

Instruções de uso

RealStar[®] CMV PCR Kit 1.2

08/2017 PT

RealStar[®]

CMV PCR Kit 1.2

Para utilização com

SmartCycler[®] II (Cepheid)

LightCycler[®] 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)



021212



48



08 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.....	8
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7.	Avisos e Precauções	10
8.	Procedimento	12
8.1	Armazenamento, Transporte e Colheita de Espécimes.....	12
8.2	Preparação de Amostras.....	12
8.3	Preparação da Master Mix.....	13
8.4	Preparação da Reação	15
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1	Definições	16
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
10.	Análise de Dados	17
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	18
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido	18
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	18
10.1.3	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo).....	18
10.1.4	Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo).....	19
10.2	Interpretação dos Resultados	19

10.2.1	Análise Qualitativa	20
10.2.2	Análise Quantitativa	20
11.	Avaliação do Desempenho.....	22
11.1	Sensibilidade Analítica	22
11.1.1	Sensibilidade Analítica excluindo a Extração de Ácido Nucleico	22
11.1.2	Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA	24
11.2	Especificidade Analítica	27
11.3	Faixa Linear	28
11.4	Precisão	30
11.5	Avaliação diagnóstica	31
12.	Limitações	35
13.	Controlo de Qualidade.....	35
14.	Apoio Técnico	36
15.	Bibliografia	36
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	37
17.	Explicação de Símbolos	37

1. Utilização Prevista

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do citomegalovírus (CMV) em plasma humano EDTA.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	4	60
Violeta	Master B	4	120
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	QS1-4*	4	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

* O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 contém Padrões de Quantificação em quatro concentrações diferentes (veja o capítulo 6. Descrição do Produto)

Internal Control (IC) = Controle interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (consulte o capítulo 8.2 Preparação de Amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Minicentrífuga com um rotor para tubos de reação da Cepheid
- Agitador vortex
- Capilares LightCycler® com material de fecho correspondente
- Tubos de reação Cepheid para SmartCycler® II
- 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.

5. Informação de Base

O *cytomegalovirus humano* (CMV) é um membro da família *Herpesviridae* e pertence à subfamília *Betaherpesvirinae*. O vírus consiste num capsídeo icosaédrico que tem um genoma de ADN de cadeia dupla linear de aproximadamente 230 kbp, um tegumento envolvente e invólucro exterior.

O CMV está presente a nível mundial e infeta humanos de todas as idades, sem padrões de transmissão sazonais ou epidémicos. A seroprevalência do CMV aumenta com a idade em todas as populações e varia entre 40 e 100%. Tal como nas infeções com outros vírus do herpes, a primeira infeção com o CMV resulta no estabelecimento de uma infeção persistente e latente. A reativação do vírus pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos, particularmente na imunossupressão. A vasta maioria das infeções por CMV é assintomática ou subclínica, mas as infeções congénitas e as infeções em pacientes imunocomprometidos poderão ser sintomáticas e graves. Em hospedeiros imunocomprometidos, como recetores de transplantes, pessoas infetadas pelo VIH ou doentes de cancro, a infeção por CMV ou reativação da infeção poderá tornar-se numa doença disseminada que os coloca em risco de vida.

6. Descrição do Produto

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção e quantificação do ADN específico do citomegalovírus (CMV) em plasma humano EDTA.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a deteção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ADN do CMV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo Cy®3.

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

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

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplições de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Quatro Padrões de Quantificação (QS1 - QS4)
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ADN específico do CMV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ADN específico do CMV. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados segundo a 1ª norma internacional da OMS para o Human Cytomegalovirus para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162). Os Padrões de Quantificação podem ser utilizados individualmente como controlos positivos ou em conjunto para gerar uma **curva padrão**, a qual pode ser utilizada para a determinação da concentração do ADN específico do CMV na amostra

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

Padrões de quantificação	Concentração [UI/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 foi validado para ser usado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (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 em 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 (ADNase/ARNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- 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.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não abra os capilares/tubos de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- 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 Armazenamento, Transporte e Colheita de Espécimes

A colheita de sangue deve ser executada com sistemas de colheita de sangue com EDTA padrão disponíveis comercialmente (p. ex. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner ou equivalente). Os tubos devem ser misturados imediatamente após a recolha de amostras. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2 a 8 °C). O transporte deverá realizar-se de acordo com as instruções de transporte de material biológico locais e nacionais.

Para a produção de plasma com EDTA, o sangue total com EDTA deve ser centrifugado, no prazo de 24 horas após a colheita, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do sistema de colheita. O plasma com EDTA devem ser armazenados a 2 a 8 °C, não excedendo 14 dias (Abdul-Ali et al. 2011).

8.2 Preparação de Amostras

O ADN extraído do plasma com EDTA humano é o material inicial para o RealStar® CMV PCR Kit 1.2.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo sobre o 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 de extração de ácido nucleico foi validado para uso com RealStar® CMV PCR Kit 1.2:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

De forma a aumentar a sensibilidade do sistema, o protocolo do QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) pode ser modificado de acordo com as especificações listadas na Tabela 4: Adaptações do protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit

(QIAGEN) (ver o capítulo 11.1.2 Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA).

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.

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).

8.3 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® CMV PCR Kit 1.2 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de 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	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 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

ATENÇÃO

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

8.4 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 15 µl da Master Mix para cada capilar LightCycler® necessário ou tubo de reação para SmartCycler® II.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (padrão de quantificação, 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 (QS) e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Para fins de quantificação devem ser utilizados todos os Padrões de Quantificação (QS1 a QS4).
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche os capilares ou tubos, utilizando as tampas adequadas.

- ▶ Centrifugue os capilares LightCycler® ou os tubos de reação do SmartCycler® II utilizando uma centrífuga adequada durante 30 segundos a aproximadamente 400 x g (~ 2000 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® CMV PCR Kit 1.2 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*
Ramp Rate	Predefinição

* O volume de reação deve ser definido como 20 µl, se estiver a utilizar um instrumento LightCycler® 2.0 (Roche).

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- ▶ Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	LightCycler® 1.2/1.5	LightCycler® 2.0	SmartCycler® II
ADN específico do CMV	F1	530	FAM™
Controlo Interno (Internal Control)	F2	610	Cy®3

ATENÇÃO

Para uma análise de dados precisa nos instrumentos LightCycler®, pode ser necessário um ficheiro de compensação de cor específico. Contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter apoio técnico.

ATENÇÃO

Se utilizar o instrumento LightCycler® 2.0, só devem ser ativados os canais de deteção 530 e 610 para a compensação de cor.

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Modo de análise	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Nenhuma	1	-	95	02:00
Amplificação	Quantificação	45	Nenhuma	95	00:05
			Sole	60	00:30
			Nenhuma	72	00:10
Arrefecimento	Nenhuma	1	-	40	00:30

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® CMV PCR Kit 1.2 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

Um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é **válido**, se as seguintes condições de controlo estiverem presentes:

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610
Controlo Positivo (QS)	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal Cy®3/F2/610 não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

Um teste **qualitativo** 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.

10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)

Um **quantitativo** de diagnóstico é **válido**, se existirem todas as condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo válido** [consulte o capítulo 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)]. Os resultados de **quantificação** são **válidos** se a **curva padrão** gerada atinge o valor do parâmetro seguinte:

Parâmetro de Controle	Valor Válido
Declive	-3,00/ -3,74
Eficiência de PCR	85% / 115%
R quadrado (R ²)	> 0,98

NOTA

Nem todos os instrumentos de PCR em tempo real apresentam o valor. Para obter informações detalhadas, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

Um **quantitativo** 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 **quantitativo 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™/F1/530	Cy®3/F2/610	
+	+	Foi detetado o ADN específico do CMV.
-	+	Não foi detetado o ADN específico do CMV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do CMV.
-	-	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 Cy®3/F2/610 para resultados positivos no canal de deteção FAM™/F1/530. Uma carga elevada de ADN do CMV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

Um resultado CMV específico positivo pode ser esperado com uma taxa de positividade de 95%, se a amostra analisada contiver pelo menos 80,71 UI de CMV por ml de plasma com EDTA [95% intervalo de confiança: 44,90 – 230,86 UI/ml].

Como com qualquer teste de diagnóstico, os resultados obtidos com o RealStar® CMV PCR Kit 1.2 devem ser interpretados considerando todos os achados clínicos e laboratoriais.

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para que seja gerada uma **curva padrão** para a análise quantitativa, estes padrões têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (capítulo 6. Descrição do Produto). A utilização de **padrões** concentrações conhecidas permite a geração de uma curva padrão para a análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

C_t = Limiar Ciclo
 m = Declive
 N_0 = Concentração inicial
 b = Impedir

A partir da curva padrão, pode-se quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.

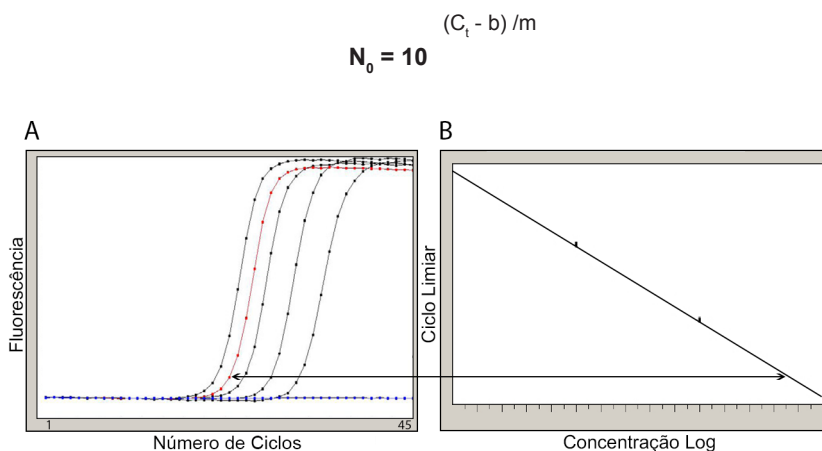


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [A] e uma análise de Curva Padrão [B]

NOTA



A concentração da "Amostra" é apresentada em UI/μl e refere-se à concentração no eluato.

Para determinar a carga **viral da amostra original**, a seguinte fórmula deve ser aplicada:

$$\text{Carga Viral (Amostra) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (Eluém) [\mu l]} \cdot \text{Carga Viral (Eluém) [UI/\mu l]}}{\text{Entrada de amostra [ml]}}$$

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação de desempenho analítico sem um método de extração de ácido nucleico selecionado, foi efetuada utilizando ADN específico do CMV quantificado. A avaliação de desempenho analítico com métodos selecionados de extração de ácido nucleico, foi efetuada utilizando a 1ª norma internacional da OMS para o Citomegalovirus Humano de técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162).

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (Limite de deteção - LDD) RealStar® CMV PCR Kit 1.2 define-se como a concentração de moléculas de ADN no CMV que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada com e sem um método de extração de ácido nucleico selecionado.

11.1.1 Sensibilidade Analítica excluindo a Extração de Ácido Nucleico

Uma série de diluições de CMV de ADN foi preparada a partir de 3,1623 UI/μl até 0,0003 UI/μl nominal e foram analisadas utilizando o RealStar® CMV PCR Kit 1.2 em combinação com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Os testes foram realizados em dois dias com pelo menos oito réplicas por concentração de uma vez. Os resultados foram determinados pela análise probit.

Tabela 1: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

Concentração inserida [UI/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	13	81
0,1000	16	7	44
0,0316	16	3	19
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tabela 2: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica [SmartCycler® II (Cepheid)]

Concentração inserida [UI/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	14	88
0,2081	16	13	81
0,1000	32	8	25
0,0658	16	1	6
0,0316	16	1	6
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tabela 3: A sensibilidade analítica determinada pela análise probit utilizando diferentes instrumentos de PCR em tempo real

Instrumento de PCR em tempo real	Limite de detecção [95%]	Intervalo de confiança [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	0,62 UI/μl	0,35 - 1,75 UI/μl
SmartCycler® II	0,42 UI/μl	0,30 - 0,83 UI/μl

11.1.2 Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA

A sensibilidade analítica deve ter em consideração o método de extração de ácido nucleico selecionado para amostras de plasma com EDTA sendo este determinado utilizando uma série de diluições da 1ª norma internacional da OMS para o Citomegalovirus Humano para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162) variando entre CMV 1000 UI/ml a 0,32 UI/ml nominal em CMV de plasma com EDTA negativo.

Em dois dias, oito alíquotas por concentração foram submetidos de uma vez à extração de ácido nucleico utilizando o QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN). O protocolo do QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) foi adaptado de acordo com a seguinte tabela.

Tabela 4: Adaptações do protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

	QIAGEN Protocol [µl]	Adaptação [µl]
Amostra	200	400
Protease	25	50
Lysisbuffer (AL)	200	400
Etanol ¹ (abs.)	250	500
Tampão de lavagem (AW1)	500	700
Tampão de lavagem (AW2)	500	700
Etanol ² (abs.)	500	700

¹ adicionado ao Amostra/Lysisbuffer misturar

² Lave passo 3

Cada eluato foi analisado utilizando o RealStar® CMV PCR Kit 1.2 em combinação com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Os resultados foram determinados por análise probit.

Tabela 5: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica de amostras de plasma com EDTA [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

Concentração inserida [UI/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	14	88
10,00	16	6	38
3,16	16	5	31
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tabela 6: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica de amostras de plasma com EDTA [SmartCycler® II (Cepheid)]

Concentração inserida [UI/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	12	75
10,00	16	5	31
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tabela 7: Sensibilidade analítica para amostras de plasma com EDTA determinada pela análise probit utilizando diferentes instrumentos de PCR em tempo real

Instrumento de PCR em tempo real	Limite de detecção [95%]	Intervalo de confiança [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	58,52 UI/ml	32,38 - 168,38 UI/ml
SmartCycler® II	80,71 UI/ml	44,90 - 230,86 UI/ml

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 é assegurada pela selecção completa dos oligonucleótidos (iniciadores e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de sequências contra sequências publicamente disponíveis para assegurar que todos os genótipos relevantes de CMV serão detectados.

Mais de cem espécimes de CMV de plasma com EDTA negativo foram analisados com o RealStar® CMV PCR Kit 1.2. Nenhum destes evidenciou um sinal específico CMV positivo, mas todos evidenciaram um sinal IC válido. Além disso, a especificidade do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 foi avaliada através do teste de um painel de ADN/ARN genômico extraído de outros vírus de herpes e outros agentes patogénicos significantes em doentes imunocomprometidos.

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Vírus BK
- Vírus de Epstein Barr
- Vírus da hepatite A
- Vírus da hepatite B
- Vírus da hepatite C
- Vírus Herpes simplex 1
- Vírus Herpes simplex 2
- Herpesvírus humano 6A
- Herpesvírus humano 6B
- Herpesvírus humano 7
- Herpesvírus humano 8
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Parvovírus humano B19
- Vírus JC
- Vírus símios 40
- Vírus varicela-zoster

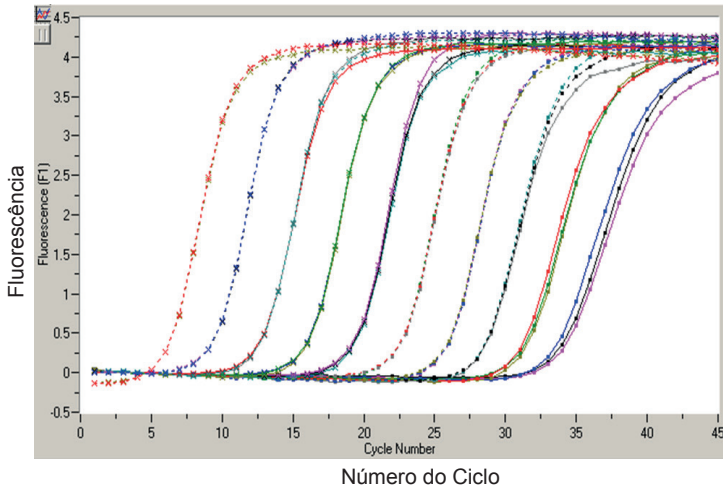
11.3 Faixa Linear

O intervalo linear do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ADN específico do CMV (concentrações que variam de 1,00E+09 - 1,00E+00 UI/µl) usando o seguinte Instrumento de PCR em tempo real:

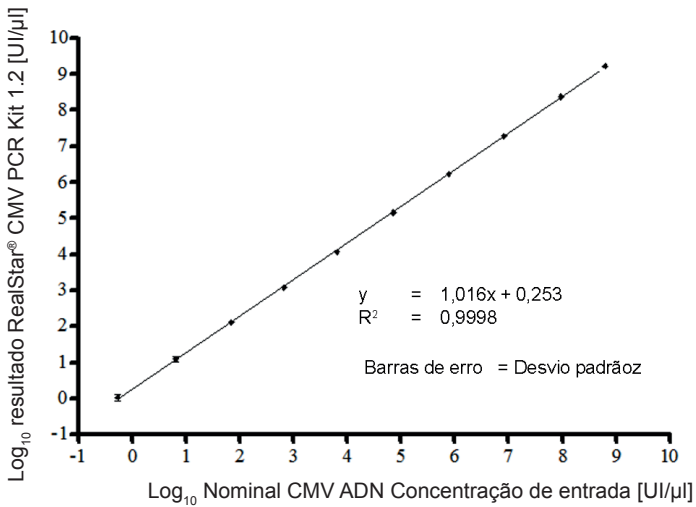
- SmartCycler® II (Cepheid)
- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

Cada concentração foi analisada em quatro replicates per Instrumento de PCR em tempo real.

A



B



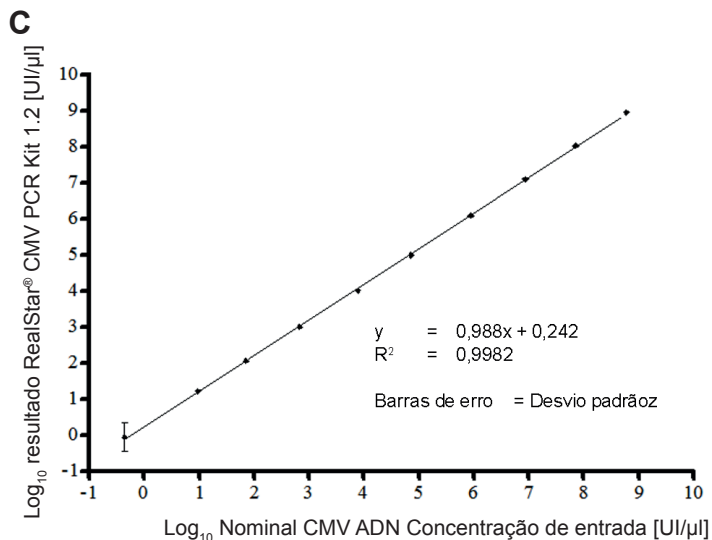


Figura 2: Curvas de amplificação em um LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [A] regressão linear da série de diluições analisada em um LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [B] e em um SmartCycler® II (Cepheid) [C]

O intervalo linear do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 estende-se por um intervalo de pelo menos nove ordens de magnitude, variando de 1,00E+01 - 1,00E+09 UI/μl.

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 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 variação expressam-se quanto ao coeficiente de variação da variação total. Os dados são baseados na análise quantitativa de um controlo positivo elevado (150 UI/μl) e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos de um controlo positivo

reduzido (1.5 UI/μl) e Controlo Interno (IC). Pelo menos oito réplicas por amostra foram analisadas.

Tabela 8: Precisão em termos de Coeficiente de Variação da Variabilidade Total usando diferentes valores de PCR.

Instrumento de PCR em tempo real	Variabilidade Total / Coeficiente de Variação [%]		
	Controle Positivo Alto (HPC)	Controle Positivo Baixo (LPC)	Controle interno
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	11,56	2,13	0,32
SmartCycler® II	8,35	2,71	0,75

11.5 Avaliação diagnóstica

O RealStar® CMV PCR Kit 1.2 foi avaliada em um estudo comparativo com o kit RealStar® CMV PCR 1.0 da CE-IVD marcado (altona Diagnostics).

Os eluatos de 200 amostras de plasma EDTA enviadas para teste de rotina de CMV foram analisados em paralelo com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 numa ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) e com o RealStar® CMV PCR Kit 1.2 com um SmartCycler® II (Cepheid) bem como em um LightCycler® 1.5 Instrument (Roche).

Tabela 9: Resultados da avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica [LightCycler® 1.5 Instrument (Roche)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	5*	117

* Todas as amostras discrepantes tiveram uma concentração de CMV em torno do LoD de ambos os ensaios.

A sensibilidade e especificidade do diagnóstico do kit RealStar® CMV PCR Kit 1.2 numa LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) comparado com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 em um ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) estava 89,7% e 95,9%, respectivamente.

Tabela 10: Resultados da avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica [SmartCycler® II (Cepheid)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	6*	116

* Todas as amostras discrepantes tiveram uma concentração de CMV em torno do LoD de ambos os ensaios.

A sensibilidade e especificidade do diagnóstico da RealStar® CMV PCR Kit 1.2 em um SmartCycler® II (Cepheid) comparado com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 em um ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) estava 89,7% e 95,1%, respectivamente.

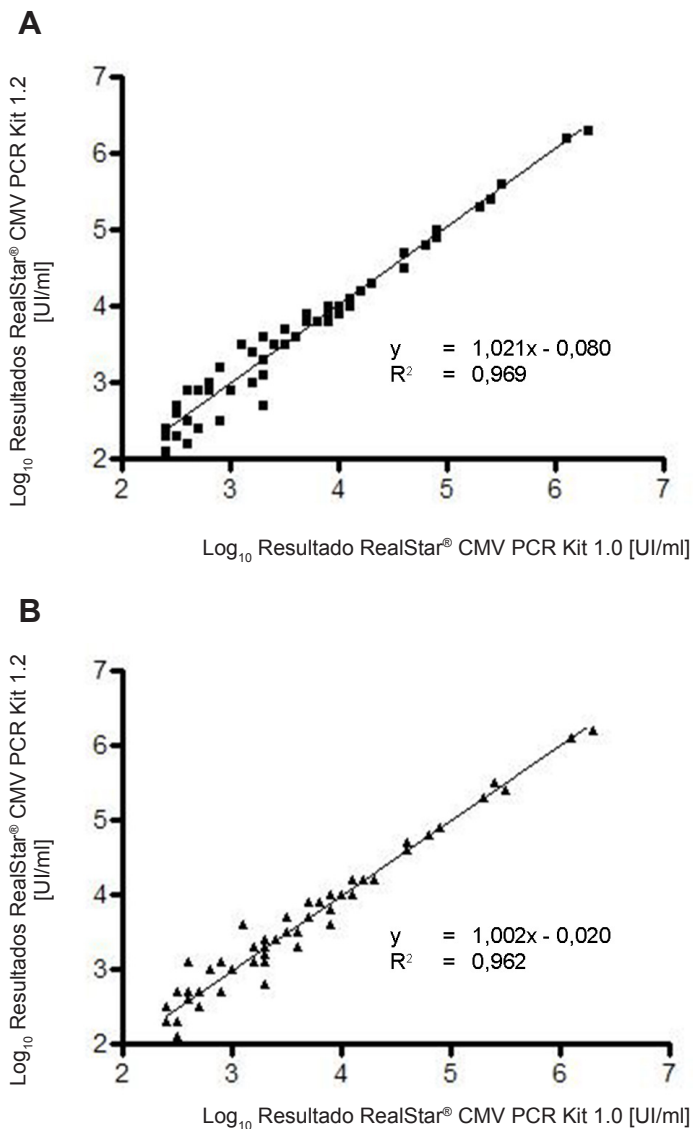


Figura 3: Correlação dos resultados da quantificação do CMV entre os RealStar® CMV PCR Kit 1.2 usado em um LightCycler® 1.5 Instrument (Roche)[**A**] e em um SmartCycler® II (Cepheid) [**B**] e a RealStar® CMV PCR Kit 1.0 usado em um ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) (n=55).

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 PCR (p.e. heparina) pode provocar sub quantificação, falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma CMV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em sub quantificação ou na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® CMV PCR Kit 1.2 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 alta Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® CMV PCR Kit 1.2 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

- [1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.
- [2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.
- [3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.
- [4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.
- [5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); QIAamp®, MinElute® (QIAGEN).

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® CMV PCR Kit 1.2 é um kit de diagnóstico com marcação CE de acordo com a diretiva europeia de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC

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

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Cor cap
	Número do produto
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consult instructions for use
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notes:

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

