

Instruções de uso

RealStar[®]

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

01/2017 PT

RealStar®

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

Para utilização com

m2000rt (Abbott Diagnostics)

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



163013

96

01 2017

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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	6
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto	9
6.1	Instrumento de PCR em tempo real	10
6.2	Primers e sondas	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
10.	Análise de Dados	19
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido	19
10.1.2	Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido	20
10.2	Interpretação dos Resultados	20
10.2.1	Análise Qualitativa	20

11.	Avaliação do Desempenho	22
11.1	Sensibilidade Analítica	22
11.1.1	Análise Probit	22
11.2	Especificidade Analítica	23
11.2.1	Estirpes de Influenza	23
11.2.2	Sensibilidade Clínica	26
12.	Limitações	27
13.	Controlo de Qualidade	28
14.	Apoio Técnico	28
15.	Bibliografia	28
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	29
17.	Explicação de Símbolos	30

1. Utilização Prevista

O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ARN específico do vírus da gripe A, vírus da gripe B e vírus da gripe A H1N1_{nv}.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	120
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control H1N1 _{nv}	1	250
Laranja	Positive Control Influenza A	1	250
Amarelo	Positive Control Influenza B	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 RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 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
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Esfregaços adequados para a recolha de amostras
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



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



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, referida comumente como gripe, é uma doença infecciosa causada por vírus ARN da família *Orthomyxoviridae* (vírus da influenza). Os vírus da influenza são caracterizados pela alteração contínua dos seus principais antigénios de superfície, hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) (variação antigénica). Estes infetam aves e mamíferos através dos aerossóis. Os vírus humanos da gripe A e gripe B causam infeções graves predominantemente no trato respiratório, sendo a febre e a tosse os sintomas mais frequentes. Em casos mais sérios, a influenza pode causar pneumonia, a qual pode ser fatal, particularmente para crianças e idosos.

Em abril de 2009, evoluiu uma nova estirpe de influenza que combina genes estirpes de influenza de humanos, porcos e aves. Emergiu no México, Estados Unidos e vários outros países a nível mundial e, inicialmente, era denominada "gripe suína". Hoje, estas estirpe são denominadas estirpes de gripe A H1N1_{nv}.

Os conjuntos de sondas/primer utilizados no RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 para a deteção das estirpes de gripe A humana e gripe B humana sazonais e são baseadas no gene da proteína da matriz do genoma da gripe como região alvo.

O conjunto de sonda/primer para a deteção das estirpes de gripe A H1N1_{nv} é baseado num alinhamento múltiplo de todas as estirpes de gripe suína conhecidas, em combinação com todas as sequências conhecidas dos "novos" isolados de H1N1 pandémicos.

NOTA



Devido à formação molecular relativamente rápida e aos vírus ARN, existe um risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de a acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa e diferenciação do ARN específico do vírus da gripe A, vírus da gripe B e 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 para o ARN do gripe A estão marcadas com o fluoróforo Cy[®]5, as sondas específicas para o ARN do gripe B estão marcadas com o fluoróforo ROX[™] e as sondas específicas para o ARN do gripe A H1N1_{nv} estão marcadas com o fluoróforo FAM[™]. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE[™].

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico do gripe A, gripe B e gripe A H1N1_{nv}, assim como a deteção do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

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

O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Três Controlos Positivos:
 - Controlo Positivo gripe A
 - Controlo Positivo gripe B
 - Controlo Positivo gripe A H1N1_{nv}
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, primers e sondas) necessários para permitir a transcríptase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do gripe A, gripe B e gripe A H1N1_{nv}, assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Primers e sondas

Os primers e sondas específicos para as estirpes de H1N1_{nv} e o gripe A humano sazonal utilizados no RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 foram concebidos pelo Prof. Dr. Christian Drosten, Instituto de Virologia, Universidade de Bonn, Alemanha. As sequências destes primers e sondas estão listados na seguinte tabela:

Tabela 1: O primer e sondas utilizados para a deteção e amplificação específica das estirpes do H1N1_{nv} e gripe A

Sequência Alvo	5'- 3'	Oligo
Matriz	AGAGACTTGAAGATGTATTTGCTGGGAAGAT	Sonda 1
Matriz	TCCTGCAAAGACACTTTCCAGT	Sonda 2
Matriz	CAGGCCCCCTCAAAGC	Primer 1
Matriz	CGTCAGGCCTCCTCAAAGC	Primer 2
Matriz	ATTCCATGAGAGCCTCAAGATC	Primer 3

Os primers e sondas estão a visar a mesma região dentro do gene da matriz do gripe A e gripe A H1N1_{nv}. Mas as sondas com marcações diferentes competem entre si. Na presença de um ARN específico do gripe A, a sonda marcada com um fluoróforo que apresente característica semelhantes como o Cy®5 irá ligar, ao passo que na presença do ARN específico do gripe A H1N1_{nv} a sonda marcada com FAM™ irá ligar.

Por conseguinte, apesar do facto de que a estirpe do gripe A H1N1_{nv} também pertence ao grupo de vírus gripe A, as amostras positivas do gripe A H1N1_{nv} existirá apenas um sinal no canal FAM™, mas não no canal Cy®5. Ao passo que com as amostras positivas do gripe A humano sazonal existirá apenas um sinal no canal Cy®5, mas não no canal FAM™.

7. Avisos e Precauções

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

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata daboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área daboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

A qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

Para obter a sensibilidade mais elevada, o ARN deve ser eluído utilizando 30 µl de tampão de eluição pré-aquecido (~70 °C).

ATENÇÃO



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



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

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

8.2 Preparação da Master Mix

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

O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Controlo Interno (Internal Control)	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	16 µl	192 µl

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.

- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Volume da Master Mix	15 µl	180 µl

ATENÇÃO

Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno



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

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 15 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 do controlo (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	15 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	25 µl

- ▶ Certifique-se de que são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos um controlo negativo 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 centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 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	25 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	Cy [®] 5	(Nenhum)
ARN específico do gripe B	gripe B	ROX™	(Nenhum)
ARN específico do gripe A H1N1 _{nv}	gripe A H1N1 _{nv}	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno	Controlo Interno	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	50	10:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	00:45
			-	72	00:15

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 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

Para que um processamento de teste de diagnóstico seja **válido**, devem existir as seguintes condições de controlo:

ID do Controlo	Canal de Detecção			
	Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™
Controlo Positivo gripe A	+	-	-	+/-*
Controlo Positivo gripe B	-	+	-	+/-*
Controlo Positivo gripe A H1N1 _{nv}	-	-	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não estiver presente.

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção				Interpretação de Resultados
Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™	
+	-	-	+*	Foi detetado o ARN específico do gripe A.
-	+	-	+*	Foi detetado o ARN específico do gripe B.
-	-	+	+*	Foi detetado o ARN específico do gripe A H1N1 _{nv} ^{1,2}
-	-	-	+	Não foi detetado o ARN específico do gripe A nem do gripe B ou do gripe A H1N1 _{nv} . A amostra não contém quantidades detetáveis destes ARN específicos.
-	-	-	-	RT-PCR Inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo Interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados Positivos no canal de deteção Cy[®]5, ROX™ ou FAM™. Uma carga elevada de ARN alvo na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno (Internal control).

¹ As estirpes de H1N1_{nv} pertencem ao grupo do vírus da gripe A. No entanto, devido à conceção do ensaio, as amostras positivas do H1N1_{nv} geram um sinal Positivo apenas no canal FAM™, mas não no canal Cy[®]5.

² A estirpe influenza A / Parana / 720/2015 (H1N2v) será tipificada como influenza A H1N1nv, uma vez que contém a mesma sequência alvo do gene da matriz.

NOTA



Apesar do facto de que as estirpes do H1N1_{nv} pertencem ao grupo do vírus da gripe A No entanto, devido à conceção do ensaio, as amostras positivas do H1N1_{nv} geram um sinal positivo apenas no canal FAM™, mas não no canal Cy[®]5.



As amostras positivas da gripe A geram um sinal positivo apenas no canal Cy[®]5, mas não no canal FAM™.

Para obter mais detalhes relativamente à interpretação dos resultados, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

11. Avaliação do Desempenho

11.1 Sensibilidade Analítica

Para avaliar a sensibilidade analítica, foram utilizadas diluições decuplicadas em série de vírus de gripe A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N1_{nv} quantificados por placas e vírus gripe B quantificados por FFU.

Tabela 2: Análise da taxa de positividade para diferentes estirpes do vírus da gripe

PFU/ml	Gripe A/ H1N1 _{nv}	Gripe A/ H3N2	Gripe A/ H1N1	Gripe B*
10 ⁴	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ³	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ²	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ¹	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ⁰	+/-/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/-
10 ⁻¹	-/-/-/-	+/+/+/-	+/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻²	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻³	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-

* Unidades formadoras de concentração (FFU) em vez de unidades formadoras de placas (PFU).

11.1.1 Análise Probit

- Gripe A/HK/1/68 (H3N2): Limite de detecção (LDD) 95%, 0,3 PFU/ml [95% CI 0,2 - 0,7 PFU/ml]
- Gripe A/HH/09 (H1N1_{nv}): Limite de detecção (LDD) 95%, 0,7 PFU/ml [95% CI 0,5 - 1,8 PFU/ml]
- Gripe A/Texas/91 (H1N1): Limite de detecção (LDD) 95% 1,6 PFU [95% CI 1,1 - 3,8 PFU/ml]
- Gripe B/Brisbane/60/2008: Limite de detecção (LDD) 95%, 1,1 FFU/ml [95% CI 0,5 - 1,8 FFU/ml]

11.2 Especificidade Analítica

11.2.1 Estirpes de Influenza

Estirpe	Subtipo	Inf A	Inf B	H1N1 _{nv}	CI
Influenza A/Anhui/07/290	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Anhui/1/105	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Bangkok/1/79	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Bangkok/80/517	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Brasil/11/78	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Brasil/83/550	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Brisbane/08/100	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Brisbane/10/2007	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Brisbane/59/2007	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Inglaterra/427/88	H3N3	+	-	-	+
Influenza A/Inglaterra/88/654	H3N3	+	-	-	+
Influenza A/Equina/Kentucky/1/81	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Equina/ Kentucky/85/520	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Equina/Miami/63	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Equina/Miami/87/510	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Equina/ Newmarket/1/93	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Equina/ Newmarket/97/596	H3N8	+	-	-	+
Influenza A/Guizhou/54/89	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Guizhou/90/502	H3N2	+	-	-	+

Estirpe	Subtipo	Inf A	Inf B	H1N1 _{nv}	CI
Influenza A/Joanesburgo/33/94	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Joanesburgo/95/516	H1N1	+	-	-	+
Influenza A/Filipinas/2/82	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Filipinas/94/516	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Shangdong/78/516	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Shangdong/9/93	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Turquia/07/112	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Turquia/1/2005	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Uruguai/08/278	H3N3	+	-	-	+
Influenza A/Uruguai/716/2007	H3N3	+	-	-	+
Influenza A/Vietname/05/204	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Vietname/119/04	H5N1	+	-	-	+
Influenza B/Ann Arbor/86/630		-	+	-	+
Influenza B/Florida/08/140		-	+	-	+
Influenza B/Florida/8/2006		-	+	-	+
Influenza B/Harbin/7/94		-	+	-	+
Influenza B/Harbin/97/748		-	+	-	+
Influenza B/Hong Kong/79/568		-	+	-	+
Influenza B/Hong Kong/8/73		-	+	-	+
Influenza B/Malásia/08/184		-	+	-	+
Influenza B/Malásia/2506/2004		-	+	-	+
Influenza B/Noruega/1/84		-	+	-	+
Influenza B/Noruega/84/542		-	+	-	+

Estirpe	Subtipo	Inf A	Inf B	H1N1 _{nv}	CI
Influenza B/Brisbane/60/2008		-	+	-	+
Influenza A/Brisbane/10/2007	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Brisbane/59/2007	H3N2	+	-	-	+
Influenza A/Galinhas/Alemanha R3294/2007	H5N1	+	-	-	+
Influenza A/Hamburgo/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Influenza A/Baviera/63/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Influenza A/Califórnia 2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+

11.2.1.1 Substâncias interferentes

Tabela 3: Resultados do teste de amostras contendo diferentes substâncias potencialmente interferentes

Substâncias Potencialmente Interferentes	Resultado 30 pfu/ml (H1N1nv estirpe HH)	Resultado 3 pfu/ml (H1N1nv estirpe HH)
Mucin (10%, bovino)	+	+
Sangue (sangue EDTA)	+	+
ADN genómico humano (2µg/PCR)	+	+
Esfregaços (5 fabricantes)	+	+
Meio de transporte viral (3 fabricantes)	+	+
Esfregaço bacteriológico com geleia de ágar	-	-

11.2.2 Sensibilidade Clínica

Ainda não foi realizado um estudo prospetivo para determinação da sensibilidade clínica uma vez que não existe ainda qualquer ensaio aprovado para comparação. Pelo contrário, uma amostra foi definida como positiva para influenza H1N1_{nv} se pelo menos um resultado PCR em tempo real "interno" se encontrava disponível com indícios adicionais de positividade (sequenciação, teste antígeno ou cultura viral). Estas amostras são designadas como "positivas pré-testadas" e "negativas pré-testadas", respetivamente. Estas amostras foram testadas novamente com o RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

Tabela 4: Resultados da avaliação de diagnóstico

		RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 H1N1 _{nv}	
		+	-
Pré-teste	+	141	5
	-	4	89

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.

- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma gripe A H1N1_{nv}, gripe A e/ou gripe Babrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.
- Alguns estirpes raras do vírus da gripe B (por ex. estirpe ao nível da LEE ou recombinantes da mesma) transportam uma mutação específica e por esta razão são detetadas com uma sensibilidade ligeiramente inferior em comparação com as estirpes do vírus da gripe B que não transportam esta mutação.
- A estirpe influenza A / Parana / 720/2015 (H1N2v) será tipificada como influenza A H1N1nv, uma vez que contém a mesma sequência alvo do gene da matriz.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Bibliografia

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

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

Resende P, Born P, Matos A, Motta F, Caetano B, Debur M, et al. Whole-Genome Characterization of a Novel Human Influenza A(H1N2) Virus Variant, Brazil. Emerg Infect Dis. 2017;23(1):152-154).

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.



O RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 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.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

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

