

Instruções de Utilização

RealStar[®] Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

02/2021 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)



164013



96



02 2021



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.....	8
5.	Informação de Base	9
6.	Descrição do Produto.....	9
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
7.	Avisos e Precauções	12
8.	Procedimento	14
8.1	Preparação de Amostras.....	14
8.2	Preparação da Master Mix.....	15
8.3	Preparação da Reação	17
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	18
9.1	Definições	18
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	19
10.	Análise de Dados	19
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	20
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	20
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	20
10.2	Interpretação dos Resultados	21
10.2.1	Análise Qualitativa	21
11.	Avaliação do Desempenho.....	22

11.1	Sensibilidade Analítica	22
11.2	Especificidade Analítica	25
11.3	Precisão	25
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 kit 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.

2. Componentes do Kit

Cor da tampa	Componente	Número de tubos	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

Internal Control (IC) = Controlo Interno

Positive Control = Controlo Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O kit 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 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 (ótico) 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 kit 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 por vírus da gripe A H1N1_{nv}).

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 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 Cy5 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 Internal Control (Controlo Interno) nos canais de deteção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

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

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

O kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 consiste em:

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

Internal Control (IC) = Controlo Interno

Positive Control = Controlo Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

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

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi desenvolvido e validado para ser usado com os seguintes instrumentos 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 atentamente as instruções de utilização antes de usar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes quanto a:
 - Integridade
 - Integralidade com respeito ao número, tipo e enchimento (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelamento à chegada
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- Amostras devem ser tratadas sempre como infecciosas e/ou riscos biológicos, seguindo os procedimentos laboratoriais seguros.
- Use luvas de proteção descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular sempre que manusear amostras.
- Evite a contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) das amostras e dos componentes do kit.
- Use sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase com barreiras de aerossol.
- Use sempre luvas de proteção descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Use zonas de trabalho separadas e segregadas para (i) preparação de amostras, (ii) configuração da reação e (iii) atividades de amplificação/deteção. O fluxo de trabalho no laboratório deve prosseguir de forma unidirecional. Use sempre luvas descartáveis em cada zona e troque de luvas antes de entrar numa zona diferente.
- Dedique consumíveis e equipamento a zonas de trabalho separadas e não os mude de uma zona para a outra.

- Conserve o material positivo, e/ou potencialmente positivo, separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra tubos/placas de reação pós amplificação, para evitar contaminação com produtos de amplificação.
- Poderão ser testados controlos adicionais de acordo com as diretrizes e ou requisitos de regulamentos locais, estaduais e/ou federais, bem como de organizações de acreditação.
- Não aplique autoclave aos tubos de reação depois da PCR, porque não irá degradar o ácido nucleico amplificado e corre-se o risco de contaminar a zona de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.
- Descarte a amostra e os resíduos dos ensaios cumprindo os regulamentos de segurança aplicáveis localmente.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o kit 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 necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para 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)

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 tem de ser validada pelo utilizador.

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, 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 kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 contém um Internal Control (Controlo Interno, 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Controlo Interno)	1 µl	12 µl
Volume do 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 IC **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume de eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de Elution Buffer (tampão de eluição) ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume do 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 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 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 1 000 x g (~ 3 000 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 de programação 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
ARN específico do gripe A	gripe A	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do gripe B	gripe B	Cy5	(Nenhum)
ARN específico do gripe A (H1N1)pdm09	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 específicos, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o kit 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 processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção			
	FAM™	Cy5	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 de Diagnóstico Inválido (qualitativo)

Um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se qualquer uma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não for cumprida.

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção				Interpretação de Resultados
FAM™	Cy5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+	Foi detetado ARN específico de gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09.
+	-	-	+	Foi detetado ARN específico do gripe A.
-	+	-	+	Foi detetado ARN específico do gripe B.
-	-	+	+	Foi detetado ARN específico do gripe A (H1N1)pdm09. ¹
+	-	+	+	Foi detetado ARN específico do gripe A (H1N1)pdm09. ^{1,2}
-	-	-	+	Não foi detetado ARN específico do gripe A, nem do gripe B nem do gripe A (H1N1)pdm09. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do vírus da gripe A, vírus da gripe B e vírus da gripe A (H1N1)pdm09.
-	-	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

* A deteção do Internal Control (Controlo Interno) no canal de deteção JOE™ não é necessária para os resultados positivos quer no canal de deteção FAM™, no canal de deteção Cy5 ou no canal de deteção ROX™. Uma carga elevada de ARN alvo na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Internal Control (Controlo Interno).

¹ Devido à sensibilidade diferente dos sistemas de deteção para o alvo gripe A (FAM™) e gripe A (H1N1)pdm09 (ROX™), em casos raros, amostras positivas fracas podem demonstrar um sinal no canal ROX™, mas não no canal FAM™.

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit 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/ μ l 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: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ARN específico do gripe A

Conc. de Entrada [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: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ARN específico do gripe B

Conc. de Entrada [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: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ARN específico do gripe A (H1N1)pdm09

Conc. de Entrada [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 kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi determinada por análise proibit:

- Para a deteção 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 deteção 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 deteção 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 sequências em relação a sequências 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 kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genômico extraído de agentes patogênicos com probabilidade de se encontrarem presentes na mesma matriz de amostra ou que provocam sintomas semelhantes aos vírus da gripe.

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

- Enterovírus (Coxsackie)
- Adenovírus humano
- Metapneumovírus humano
- Vírus da parainfluenza humana
- Vírus sincicial respiratório humano A
- Rinovírus
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 foi determinada como variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), variabilidade interensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e variabilidade entre lotes (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada combinando as 3 análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do desvio padrão e do coeficiente de variação com base nos valores do ciclo limiar (C_t). Foram analisadas pelo menos **seis** réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

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

gripe A, gripe B e gripe A (H1N1)pdm09		Ciclo Limiar Médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	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
Variabilidade Interensaio	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
Variabilidade Entre Lotes	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
Variabilidade Total	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 detecção do Internal Control (Controlo Interno)

Internal Control (Controlo Interno)	Ciclo Limiar Médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	29,15	0,06	0,19
Variabilidade Interensaio	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

- Para obter resultados otimizados é necessária uma rigorosa conformidade com as instruções de utilização.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *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 de amostras adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores de RT-PCR (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do gripe A, gripe B e/ou do gripe A (H1N1)pdm09 abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de detecção da presença dos agentes patogénicos.

- À semelhança de qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- Algumas estirpes raras de gripe suína como, por exemplo, a gripe A/Parana/720/2015 (H1N2v) e a gripe A G4 EA H1N1, contendo a mesma sequência alvo do gene da matriz que a gripe A (H1N1)pdm09, serão tipificadas como gripe A (H1N1)pdm09.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de kit 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); ATCC® (American Type Culture Collection); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); SmartCycler® (Cepheid); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); MinElute®, QIAamp®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

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 kit 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.

© 2021 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 da tampa
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de item 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

