

Instruções de utilização

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

09/2021 PT

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)
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)



671013



96



09 2021



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.....	10
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
7.	Avisos e Precauções	12
8.	Procedimento	13
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	15
8.3	Preparação da Reação	16
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	17
9.1	Definições	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	18
9.4	Iniciar o PCR em tempo real	18
10.	Análise de Dados	19
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	19
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	19
10.2	Interpretação dos Resultados	20
10.2.1	Análise Qualitativa	20

11.	Avaliação do Desempenho.....	20
11.1	Sensibilidade Analítica	20
11.2	Especificidade Analítica	21
11.2.1	Reatividade cruzada	22
11.2.2	Inclusividade	23
11.3	Precisão	23
11.4	Avaliação de Diagnóstico	25
12.	Limitações	26
13.	Controlo de Qualidade.....	27
14.	Apoio Técnico	27
15.	Bibliografia	27
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	28
17.	Explicação de Símbolos.....	29

1. Utilização Prevista

O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico de vírus da febre-amarela.

2. Componentes do Kit

Tabela 1: 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

* Para ser utilizado como Controlo Negativo

Internal Control = Controlo Interno

Positive Control = Controlo Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da 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 após a chegada.

- 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 2 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)
- 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**i**

É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

O vírus da febre-amarela (YFV) é o protótipo do género *Flavivirus*, que abrange cerca de 70 vírus diferentes transmitidos por artrópodes [1]. O genoma do YFV é a codificação de um genoma ARN de cadeia simples e sentido positivo de 11kb para uma poliproteína, sendo pós e co-translacionalmente processada em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais [2,3]. A febre-amarela é endémica em regiões tropicais de África e da América do Sul [1].

Podem ser distinguidas três formas de febre-amarela: 1) febre-amarela urbana, na qual o vírus é propagado entre pessoas através de mosquitos *Aedes aegypti* peri-domésticos, 2) febre-amarela intermédia causada pelo YFV, sendo transmitida a macacos e humanos através de mosquitos semidomésticos e 3) febre-amarela da selva (sylvan), na qual o YFV é transmitido a primatas não-humanos e ocasionalmente a humanos, através de mosquitos que procriam em árvores [1,2].

A maioria dos pacientes infetados com YFV desenvolve um quadro ligeiro ou totalmente assintomático. Nas pessoas que apresentem sintomas, o período de incubação é, normalmente, de 3-6 dias. Os sintomas iniciais incluem o surgimento abrupto de febre, arrepios, cefaleias fortes, dores de costas, dores generalizadas no corpo, náuseas e vômitos, fadiga e fraqueza. Após uma breve remissão dos sintomas, com uma duração que pode ir de algumas horas a um dia, aproximadamente 15 % dos infetados desenvolvem uma forma mais grave da doença. Esta forma grave caracteriza-se por febre elevada, icterícia, hemorragia e eventualmente choque e falência multiorgânica [4,5].

Não foram descobertos tratamentos específicos que beneficiem pacientes com febre-amarela, sendo apenas administrados cuidados de suporte no tratamento da desidratação, falha respiratória e febre [1,4,6].

Atualmente, todas as vacinas para a febre-amarela disponíveis no mercado são vacinas vivas atenuadas da estirpe 17D, proporcionando uma resposta imune adaptativa rápida, duradoura e excepcionalmente forte [4,5].

É difícil o diagnóstico clínico da febre-amarela, tendo em conta as semelhanças de sintomas com uma ampla gama de doenças, incluindo dengue, outras doenças hemorrágicas virais, leptospirose, hepatite viral e malária, tornando essencial uma confirmação em laboratório [2].

- [1] Monath, Thomas P., and Pedro F.c. Vasconcelos. "Yellow fever." *Journal of Clinical Virology*, vol. 64, 2015, pp. 160–173., doi:10.1016/j.jcv.2014.08.030.
- [2] Domingo, C., et al. "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 12, Oct. 2012, pp. 4054–4060., doi:10.1128/jcm.01799-12.
- [3] Volk, D.e., et al. "Yellow Fever Envelope Protein Domain III NMR Structure (S288-K398)." Oct. 2008, doi:10.2210/pdb2jqm/pdb.
- [4] Monath, Thomas P, and Alan D.t Barrett. "Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever." *Advances in Virus Research*, 2003, pp. 343–395., doi:10.1016/s0065-3527(03)60009-6
- [5] Deubel, Vincent, et al. "Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-Vaccinated fatal human case." *Journal of Medical Virology*, vol. 53, no. 3, 1997, pp. 212–217., doi:10.1002/(sici)1096-9071(199711)53:3<212::aid-jmv5>3.0.co;2-b.
- [6] Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO) "Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection" February 2018

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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico de vírus da febre-amarela.

Este kit foi desenvolvido para a deteção de todas as estirpes de vírus da febre-amarela descritas, incluindo a estirpe 17D da vacina.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga [Internal Control (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 transcríptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com reporter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ARN do YFV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Internal Control (IC) (controlo interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

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

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

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

O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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

* Para ser utilizado como Controlo Negativo

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 YFV e do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

7. Avisos e Precauções

Leia cuidadosamente as instruções de utilização antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes quanto a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado 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 sempre tratadas como sendo infecciosas e/ou com risco biológico, em conformidade com 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. A ordem das tarefas no laboratório deve ser 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 os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- 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 autoclave os 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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

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)

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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 deve 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 1 minuto a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, antes da eluição do ácido nucleico.

Evite ciclos de descongelar-congelar sempre que possível.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.

ATENÇÃO



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 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

- ▶ Pipette 20 µl of the Master Mix into each required well of an appropriate optical 96-well reaction plate or an appropriate optical reaction tube.
- ▶ 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
Amostra ou Controlo	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um Controlo Positivo e um Controlo Negativo [Água (PCR grade) incluída no kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0] por processamento.

- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrifugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

Após a conclusão da configuração PCR, a mistura PCR na placa de reação com 96 poços selada/tubo de reação ótico fechado está estável entre +20 °C e +25 °C durante um máximo de 30 minutos.

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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- ▶ Programe o instrumento com 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 YFV	YFV	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (IC) (controle 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

9.4 Iniciar o PCR em tempo real

Coloque a placa de reação com 96 poços/tubos de reação óticos no instrumento PCR em tempo real e inicie o processamento PCR em tempo real de acordo com o manual do utilizador do respetivo instrumento.

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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

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

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo	+	+/-*
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™	JOE™	
+	+*	Foi detetado ARN específico do YFV.
-	+	Não foi detetado ARN específico de YFV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico de YFV.
-	-	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™. Uma carga elevada de ARN do YFV na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Internal Control (controlo interno).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando uma transcrição *in vitro* específica do vírus da febre-amarela.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 é definida como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ARN específico do YFV que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95 %. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluições de ARN específico de YFV.

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

Conc. de Entrada [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,600	24	24	100
10,000	24	24	100
3,160	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	87,5
0,100	24	9	37,5
0,032	24	4	16,7
0,010	24	2	8,3
0,003	24	0	0

A sensibilidade analítica do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 foi determinada por análise de probit:

- Para a deteção de ARN específico de YFV, a sensibilidade analítica é de 0,69 cópias/ μ l [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 0,41 - 1,56 cópias/ μ l]

11.2 Especificidade Analítica

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

11.2.1 Reatividade cruzada

A especificidade analítica do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogénicos que não o YFV foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de vírus relacionados com o YFV e outros agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes. O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogénicos:

- Vírus Chikungunya
- Vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo
- Vírus da Dengue, serotipo 1
- Vírus da Dengue, serotipo 4
- Vírus Ébola
- Vírus da Hepatite C
- Vírus da encefalite japonesa
- Vírus de Lassa
- Vírus de Marburg
- Vírus da encefalite de Murray Valley
- *Plasmodium falciparum*
- Vírus do Nilo Ocidental
- Vírus Zika

Além disso, a especificidade analítica do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada para a OMS pelo Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases (Fort Collins, Colorado, EUA). O CDC dos EUA é um centro de colaboração da OMS para referência e investigação de vírus transmitidos por artrópodes. A avaliação foi realizada de acordo com o “WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays” (Protocolo da OMS para a avaliação laboratorial de ensaios de ácido nucleico da febre-amarela). O kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogénicos:

- Vírus Chikungunya
- Vírus da Dengue, serotipos 1-4
- Vírus Ébola
- HIV
- Influenza A (H1N1)
- Vírus da encefalite japonesa
- Vírus de Lassa
- Vírus de Marburg
- Vírus do sarampo
- Vírus Powassan
- Vírus do Nilo Ocidental
- Vírus Zika

11.2.2 Inclusividade

A inclusividade do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada para a OMS pelo Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases (Fort Collins, Colorado, EUA). O CDC dos EUA é um centro de colaboração da OMS para referência e investigação de vírus transmitidos por artrópodes. A avaliação laboratorial foi realizada de acordo com o “WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays” (Protocolo da OMS para a avaliação laboratorial de ensaios de ácido nucleico da febre-amarela). Todas as estirpes de YFV testadas (para pormenores, consulte a Tabela 3) foram detetadas pelo kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Tabela 3: Estirpes testadas pelo CDC/OMS para a inclusividade

Estirpe de YFV	Localização	Ano
Vacina 17D-204	N/A	N/A
Asibi	Gana	1927
14FA	Angola	1971
614819	Panamá	1974
BA-55	Nigéria	1986
BC-7914	Quênia	1993
FMD-1240	Perú	2007
CAREC M2-09	Trindade	2009
InHRR 10a-10	Venezuela	2010

11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 através do desvio padrão e 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 4: Dados de precisão para a detecção de ARN específico de YFV (conc. aprox. 50 x LDD)

YFV	Ciclo Limiar Médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	32,72	0,14	0,41
Variabilidade Interensaio	32,39	0,22	0,68
Variabilidade Entre Lotes	32,46	0,29	0,91
Variabilidade Total	32,50	0,25	0,77

Tabela 5: Dados de precisão para a detecção de ARN específico de YFV (conc. aprox. 3 x LDD)

YFV	Ciclo Limiar Médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	36,25	0,58	1,60
Variabilidade Interensaio	36,19	0,33	0,91
Variabilidade Entre Lotes	36,16	0,42	1,16
Variabilidade Total	36,21	0,41	1,14

Tabela 6: 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	29,44	0,07	0,23
Variabilidade Interensaio	29,66	0,30	1,02
Variabilidade Entre Lotes	29,40	0,07	0,23
Variabilidade Total	29,58	0,27	0,91

11.4 Avaliação de Diagnóstico

Ácidos nucleicos extraídos de amostras de soro de 30 doentes com infecção por YFV confirmada foram testados em paralelo com o kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 e o ensaio RT-PCR em tempo real in-house do YFV (com base em Domingo et al., 2012) pelo Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Brasil. Além disso, foram testadas 15 amostras de soro individuais de pessoas não infetadas com o YFV.

De 30 amostras positivas de YFV confirmadas, todas elas (30) testaram positivo ao ARN do YFV com a referência (isto é, o ensaio RT-PCR em tempo real in-house do YFV com base em Domingo et al., 2012) e o kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Das 15 amostras negativas de YFV, todas elas (15) testaram negativo ao ARN do YFV com a referência. Utilizando o kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0, 14 amostras testaram negativo ao ARN do YFV e uma amostra testou positivo.

Tabela 7: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do YFV em amostras de soro

		Ensaio RT-PCR em tempo real do YFV (com base em Domingo et al., 2012)	
		+	-
RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0	+	30	1
	-	0	14

Concluindo, em relação aos resultados obtidos com o ensaio RT-PCR em tempo real in-house do YFV (com base em Domingo et al., 2012), a sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 para a detecção do YFV é de 100 % e 93,3 %, respectivamente.

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para obter 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 YFV 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 de diagnóstico, os resultados do kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene); FAM™ (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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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.

© 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
	Cuidado
	Nota
	Versão

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

