

Instruções de uso

RealStar[®] MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

01/2017 PT

RealStar®

MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

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)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



391012



48



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.....	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	19
10.2 Interpretação dos Resultados	20
10.2.1 Análise Qualitativa	20

11. Avaliação do Desempenho.....	21
11.1 Sensibilidade Analítica	21
11.2 Especificidade Analítica	22
11.3 Precisão	23
11.4 Avaliação Diagnóstica	25
12. Limitações	27
13. Controlo de Qualidade.....	28
14. Apoio Técnico	28
15. Bibliografia	28
16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	29
17. Explicação de Símbolos	30

1. Utilização Prevista

O RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa do ARN específico do Síndrome respiratória do Médio Oriente provocada pelo coronavírus (MERS-CoV).

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A Target <i>orf1a</i>	4	60
Violeta	Master B Target <i>orf1a</i>	4	120
Azul	Master A Target <i>upE</i>	4	60
Violeta	Master B Target <i>upE</i>	4	120
Vermelho	Positive Control	1	250
Verde	Internal Control	1	1000
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Controle interno

Positive Control = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® MERS-CoV 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 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)
- 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

Em 2012 *Síndrome Respiratória do Médio Oriente provocada pelo coronavírus*, MERS-CoV (anteriormente conhecido como: Centro Médico Erasmus para o coronavírus, HCoV-EMC) foi identificado como primeiro a causar uma doença grave em humanos [1, 2]. A deteção do vírus é preferencialmente efetuada em amostras do trato respiratório inferior. As amostras do trato respiratório superior (esfregaços) apresentaram taxas de deteção de vírus inferiores [3]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de dois ensaios PCR independentes para a confirmação de casos MERS-CoV [4].

Foram publicados vários ensaios RT-PCR em tempo real. Dois ensaios, um a atuar na região a montante do gene E (*upE*) e o outro a atuar sobre a estrutura de leitura aberta 1a (*orf1a*), apresentaram a sensibilidade mais elevada [5,6]. O RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi desenvolvido com base nestes dois ensaios descritos.

- [1] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17:20290.
- [2] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814–20.
- [3] Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet* 2013;381:2265–72.
- [4] OMS. Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2013: http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_Lab_recos_16_Sept_2013.pdf.
- [5] Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17.

- [6] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2012;17.

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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 é um sistema de teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa do ARN específico do Síndrome respiratória do Médio Oriente provocada pelo coronavírus (MERS-CoV).

O RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 consiste em dois ensaios independentes, um a atuar na região a montante do gene E (*upE*) e o outro a atuar sobre a estrutura de leitura aberta 1a (*orf1a*), do genoma MERS-CoV. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de dois ensaios PCR independentes para a confirmação de casos MERS-CoV [5].

Ambos os ensaios incluem 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.

Em ambos os ensaios, as sondas específicas para o ARN do MERS-CoV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o alvo do Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™. A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico do MERS-CoV e do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

Os oligonucleotídeos incluídos nos dois ensaios foram anteriormente publicados por Victor Corman et al. 2012a [6] e 2012 b [7]. Um ensaio RT-PCR visa o *orf1a* (Master A com caps azuis, Master B correspondente com caps roxas) e o outro visa a região a montante do gene E (*upE*) (Master A com caps azuis, Master B correspondente com caps roxas).

Em seguimento da definição de caso da OMS (<http://www.who.int/>), a confirmação laboratorial exige dois resultados da RT-PCR positivos em alvos independentes. Através de testes em paralelo das amostras com o ensaio do *upE* e *orf1a*, os quais são ambos incluídos no RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0, os requisitos da OMS para a confirmação laboratorial de caso MERS-CoV podem ser cumpridos.

Devido à formação molecular e à possível evolução do MERS-CoV, existe o risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos. Ao incluir dois ensaios que visam duas regiões diferentes do genoma, o risco é significativamente reduzido. No caso de que apenas um dos dois ensaios incluídos no kit apresente um resultado positivo, a amostra deve ser testada novamente. **Além disso, as amostras positivas devem ser enviadas para o laboratório de referência nacional para testes de confirmação.**

No entanto, no caso de as estirpes em circulação evoluírem e acumularem mutações poderá ser necessária uma atualização das definições do primer ou da sonda.

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

- Transcristase 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 RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

- Quatro reagentes master
 - (Master A e Master B visam o *orf1a*)
 - (Master A e Master B visam o *upE*)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcristase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do MERS-CoV e do Controlo interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 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)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

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

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - 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 de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/

deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.

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

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® MERS-CoV 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 de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasympphony® (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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

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

ATENÇÃO



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



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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 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 (<i>orf1a</i> ou <i>upE</i>)	5 µl	60 µl
Master B (<i>orf1a</i> ou <i>upE</i>)	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 (<i>orf1a</i> ou <i>upE</i>)	5 µl	60 µl
Master B (<i>orf1a</i> ou <i>upE</i>)	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 dos controlos (controlo positivo ou negativo).

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

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo e 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® MERS-CoV 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

- ▶ 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 MERS-CoV (<i>orf1a</i>)	<i>orf1a</i>	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do MERS-CoV (<i>upE</i>)	<i>upE</i>	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	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	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	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® MERS-CoV 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

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

ID do Controlo	Canal de Detecção			
	FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>
Controlo Positivo	+	+/-*	+	+/-*
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
FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>	
+	+*	+	+*	Foi detetado o ARN específico do <i>orf1a</i> e <i>upE</i> de MERS-CoV. Envie as amostras positivas para o laboratório de referência nacional para testes de confirmação
+	+*	-	+	Foi detetado o ARN específico do <i>upE</i> de MERS-CoV. Não foi detetado o ARN específico do <i>orf1a</i> de MERS-CoV. Repetir testes. Envie a amostra para o laboratório de referência nacional para testes de confirmação.
-	+	+	+*	Foi detetado o ARN específico do <i>orf1a</i> de MERS-CoV. Não foi detetado o ARN específico do <i>upE</i> de MERS-CoV. Repetir testes. Envie a amostra para o laboratório de referência nacional para testes de confirmação.
-	+	-	+	Nenhum foi detetado o ARN específico do <i>upE</i> de MERS-CoV ou do <i>orf1a</i> de MERS-CoV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do MERS-CoV.
-	-	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN do MERS-CoV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno (Internal control).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi efetuada em colaboração com os especialistas do coronavírus do grupo do Prof. Dr. Christian Drosten (Departamento de Virologia, Centro Médico da Universidade de Bonn, Bonn, Alemanha). As amostras dos doentes de um caso importado para Munique, Alemanha e o ARN do MERS-CoV extraído da cultura de células, foram utilizados como material positivo caracterizado. Foram utilizadas as transcrições *in vitro* específicas do MERS-CoV *upE* e *orf1a* de concentrações conhecidas para fins quantitativos.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias por µl de eluato) de moléculas de ARN específico do *orf1a* ou *upE* que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de transcrições *in vitro* (TIV) específicas de *orf1a* e *upE* em concentrações conhecidas.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do *orf1a*

Concentração inserida [cópias/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	12	92
0,316	13	7	54
0,100	13	1	8
0,032	13	1	8
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do *upE*

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	13	100
0,316	13	6	46
0,100	13	3	23
0,032	13	0	0
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ARN específico do *orf1a*, a sensibilidade analítica é de 0,93 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,70-1,41 cópias/μl]
- Para a deteção de ARN específico do *upE*, a sensibilidade analítica é de 0,54 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,40-0,97 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® MERS-CoV 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 do MERS-CoV serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de diferentes agentes patogénicos relacionados com MERS-CoV e/ou que podem causar sintomas semelhantes a MERS-CoV.

O RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Coronavírus NL63
- Coronavírus OC43
- Coronavírus 229E
- Coronavírus HKU-1
- Vírus da gripe A H3N2
- Vírus da gripe A H1N1
- Vírus da gripe B
- Enterovírus 71
- Rhinovírus 16
- Vírus parainfluenza 1
- Vírus parainfluenza 2
- Vírus parainfluenza 3
- Vírus parainfluenza 4
- Vírus sincitial respiratório humano A
- Vírus sincitial respiratório humano B
- Metapneumovírus humano A
- Metapneumovírus humano B

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base no ciclo limiar - valores (C_t). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, variabilidade Inter-ensaio e variabilidade Inter-lote.

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção de ARN específico do *orf1a* e do *upE*

<i>orf1a</i> e <i>upE</i>		Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	<i>orf1a</i>	28,96	0,08	0,29
	<i>upE</i>	29,35	0,08	0,28
Variabilidade Inter-ensaio	<i>orf1a</i>	28,69	0,31	1,08
	<i>upE</i>	29,43	0,12	0,40
Variabilidade Inter-lote	<i>orf1a</i>	28,49	0,14	0,49
	<i>upE</i>	29,14	0,39	1,34
Variabilidade Total	<i>orf1a</i>	28,71	0,18	0,62
	<i>upE</i>	29,31	0,19	0,67

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control)

Controlo Interno (Internal Control)	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	29,39	0,160	0,56
Variabilidade Inter-ensaio	29,80	0,558	1,87
Variabilidade Inter-lote	29,72	0,632	2,13
Variabilidade Total	29,64	0,450	1,52

11.4 Avaliação Diagnóstica

A avaliação de diagnóstico do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 foi realizada no Instituto de Virologia, Centro médico da Universidade de Bona, Bona, Alemanha.

Dezanove amostras diferentes de um doente foram analisadas com ensaios *in house upE* e *orf1a* específicos e os ensaios *upE* e *orf1a* específicos como parte do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0. Entre estes, 8 testaram positivo com os ensaios *in house* e com o RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 7 apresentaram resultados negativos com os ensaios *in house* bem como com o RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 4 apresentaram um resultado com discrepâncias (3 amostras testaram positivo apenas com RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 e 1 testou positivo apenas com os ensaios *in house*). Os resultados discrepantes foram todos gerados com amostras com uma carga viral muito reduzida indicada por um valor C_t elevado, representando mais uma variação estatística no limite da detecção do que uma real diferença na sensibilidade.

Tabela 5: Amostras de doentes testadas com RT-PCR específico MERS-CoV *in house* e RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

Amostra	Dia seguinte início	<i>in house</i> (<i>upE</i>) ¹	RealStar® MERS-CoV (<i>upE</i>) ¹	RealStar® MERS-CoV (<i>orf1a</i>) ¹
Tubo de aspiração, com PBS	16	40,00	40,00	37,74
Tubo de aspiração, peça de filtração	16	35,80	35,00	36,17
BAL	12	34,06	31,82	32,44
BAL	12	34,96	32,67	33,16
BAL	14	35,99	34,60	34,82
BAL	13	-	-	-
Exsudado, boca ²	16	-	36,60	-
Exsudado, boca	16	-	-	-

Amostra	Dia seguinte início	<i>in house</i> (upE) ¹	RealStar® MERS-CoV (upE) ¹	RealStar® MERS-CoV (orf1a) ¹
Exsudado, boca	16	-	-	-
Exsudado, nariz ³	16	38,38	-	-
Exsudado, nariz ²	16	-	40,00	40,00
Exsudado, boca	16	-	-	-
Fezes	12	38,98	31,69	31,78
Fezes	12	39,37	40,00	-
Fezes	16	40,00	40,00	-
Urina ²	12	-	40,00	37,86
Urina (cateter)	12	-	-	-
Urina (cateter)	13	-	-	-
Cateter venoso central, tubo enxaguado	12	-	-	-

¹ os números nas colunas indicam o respetivo C_t dos processamentos positivos RT-PCR em tempo real

² resultado positivo apenas com ensaio comercial

³ resultado positivo apenas com ensaio in house

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 do MERS-CoV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas 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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 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.

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® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 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 do lote
	Cor cap
	Número do produto
	Índice
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	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

