

## Instruções de uso

# RealStar<sup>®</sup> PIV RT-PCR Kit 2.0

11/2019 PT



# RealStar<sup>®</sup>

## PIV 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)  
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)



262013



96



11 2019



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

## Conteúdo

<b>1.</b>	<b>Utilização Prevista .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes do Kit .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Armazenamento .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informação de Base .....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrição do Produto.....</b>	<b>9</b>
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
6.2	Tipos de amostras.....	11
<b>7.</b>	<b>Avisos e Precauções .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimento .....</b>	<b>13</b>
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	15
8.3	Preparação da Reação .....	16
<b>9.</b>	<b>Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....</b>	<b>17</b>
9.1	Definições .....	18
9.2	Detetores de fluorescência (corantes) .....	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	19
<b>10.</b>	<b>Análise de Dados .....</b>	<b>19</b>
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	20
10.1.1	Processamento de teste de diagnóstico válido.....	20
10.1.2	Processamento de teste de diagnóstico inválido .....	20
10.2	Interpretação dos Resultados .....	21
10.2.1	Análise Qualitativa .....	21

<b>11.</b>	<b>Avaliação do Desempenho.....</b>	<b>21</b>
11.1	Sensibilidade Analítica .....	22
11.2	Especificidade Analítica .....	25
11.3	Precisão .....	27
11.4	Avaliação de Diagnóstico.....	30
<b>12.</b>	<b>Limitações .....</b>	<b>31</b>
<b>13.</b>	<b>Controlo de Qualidade.....</b>	<b>33</b>
<b>14.</b>	<b>Apoio Técnico .....</b>	<b>33</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>33</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade .....</b>	<b>34</b>
<b>17.</b>	<b>Explicação de Símbolos .....</b>	<b>35</b>

## 1. Utilização Prevista

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico do parainfluenza humano (PIV) das espécies 1, 2, 3 e 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Além disso, o teste permite a diferenciação entre o ARN específico para o género *Respirovirus* (PIV-1 e PIV-3) e o género *Rubulavirus* (PIV-2 e PIV-4).

## 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 PIV-1 + PIV-2	1	250
Laranja	Positive Control PIV-3 + PIV-4	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Controle interno

Positive Control = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

## 3. Armazenamento

- O kit RealStar® PIV 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 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 (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



***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

Os vírus parainfluenza humanos (PIV) são vírus de ARN de cadeia simples de sentido negativo da família *Paramyxoviridae*. Os PIV humanos dividem-se em quatro espécies pertencentes a dois géneros diferentes: O PIV-1 e o PIV-3 são atribuídos ao género *Respirovirus*, enquanto o PIV-2 e o PIV-4 são atribuídos ao género *Rubulavirus*. Foram descritas duas subespécies para o PIV-4 (PIV-4a e PIV-4b) pouco tempo depois deste vírus ser identificado em 1959. Atualmente, a existência de genótipos diversos tem sido notificada para todas as espécies de PIV.

As infeções com os PIV são, aparte o *vírus sincicial respiratório humano* (VSR, vírus sincicial respiratório humano), a segunda causa mais frequente de doença grave das vias respiratórias inferiores (IVRI) nas crianças pequenas. Estudos serológicos revelaram que 90 % a 100 % das crianças com 5 anos ou mais têm anticorpos ao PIV-3 e cerca de 75 % têm anticorpos ao PIV-1 e ao PIV-2. As infeções com os vírus parainfluenza constituem também um problema significativo nos idosos, nas pessoas com doenças cardiopulmonares e nos indivíduos imunocomprometidos. As reinfeções repetidas ocorrem durante toda a vida, mas manifestam-se normalmente como uma doença ligeira das vias respiratórias superiores (IVRS) nos adultos.

Em geral, os PIV humanos têm sido associados a todos os tipos de IVRS e IVRI. As seguintes relações entre as espécies e síndromes clínicas específicas, a idade dos doentes e a época do surto são frequentemente observadas:

- O PIV-1 é a principal causa de crupe agudo nos lactentes e nas crianças pequenas, mas também causa infeções ligeiras das vias respiratórias superiores, faringite e traqueobronquite em todos os grupos etários. Nos climas temperados, o PIV-1 causa surtos de crupe bienais nos meses de outono.



- O PIV-2 é geralmente associado a taxas de infeção inferiores às do PIV-1 ou do PIV-3 e causa IVRS ligeiras e crupe nas crianças e, ocasionalmente, IVRI. Tal como o PIV-1, os surtos tendem a ocorrer principalmente nos meses de outono com uma frequência anual ou bienal.
- O PIV-3 é uma causa importante de IVRI grave nos lactentes e nas crianças pequenas, causando muitas vezes crupe, bronquite e pneumonia nas crianças com menos de 1 ano de idade. Nas crianças mais velhas e nos adultos, pode causar IVRS ou traqueobronquite. As infeções com o PIV-3 podem ocorrer em qualquer estação, com o pico de atividade durante os meses da primavera e do início do verão de cada ano.
- O PIV-4 é o menos frequente deste grupo e é geralmente associado a IVRS ligeira.

#### 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 kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico do parainfluenza humano (PIV) das espécies 1, 2, 3 e 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Além disso, o teste permite a diferenciação entre o ARN específico para o género *Respirovirus* (PIV-1 e PIV-3) e o género *Rubulavirus* (PIV-2 e PIV-4).

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 para o PIV-1 e o PIV-3 são marcadas com o fluóforo FAM™, ao passo que as sondas específicas para o PIV-2 e o PIV-4 são marcadas com o fluóforo Cy®5. A sonda específica para o Internal Control (controlo interno) é marcada com o fluóforo JOE™.

A utilização de sondas associadas a colorações distinguíveis permite a deteção paralela de PIV-1/3 (género *Respirovirus*), PIV-2/4 (género *Rubulavirus*) e 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 Controlo interno (Internal control)
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno (Internal Control)
- Deteção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control PIV-1 + PIV-2
- Positive Control PIV-3 + PIV-4
- Water (PCR grade)

Internal Control = 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 detecção do ARN específico do PIV-1 - 4 e do Internal Control (controlo interno) numa preparação de reação.

### 6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 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)

### 6.2 Tipos de amostras

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi validado para utilização com o seguinte tipo de amostras:

- Esfregaços respiratórios humanos colhidos em meio de transporte universal (UTM)

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi validado utilizando o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) para extração e purificação de ácido nucleico.

Caso seja aplicado um procedimento apropriado de extração de ácido nucleico, podem ser utilizados tipos de amostras adicionais juntamente com o kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0. A adequabilidade do procedimento de extração de ácido nucleico assim como a utilização de tipos de amostras adicionais tem de ser validada pelo utilizador.

## 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 (ver 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*.
- A amostra clínica deve ser tratada sempre como infecciosa e/ou risco biológico, 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® PIV 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 PCR em tempo real.

Os seguintes kits e sistemas são geralmente adequados para extração de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- AltoStar® Automation System AM16
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi validado utilizando o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) para extração e purificação de ácido nucleico.

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico. No entanto, a sua adequabilidade para utilização com o kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 17000 x g (~ 13000 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (controlo interno)	1 µl	12 µl
<b>Volume do Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um 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 (CI) **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 (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
<b>Volume Total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Certifique-se de que cada Controlo Positivo e pelo menos um Controlo Negativo é utilizado por Master Mix e 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® PIV 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	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

### 9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do PIV-1 e do PIV-3	PIV-1/3	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do PIV-2 e do PIV 4a/b	PIV-2/4	Cy®5	(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 kit RealStar® PIV 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

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

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Controlo Positivo PIV-1 + PIV-2	+	+	+/-*
Controlo Positivo PIV-3 + PIV-4	+	+	+/-*
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

Um processamento de teste de diagnóstico 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™	Cy®5	JOE™	
+	-	+*	Foi detetado ARN específico do PIV-1 e/ou do PIV-3.
-	+	+*	Foi detetado ARN específico do PIV-2 e/ou do PIV-4a/b.
+	+	+*	Foi detetado ARN específico do PIV-1 e/ou do PIV-3 e do PIV-2 e/ou do PIV-4a/b.
-	-	+	Não foi detetado ARN específico do PIV-1 nem do PIV-2 nem do PIV-3 nem do PIV-4a nem do PIV-4b. A amostra não contém quantidades detetáveis destes ARN específicos.
-	-	-	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 no canal de deteção FAM™ ou no canal de deteção Cy®5. Uma carga elevada de ARN do PIV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (controlo interno).

## 11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando material de vírus das seguintes estirpes de PIV: PIV-1: ATCC® VR-94™; PIV-2: ATCC® VR-92™; PIV-3: ATCC® VR-93™; PIV-4a: ATCC® VR-1378™; PIV-4b: ATCC® VR-1377™.

### 11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 é definida como a concentração (cópias/ml) de moléculas de ARN específico do PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a ou PIV-4b que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95 %. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluições de espécies de PIV em meio de transporte universal. O material de vírus de PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a e PIV-4b foi fornecido pela American Type Culture Collection (ATCC).

Cada diluição foi testada em 8 réplicas em 3 dias diferentes (total n = 24 por diluição) utilizando combinações de 3 lotes de kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0, 3 lotes de kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno). Foram efetuados processamentos utilizando 3 instrumentos diferentes de AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de deteção).

Os dados de todos os processamentos foram combinados e foi realizada uma análise Probit para determinar o valor do LDD de 95 %.

**Tabela 1:** Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do PIV-1

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	22	92
3,16E+01	24	12	50
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	3	13
1,00E+00	24	1	4

**Tabela 2:** Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do PIV-2

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	17	71
1,00E+01	24	9	38
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	3	13

**Tabela 3:** Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do PIV-3

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Rélicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	17	71
3,16E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

**Tabela 4:** Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do PIV-4a

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Rélicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	23	96
1,00E+02	24	14	58
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	0	0
1,00E+00	24	0	0



**Tabela 5:** Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do PIV-4b

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	22	92
1,00E+02	24	9	38
3,16E+01	24	3	13
1,00E+01	24	2	8
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

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

- Para a deteção de ARN específico do PIV-1, a sensibilidade analítica é de 203 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 114 - 493 cópias/ml]
- Para a deteção de ARN específico do PIV-2, a sensibilidade analítica é de 146 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 78 - 383 cópias/ml]
- Para a deteção de ARN específico do PIV-3, a sensibilidade analítica é de 301 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 186 - 656 cópias/ml]
- Para a deteção de ARN específico do PIV-4a, a sensibilidade analítica é de 456 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 256 - 1 096 cópias/ml]
- Para a deteção de ARN específico do PIV-4b, a sensibilidade analítica é de 754 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 436 - 1 754 cópias/ml]

## 11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados por análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todas as espécies de PIV relevantes serão detetadas.

A especificidade analítica do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste de agentes patogênicos relacionados com o PIV e/ou que possam provocar sintomas semelhantes ao PIV.

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogênicos:

- Adenovírus humano 1
- Adenovírus humano 2
- Adenovírus humano 3
- Adenovírus humano 4
- Vírus sincicial respiratório humano A
- Vírus sincicial respiratório humano B
- Metapneumovírus humano A2
- Metapneumovírus humano B2
- Vírus da gripe A
- Vírus da gripe B
- Enterovírus (Coxsackievirus A3)
- Rinovírus
- Coronavírus humano
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

Além disso, foram testadas as espécies 1 a 4 do PIV. O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 não gerou sinais falsos positivos no canal de detecção específico do PIV-1 e do PIV-3 ao testar o PIV-2, o PIV-4a ou/e o PIV-4b. Além disso, não foram observados sinais falsos positivos no canal de detecção específico do PIV-2 e do PIV-4 ao testar o PIV-1 e/ou o PIV-3.

### 11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi determinada como variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de uma experiência), variabilidade interensaio (variabilidade entre experiências diferentes) 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 coeficiente de variação com base nos valores do ciclo limiar ( $C_t$ ). Foram analisadas pelo menos 6 réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

**Tabela 6:** Dados de precisão (CV % [valores  $C_t$ ]) para amostras de meio UTM muito positivas de PIV-1

	Amostra muito positiva de PIV-1 [CV % baseada no valor $C_t$ ]
Variabilidade Intraensaio	0,41 - 2,90
Variabilidade Interensaio	1,11 - 1,99
Variabilidade Entre Lotes	1,79
Variabilidade Total	1,56

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas.

**Tabela 7:** Dados de precisão (CV % [valores  $C_t$ ]) para amostras de meio UTM muito positivas de PIV-2

	Amostra muito positiva de PIV-2 [CV % baseada no valor $C_t$ ]
Variabilidade Intraensaio	0,21 - 1,91
Variabilidade Interensaio	1,38 - 2,19
Variabilidade Entre Lotes	1,35
Variabilidade Total	1,95

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas.

**Tabela 8:** Dados de precisão (CV % [valores  $C_t$ ]) para amostras de meio UTM muito positivas de PIV-3

	Amostra muito positiva de PIV-3 [CV % baseada no valor $C_t$ ]
Variabilidade Intraensaio	0,45 - 4,04
Variabilidade Interensaio	1,55 - 2,41
Variabilidade Entre Lotes	2,80
Variabilidade Total	2,42

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas.

**Tabela 9:** Dados de precisão (CV % [valores  $C_i$ ]) para amostras de meio UTM muito positivas de PIV-4a.

	Amostra muito positiva de PIV-4a [CV % baseada no valor $C_i$ ]
Variabilidade Intraensaio	0,35 - 0,77
Variabilidade Interensaio	1,40 - 1,88
Variabilidade Entre Lotes	1,07
Variabilidade Total	1,96

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas.

**Tabela 10:** Dados de precisão (CV % [valores  $C_i$ ]) para amostras de meio UTM muito positivas de PIV-4b

	Amostra muito positiva de PIV-4b [CV % baseada no valor $C_i$ ]
Variabilidade Intraensaio	0,63 - 1,50
Variabilidade Interensaio	2,09 - 3,07
Variabilidade Entre Lotes	1,35
Variabilidade Total	2,42

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas.

**Tabela 11:** Dados de precisão (CV % [valores C<sub>v</sub>]) para a detecção do Internal Control (controle interno) nas amostras de meio UTM negativas de PIV

	Internal Control (controle interno)
Variabilidade Intraensaio	0,33 - 0,94
Variabilidade Interensaio	0,82 - 2,07
Variabilidade Entre Lotes	0,47
Variabilidade Total	1,64

## 11.4 Avaliação de Diagnóstico

O kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 foi avaliado num estudo comparativo com o RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit com marcação CE.

Foram testadas retrospectivamente em paralelo 80 amostras de esfregaços respiratórios utilizando o RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit em combinação com o MagNA PURE 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) e o MagNA Pure 96 System (Roche) e o kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o AltoStar® Internal Control 1.5 (controle interno) no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) e no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção). Para a análise qualitativa, foram excluídas todas as amostras com um resultado inválido para um ou ambos os ensaios. Os resultados das 72 amostras restantes são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do kit RealStar®PIV RT-PCR Kit 2.0 em esfregaços respiratórios

		RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm)	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0	POSITIVO	32	1
	NEGATIVO	0	39

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 em comparação com o RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) kit foi de 100 % e 97,5 %, respetivamente.

## 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 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 PIV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- À semelhança de qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos 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 kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

## 14. Apoio Técnico

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

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

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

## 15. Bibliografia

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

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

## 16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); AltoStar® (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 kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE, de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao diagnóstico *in vitro*.

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

Não disponível em todos os países.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

## 17. Explicação de Símbolos

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

**Notas:**

**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

