

Instruções de uso

RealStar[®]

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

04/2019 PT

RealStar®

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

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)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CE

IVD

REF

164013

Σ

96

📖

04 2019



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.....	8
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7.	Avisos e Precauções	10
8.	Procedimento	12
8.1	Preparação de Amostras.....	12
8.2	Preparação da Master Mix.....	13
8.3	Preparação da Reação	15
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1	Definições	16
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
10.	Análise de Dados	17
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).....	18
10.2	Interpretação dos Resultados	19
10.2.1	Análise Qualitativa	19
11.	Avaliação do Desempenho.....	20

11.1	Sensibilidade Analítica	20
11.2	Especificidade Analítica	22
11.3	Precisão	23
12.	Limitações	24
13.	Controlo de Qualidade.....	26
14.	Apoio Técnico	26
15.	Bibliografia	26
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	27
17.	Explicação de Símbolos	28

1. Utilização Prevista

O RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 constitui uma análise de diagnóstico *In vitro*, baseado na tecnologia PCR de tempo real, para a detecção e diferenciação qualitativas de ARN específico de vírus da gripe A, vírus da gripe B e vírus da gripe A (H1N1)pdm09.

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	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

3. Armazenamento

- O RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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)
- Esfregaços adequados para a recolha de amostras
- 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

A *Influenza*, habitualmente referida como gripe, é uma doença infecciosa causada por vírus ARN da família *Orthomyxoviridae* (vírus gripal). Os vírus da gripe caracterizam-se pela mudança contínua dos seus principais antígenos de superfície hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) (desvio antigénico). Infetam as aves e os mamíferos por aerossóis. Os vírus da gripe A e da gripe B humana causam infeções graves predominantemente nas vias respiratórias tendo a febre e a tosse como os sintomas mais frequentes. Em casos mais graves, a gripe causa pneumonia, que pode ser fatal, principalmente em crianças e idosos.

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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 constitui uma análise de diagnóstico *In vitro*, baseado na tecnologia PCR de tempo real, para a deteção e diferenciação qualitativas de ARN específico de vírus da gripe A, vírus da gripe B e vírus da gripe A (H1N1)pdm09 (anteriormente designado como vírus da gripe A H1N1_{nv}).

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) (Internal Control) 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 deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ARN de gripe A estão marcadas com o fluoróforo FAM™, as sondas específicas do ARN de gripe B estão marcadas com o fluoróforo Cy®5 e as sondas específicas do ARN de gripe A (H1N1)pdm09 estão marcadas com o fluoróforo ROX™. 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 ARN específico de gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09, assim como a deteção do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

- Transcricção reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno (Internal control)
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno (Internal Control)
- Deteção simultânea de amplicções de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

The RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 consists of:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcricção reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) para permitir transcricção reversa, a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ARN específico de gripe B, ARN específico de gripe B, ARN específico de gripe A (H1N1) pdm09 e um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reacção.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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)
- 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)
- 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)
 - 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*.
- Os espécimes 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 ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 .

A qualidade do ARN 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® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) 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 RT-PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de RT-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
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-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
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume da Master Mix	20 µl	240 µl

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 (controlo positivo ou negativo).

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

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um Controlo Positivo e pelo menos um Controlo Negativo por Master Mix e execute o 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
gripe A específico ARN	gripe A	FAM™	(Nenhum)
gripe B específico ARN	gripe B	Cy®5	(Nenhum)
gripe A (H1N1)pdm09 específico ARN	gripe A (H1N1) pdm09	ROX™	(Nenhum)
Internal Control (controlo interno)	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Repetições do Ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcristase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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™	Cy [®] 5	ROX™	JOE™
Controlo Positivo [gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09]	+	+	+	+/-*
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.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção				Interpretação de Resultados
FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+*	ARN específico de gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09 detetado.
+	-	-	+*	gripe A ARN específico detetado.
-	+	-	+*	gripe B ARN específico detetado.
-	-	+	+	gripe A (H1N1)pdm09 ARN específico detetado. ¹
+	-	+	+*	gripe A (H1N1)pdm09 ARN específico detetado. ^{1,2}
-	-	-	+	Nenhum ARN específico de gripe A, gripe B ou gripe A (H1N1)pdm09 detetado. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico de vírus da gripe A, vírus da gripe B e vírus da gripe A (H1N1)pdm09.
-	-	-	-	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™, no canal de deteção Cy®5 nem no canal de deteção ROX™. Uma carga elevada de ARN alvo na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de controlo interno (Internal Control).

¹ Devido à diferente sensibilidade dos sistemas de deteção para o alvo da gripe A (FAM™) e da gripe A H1N1pdm09(ROX™), em casos raros, as amostras positivas fracas podem mostrar um sinal no canal ROX™ mas não no canal FAM™.

² As estirpes (H1N1)pdm09 pertencem ao grupo do vírus da gripe A. Como tal, as amostras positivas (H1N1)pdm09 geram um sinal positivo no canal FAM™ e no canal ROX™.

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi feita usando ARN de vírus da gripe A H1N1 pdm09 (estirpe A/NY/02/2009), ARN de vírus da gripe A H3N2 (estirpe Wisconsin/67/05) e ARN de vírus da gripe B (estirpe Florida/04/06) quantificados.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 define-se como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 ou de gripe A ou de gripe B que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluição de ARN de gripe A (H1N1)pdm09, ARN de gripe A e ARN de gripe B quantificados.

Tabela 1: RT-PCR resultados utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica relativamente à deteção de ARN específico de gripe AARN

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	23	96
1,000	24	18	75
0,316	24	12	50
0,100	24	2	8
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tabela 2: RT-PCR resultados utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica relativamente à deteção de específico de gripe BARN

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	88
0,100	24	13	54
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tabela 3: RT-PCR resultados utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica relativamente à deteção de específico de gripe A (H1N1)pdm09ARN

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	8	33
0,032	24	2	8
0,010	24	2	8
0,003	24	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a detecção do ARN específico de gripe A, a sensibilidade analítica é de 2,88 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 1,70-6,55 cópias/μl]
- Para a detecção do ARN específico de gripe B, a sensibilidade analítica é de 0,39 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,26-0,81 cópias/μl]
- Para a detecção do ARN específico do vírus de gripe A (H1N1)pdm09, a sensibilidade analítica é de 0,87 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,51-1,97 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 é assegurada pela seleção cuidadosa dos oligonucleótidos (primers e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de seqüências em relação a seqüências publicamente disponíveis para assegurar a detecção de todos os genótipos de gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09 relevantes.

A especificidade analítica do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de agentes patogénicos com probabilidade de estarem presentes na mesma matriz de amostra ou que provocam sintomas semelhantes aos do vírus da gripe.

O RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Enterovírus (Coxsackie)
- Adenovírus humano
- Metapneumovírus humano
- Vírus da parainfluença humana

- Vírus sincicial respiratório A humano
- Rinovírus
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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 baseado no ciclo limiar (C_t) – valores. Pelo menos **seis** réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade inter-ensaio e variabilidade interlote.

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção dos gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09 específicos ARN

gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09		Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação [%]
	gripe A	30,44	0,18	0,60
	gripe B	33,59	0,19	0,57
	gripe A (H1N1) pdm09	32,30	0,07	0,22

gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09		Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação [%]
	gripe A	30,45	0,13	0,42
	gripe B	33,82	0,28	0,83
	gripe A (H1N1) pdm09	32,14	0,10	0,31
	gripe A	30,31	0,17	0,57
	gripe B	34,61	0,60	1,74
	gripe A (H1N1) pdm09	32,09	0,08	0,24
	gripe A	30,35	0,18	0,59
	gripe B	34,27	0,70	2,04
	gripe A (H1N1) pdm09	32,13	0,09	0,28

Tabela 5: Dados de precisão para a deteção do Controlo Interno (Internal Control)

Internal Control	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	29,15	0,06	0,19
Variabilidade Inter-Ensaio	29,09	0,08	0,28
Variabilidade Entre Lotes	29,09	0,08	0,28
Variabilidade Total	29,11	0,08	0,27

12. Limitações

- Strict compliance with the Instructions for Use is required for optimal results.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures.
- Good laboratory practice is essential for proper performance of this assay. Extreme care should be taken to preserve the purity of the components of the kit and reaction setups. All reagents should be closely monitored for impurity and contamination. Any suspicious reagents should be discarded.
- Appropriate specimen collection, transport, storage and processing procedures are required for the optimal performance of this test.
- This assay must not be used on the specimen directly. Appropriate nucleic acid extraction methods have to be conducted prior to using this assay.
- The presence of RT-PCR inhibitors (e.g. heparin) may cause false negative or invalid results.
- Potential mutations within the target regions of the gripe A, gripe B and/or gripe A (H1N1)pdm09 genome covered by the primers and/or probes used in the kit may result in failure to detect the presence of the pathogens.
- As with any diagnostic test, results of the RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 need to be interpreted in consideration of all clinical and laboratory findings.
- Some rare strains of influenza B virus (e.g. strain Lee or reassortants thereof) carry a specific mutation and for this reason are detected with a slightly lower sensitivity compared to influenza B virus strains not carrying this mutation.
- The strain influenza A/Parana/720/2015 (H1N2v) will be typed as influenza A H1N1_{nv}, since it contains the same matrix gene target sequence.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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

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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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

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

