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do VHE.
-	-	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™. Uma carga elevada de ARN do VHE na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para que seja gerada uma **curva padrão** para a análise quantitativa, estes padrões têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (capítulo 6. Descrição do Produto). A utilização de **padrões** concentrações conhecidas permite a geração de uma curva padrão para a análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

C_t = Limiar Ciclo

m = Declive

N_0 = Concentração inicial

b = Impedir

A partir da curva padrão, pode-se quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.

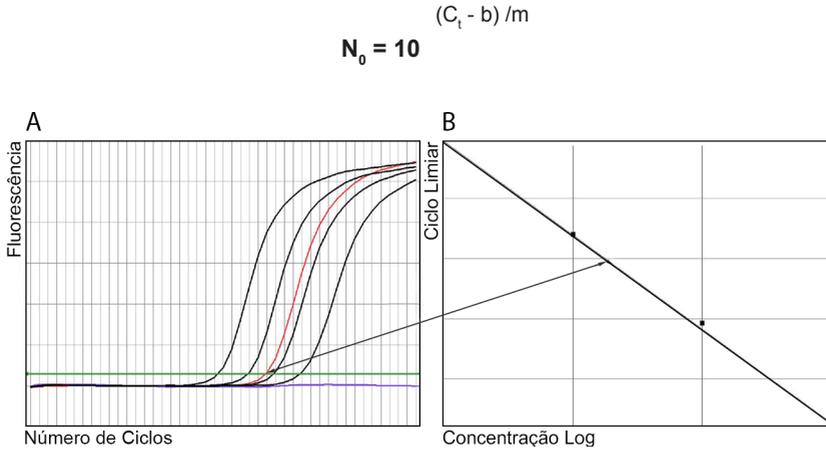


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [Um] e uma análise de Curva Padrão [B]

NOTA



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

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

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho analítico do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 foi

efetuada utilizando a "1.ª norma internacional da OMS para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico de ARN do ARN PEI código: 6329/10".

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (limite de deteção: LDD) do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (IU por µl de eluato) de moléculas de ARN específico do HEV que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ARN quantificado do VHE ("1ª norma internacional da Organização Mundial da Saúde para ensaios de amplificação de ácido nucleico (NAT) do ARN específico do vírus da hepatite E (VHE)

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

Concentração inserida [IU/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10.000	24	24	100
3.162	24	24	100
1.000	24	24	100
0.316	24	24	100
0.100	24	22	92
0.0316	24	9	38
0.010	24	4	17
0.003	24	2	8

A sensibilidade analítica do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ARN específico do VHE, a sensibilidade analítica é de 0.20 IU/µl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0.12 - 0.45 IU/µl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 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 VHE serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de vírus relacionados com VHE e outros agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes a VHE.

O RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Citomegalovírus
- Vírus Epstein-Barr
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Parvovírus humano B19
- Vírus Varicella-Zoster

11.3 Linear Range

O intervalo linear do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ARN específico do VHE utilizando concentrações entre 1E+08 - 1E+00 IU/µl. Pelo menos seis réplicas por diluição foram analisadas.

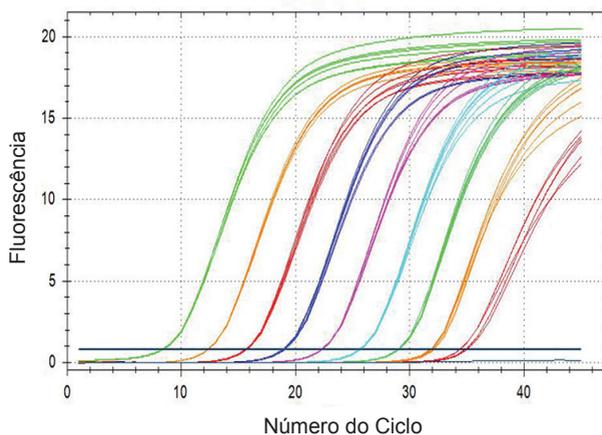
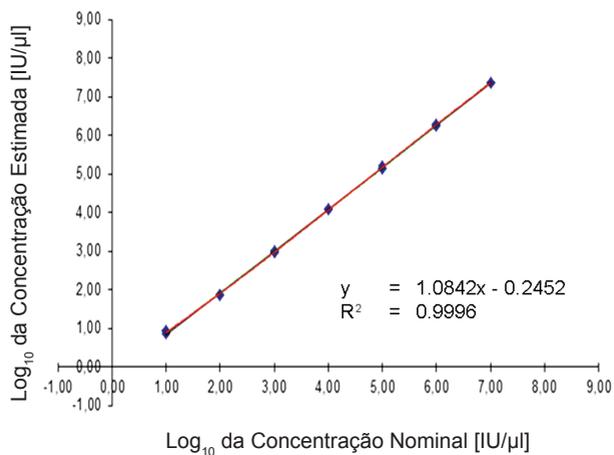
A**B**

Figura 2: Curvas de amplificação [A] e regressão [B] de uma série de diluições analisadas de ARN específico do VHE

O intervalo linear do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 foi determinada como sendo 10^1 IU/ μl - 10^7 IU/ μl

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 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. Estes dados baseiam-se na análise quantitativa de concentrações definidas de ARN específico de VHE e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos de Controlo Interno. Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, Inter-ensaio e Inter-lote.

Tabela 2: Dados de precisão para a deteção de ARN específico do VHE

VHE	Concentração Média [IU/ μ l]	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	5.18	0.43	8.28
Variabilidade Inter-ensaio	6.06	0.35	5.70
Variabilidade Inter-lote	5.62	0.56	10.02
Variabilidade Total	5.77	0.56	9.68

Tabela 3: Dados de precisão para a deteção do Controlo Interno

Controlo Interno	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	30.55	0.05	0.16
Variabilidade Inter-ensaio	30.38	0.07	0.23
Variabilidade Inter-lote	30.47	0.11	0.37
Variabilidade Total	30.44	0.10	0.33

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 sub quantificação, falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma VHE abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em sub quantificação ou na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® HEV RT-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® HEV RT-PCR Kit 2.0 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® HEV RT-PCR Kit 2.0 é a CE-marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 98/79/EC.

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

Não disponível em todos os países.

© 2017 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
	Consult instructions for use
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notas:

Notas:

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

www.altona-diagnostics.com

