

Instruções de uso

RealStar[®] EBV PCR Kit 1.2

11/2017 PT

RealStar[®]

EBV PCR Kit 1.2

Para utilização com

SmartCycler[®] II (Cepheid)

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



131212



48



11 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 | Preparação de Amostras..... | 12 |
| 8.2 | Preparação da Master Mix..... | 13 |
| 8.3 | 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 (qualitativo) | 18 |
| 10.1.2 | Processamento de Teste Inválido (qualitativo)..... | 18 |
| 10.1.3 | Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)..... | 19 |
| 10.1.4 | Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)..... | 19 |
| 10.2 | Interpretação dos Resultados | 20 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 10.2.1 | Análise Qualitativa | 20 |
| 10.2.2 | Análise Quantitativa | 20 |
| 11. | Avaliação do Desempenho..... | 22 |
| 11.1 | Sensibilidade Analítica | 22 |
| 11.2 | Especificidade Analítica | 23 |
| 11.3 | Linear Range..... | 24 |
| 11.4 | Precisão | 25 |
| 12. | Limitações | 26 |
| 13. | Controlo de Qualidade..... | 27 |
| 14. | Apoio Técnico | 27 |
| 15. | Bibliografia | 27 |
| 16. | Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade..... | 28 |
| 17. | Explicação de Símbolos..... | 29 |

1. Utilização Prevista

O RealStar® EBV 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 vírus Epstein-Barr (EBV).

2. Componentes do Kit

| Cor cobertura | Componente | Número de frascos | Volume [µl/tubo] |
|---------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Azul | Master A | 4 | 60 |
| Violeta | Master B | 4 | 180 |
| Verde | Internal Control | 1 | 1000 |
| Vermelho | QS1-4* | 4 | 250 |
| Branco | Water (PCR grade) | 1 | 500 |

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

Internal Control = Controlo Interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® EBV 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 receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.

- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (consulte o capítulo 8.1 Preparação de Amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- 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 vírus *Epstein-Barr* (EBV) é um membro da família *Herpesviridae*. Tem um ADN de 172 kbp de cadeia dupla, que existe na forma linear no virião maduro e na forma circular epissomal em células latentemente infetadas. O EBV infeta principalmente células linfoides do tipo B. O EBV é o único entre os *Herpesviridae* capaz de transformar linfócitos B humanos maduros e percursoros em linhas linfoblastoides. Este vírus é o agente etiológico da mononucleose infecciosa. Quase todas as pessoas são infetadas por este vírus nalgum ponto da sua vida. As infeções na infância são maioritariamente assintomáticas. O EBV tem sido associado a alguns cancros, incluindo o linfoma de Burkitt e o carcinoma nasofaríngeo (NPC). Este vírus está a ser cada vez mais reconhecido como um agente viral relevante em recetores de transplantes.

6. Descrição do Produto

O RealStar® EBV 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 vírus Epstein-Barr (EBV).

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 EBV 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 detecção paralela do ADN específico do EBV e do Controlo Interno nos canais de detecção 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
- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® EBV 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 detecção de alvos do ADN específico do EBV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ADN específico do EBV. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados segundo a 1st norma internacional da OMS para o Epstein-Barr Virus para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/260). 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 EBV na amostra

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

| Padrões de quantificação | Concentração [IU/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® EBV PCR Kit 1.2 foi desenvolvido e validado para utilização 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 (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.
- 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 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® EBV PCR Kit 1.2.

A qualidade do ADN 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® DNA 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® EBV PCR Kit 1.2 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® EBV 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



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 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 ou 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 centrifuga 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® EBV 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 EBV | 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



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:sec] |
|---------------|-----------------|------------------|-----------|------------------|-----------------|
| Desnaturação | Nenhuma | 1 | - | 95 | 02:00 |
| Amplification | Quantificação | 45 | Nenhuma | 95 | 00:05 |
| | | | Single | 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® EBV 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 **quantitativo 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 Controlo | Valor Válido |
|-----------------------|--------------|
| R quadrado (R^2) | ≥ 0.98 |

NOTA



Nem todos os instrumentos de PCR em tempo real apresentam o valor de R quadrado (R^2). 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 EBV. |
| - | + | Não foi detetado o ADN específico do EBV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do EBV. |
| - | - | 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 EBV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® EBV 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.

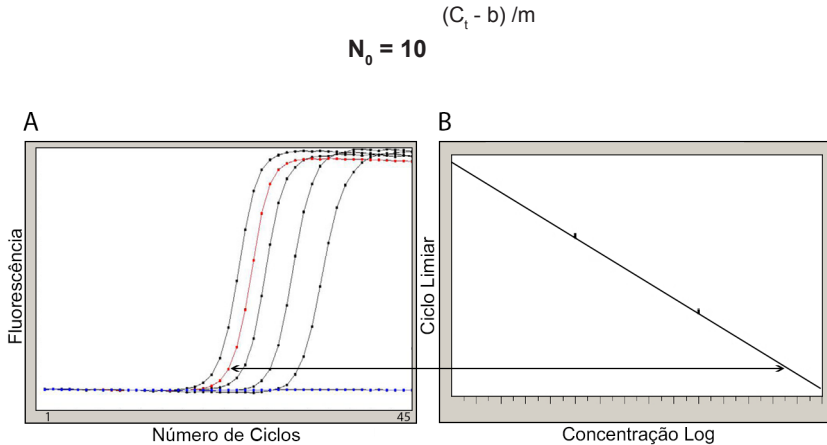


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [Um] e uma análise de Curva Padrão [B]

NOTA



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

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

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 foi efetuada utilizando o ADN específico do EBV quantificado [isolado da EBV estirpe P-3 (ATCC® Número: VR-602)].

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ADN específico do EBV que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ADN quantificado do EBV.

Tabela 1: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do EBV

| Concentração inserida [cópias/μl] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 10.000 | 12 | 12 | 100 |
| 3.162 | 12 | 12 | 100 |
| 1.000 | 12 | 11 | 92 |
| 0.316 | 12 | 6 | 50 |
| 0.100 | 12 | 3 | 25 |
| 0.032 | 12 | 1 | 8 |
| 0.010 | 12 | 1 | 8 |
| 0.003 | 12 | 0 | 0 |
| 0.001 | 12 | 0 | 0 |

A sensibilidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 foi determinada por análise Probit:

- Para a detecção de ADN específico do EBV, a sensibilidade analítica é de 2.231 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 1.024 – 9.180 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 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 vírus Epstein-Barr serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 foi avaliada através do teste a um painel de ADN/ARN genómico extraído de outros vírus de herpes ou outros agentes patogénicos significantes em doentes imunocomprometidos.

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

- Vírus BK
- Cytomegalovirus
- 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 Varicella-Zoster

11.3 Linear Range

O intervalo linear do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ADN específico do EBV (estirpe P-3) utilizando concentrações entre $1.00E+07$ e $1.00E+01$ cópias/ μ l. Cada diluição foi analisada em três réplicas.

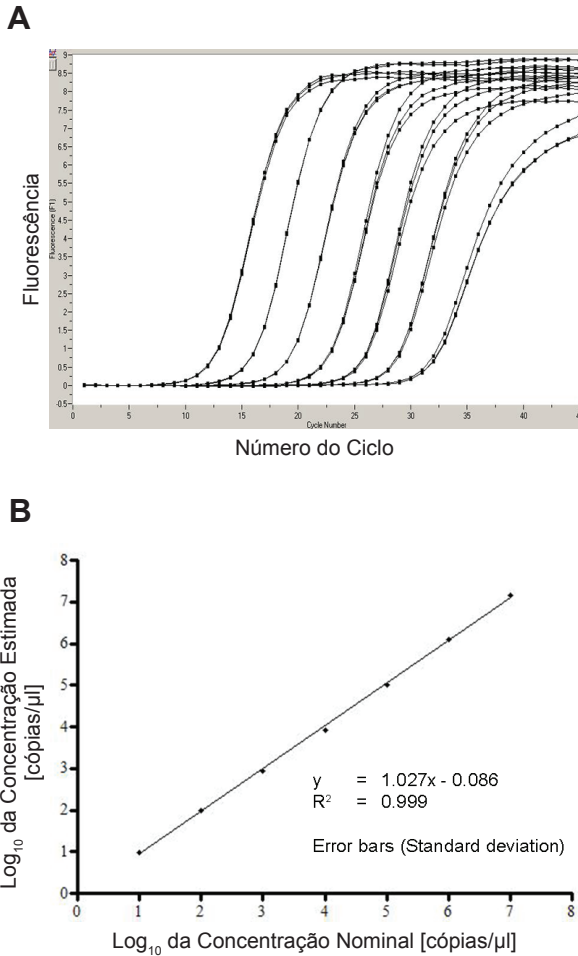


Figura 2: Curvas de amplificação [A] e regressão [B] de uma série de diluições analisadas de ADN específico do EBV

O intervalo linear do RealStar® EBV PCR Kit 1.2 abrange um intervalo de pelo menos **sete** ordens de magnitude.

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® EBV 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 variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação. Estes dados baseiam-se na análise quantitativa de concentrações definidas de ADN específico de EBV e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos de Controlo Interno. Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, Inter-ensaio e Inter-lote.

Tabela 2: Dados de precisão para a deteção de ADN específico do EBV

| EBV | Concentração Média [cópias/ μ l] | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 100.70 | 9.34 | 9.27 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 97.08 | 11.47 | 11.81 |
| Variabilidade Inter-lote | 100.39 | 11.54 | 11.49 |
| Variabilidade Total | 98.08 | 12.15 | 12.39 |

Tabela 3: Dados de precisão para a deteção do Controlo Interno

| Controlo Interno | Ciclo limiar médio (C_t) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 25.28 | 0.04 | 0.15 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 25.37 | 0.08 | 0.29 |
| Variabilidade Inter-lote | 25.29 | 0.03 | 0.13 |
| Variabilidade Total | 25.34 | 0.07 | 0.29 |

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 EBV 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® EBV 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 Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® EBV 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

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); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

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
















O RealStar® EBV PCR Kit 1.2 é a CE-marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 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 |
|  | Version |

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

