

Instruções de uso

RealStar[®]

Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0

03/2019 PT

RealStar[®]

Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0

Para utilização com

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

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

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



642013



2 x 48



03 2019



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	7
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	11
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	13
7.	Avisos e Precauções	13
8.	Procedimento	15
8.1	Preparação de Amostras.....	15
8.2	Preparação da Master Mix.....	16
8.3	Preparação da Reação	18
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	19
9.1	Definições	19
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	19
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	20
10.	Análise de Dados	20
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	21
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	21
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	21
10.2	Interpretação dos Resultados	22
10.2.1	Análise Qualitativa	22
11.	Avaliação do Desempenho.....	23

11.1	Sensibilidade Analítica	23
11.2	Especificidade Analítica	24
11.3	Precisão	26
12.	Limitações	27
13.	Controlo de Qualidade.....	29
14.	Apoio Técnico	29
15.	Bibliografia	29
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	30
17.	Explicação de Símbolos	31

1. Utilização Prevista

O kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro*, baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa e diferenciação do vírus de Lassa (LASV) específico ARNno plasma EDTA humano como auxiliar no diagnóstico de indivíduos com sinais e sintomas de infeção pelo vírus Lassa em conjunto com fatores de risco epidemiológico.

O kit RealStar®Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 destina-se a ser utilizado por pessoal qualificado em laboratórios devidamente equipados que cumprem as diretrizes relativas à biossegurança em laboratório.

2. Componentes do Kit

O kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contém 2 ensaios RT-PCR diferentes com 48 reações cada um. Contém dois Controlos Positivos diferentes: um para o sistema de deteção e para o sistema de amplificação específicos ao gene GPC e outro para deteção e amplificação específicas ao gene L.

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A GPC Gene	4	60
Violeta	Master B GPC Gene	4	180
Azul luz	Master A L Gene	4	60
Violeta luz	Master B L Gene	4	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control GPC Gene	1	250
Laranja	Positive Control L Gene	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

3. Armazenamento

- O RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C 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 (ver capítulo 8.1 Preparação de amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA

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

NOTA

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

5. Informação de Base

O vírus de Lassa (LASV), um membro da família Arenaviridae, constitui um vírus do ARN de cadeia simples com envelope. O LASV é endêmico na África Ocidental, principalmente em países como o Benim, a Serra Leoa, a Guiné, a Libéria e a Nigéria (1). O hospedeiro natural do LASV é o *Mastomys natalensis*, um pequeno roedor endêmico da África subsaariana. Os roedores vivem em grande proximidade dos seres humanos e entram frequentemente nas suas casas em busca de alimento. Este vírus pode ser transmitido por contacto direto ou através de alimentos contaminados (2). A transmissão entre humanos é possível no seio da comunidade bem como em ambiente de administração de cuidados de saúde, através de aerossóis, contacto com fluidos orgânicos contaminados ou reutilização de equipamento médico contaminado (3).

Cerca de 80% de todas as infeções por LASV mantêm-se clinicamente impercetíveis, 1% das infeções resulta em morte (3). O LASV pode provocar febre hemorrágica de Lassa (LHF) que possui uma taxa de mortalidade elevada, chegando a atingir os 15-20% entre os pacientes hospitalizados (4). As taxas de mortalidade entre as mulheres grávidas são ainda mais elevadas, especialmente no primeiro trimestre da gestação (5). A LHF está associada a surtos nosocomiais. Não existem, por enquanto, vacinas para o LASV. No tratamento da LHF, administra-se por via parentérica o medicamento antiviral Ribavirina. A eficácia do tratamento é elevada, se o mesmo for iniciado seis dias após o início dos sintomas, mas diminui

rapidamente à medida que se atrasa a administração (6). As terapêuticas de suporte incluem oxigenação, tratamento de infecções secundárias, equilíbrio apropriado dos fluidos e eletrólitos bem como transfusões, se forem indicadas.

É possível detetar o LASV precocemente após a infecção (7) e durante o período da doença, mas os ensaios serológicos apenas conseguem detetar o vírus após o início dos sintomas (8). A detecção do ARN viral através da utilização de RT-PCR convencional seguida de detecção com gel constitui atualmente o método preferencial para diagnóstico da LHF. A cultura de células requer um confinamento BSL-4, pelo que apenas pode ser efetuada em laboratórios altamente especializados (8). Encontram-se disponíveis vários ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), embora os métodos serológicos não sejam úteis na identificação de casos agudos de LHF. Além disso, os pacientes com casos graves de LHF nem sempre desenvolvem anticorpos (8, 9). As ferramentas de diagnóstico molecular utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real são particularmente adequadas para o diagnóstico molecular de infecções virais uma vez que são rápidas, sensíveis e podem ser aplicadas em espécimes desativados (10, 11), não se encontrando comercialmente disponível, por enquanto, nenhum ensaio de RT-PCR em tempo real que permita a detecção do LASV. A diversidade considerável de sequências entre estirpes do LASV constitui um desafio para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico molecular. A probabilidade de resultados falsos negativos pode ser reduzida utilizando várias sequências genómicas como regiões-alvo, por exemplo, o gene L e o gene GPC.

- [1] O. Ogbu, E. Ajuluchukwu & C.J. Uneke (2007), Lassa fever in West African sub-region: an overview, *J Vect Borne Dis*, 44(1):1-11.
- [2] Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulémou K, Sylla O, Kourouma F, Doré A, Soropogui B, Aniskin V, Allali B, Kouassi Kan S, Lalis A, Koivogui L, Günther S, Denys C, Jan ter Meulen J. (2006), *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa, *Emerg Infect Dis*, 12(12):1971-4.
- [3] Edward H. Stephenson Dr., Edgar W. Larson, Joseph W. Dominik (1984), Effect of environmental factors on aerosol-induced infection, *J Med Virol*, 14(4):295-303.

- [4] McCormick, J. B., P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, and E. S. Smith (1987), A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* 155:437-444.
- [5] Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB (1988), A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* 297:584 –587.
- [6] McCormick JB, Walker DH, King IJ, Webb PA, Elliott LH, Whitfield SG, Johnson KM (1986), Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am J Trop Med Hyg* 35:401–407.
- [7] Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994), Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 32(12):2898-903.
- [8] Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG (2000), Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation, *J Clin Microbiol*, 38(7):2670-7.
- [9] Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB. (1985), Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. *Lancet* i:250 –252.
- [10] Nikisins S, Rieger T, Patel P, Muller R, Gunther S, Niedrig M. (2015), International external quality assessment study for molecular detection of Lassa virus. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003793.
- [11] Zheng Pang, Aqian Li, Jiandong Li, Jing Qu, Chengcheng He, Shuo Zhang, Chuan Li, Quanfu Zhang, Mifang Liang, and Dexin Li (2014), Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses, *PLoS One*, 9(4): e95635.

NOTA



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

6. Descrição do Produto

O kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro*, baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa e diferenciação do vírus de Lassa (LASV) específico ARN no plasma EDTA humano como auxiliar no diagnóstico de indivíduos com sinais e sintomas de infeção pelo vírus Lassa em conjunto com fatores de risco epidemiológico. O kit RealStar®Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 destina-se a ser utilizado por pessoal qualificado em laboratórios devidamente equipados que cumprem as diretrizes relativas à biossegurança em laboratório.

O kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 é composto por dois ensaios, um direcionado para o gene GPC do LASV e o outro direcionado para o gene L do LASV. Estes dois ensaios incluem um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) (Internal Control) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes.

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.

Master Mix GPC Gene: A sonda específica para o gene GPC do LASV está marcada com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Internal Control (IC, controlo interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

Master Mix L Gene: A sonda específica para o gene L do LASV está marcada com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Internal Control (IC, controlo interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associadas a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico ao LASV (seja o gene GPC alvo ou o gene L alvo) assim como a deteção do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

- Transcricção reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno (Internal control)
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno (Internal Control)
- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

- Master A GPC Gene
- Master B GPC Gene
- Master A L Gene
- Master B L Gene
- Internal Control
- Positive Control GPC Gene
- Positive Control L Gene
- Water (PCR grade)

Cada Reagente Principal A e Reagente Principal B contém todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) de modo a permitir a realização de transcrição reversa, amplificação e deteção mediadas por PCR do ARN específico bem como Internal Control (Controlo Interno) numa única preparação de reação.

O conjunto do Reagente Principal A e do Reagente Principal B GPC Gene contém todos os componentes que permitem a amplificação e deteção mediadas por PCR do ARN específico ao gene GPC do vírus de Lassa bem como Internal Control (Controlo Interno) numa única preparação de reação.

O conjunto do Reagente Principal A e do Reagente Principal B L Gene contém todos os componentes que permitem a amplificação e deteção mediadas por PCR do ARN específico ao gene L do vírus de Lassa bem como Internal Control

(Controlo Interno) numa única preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para que ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Avisos e Precauções

Leia 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)
 - Etiquetagem 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*.

- Espécimes clínicos devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivos, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança. Consulte a diretriz dos CDC "Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals" (As diretrizes para o Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals dos CDC, maio de 2005. https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf).
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nucleases (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/detecção. 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. Consulte também as diretrizes dos CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, maio de 2005. https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O tipo de espécime seguinte está validado para uso com o kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0:

- Plasma EDTA humano.

Para orientação em relação ao processamento de amostras, consulte as "Diretrizes nacionais relativas à prevenção e controlo das febres virais hemorrágicas" (National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers, Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), abril de 2017. https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf).

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0.

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

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)

- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- Sistema molecular VERSANT® kPCR 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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.

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 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um RT-PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o CI (IC) **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de espécime/lise. O volume do IC 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 IC por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Volume da Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Se o IC (Internal Control - Controlo interno) tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.

ATENÇÃO

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

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl do 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	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo (Controlo Positivo GPC Gene para a Master Mix GPC Gene e Controlo Positivo L Gene para a Master L Gene) 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- ▶ Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Master Mix	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico ao LASV gen GPC	Gene GPC	LASV	FAM™	(Nenhum)
ARN específico ao LASV gen L	Gene L	LASV	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (control interno)	Gene GPC e Gene L	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Repetições do Ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcristase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	00:45
			-	72	00:15

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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

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

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo (Gene GPC)	+	+/-*
Controlo Positivo (Gene L)	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

Um ensaio de diagnóstico **qualitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
Ensaio específico ao gene GPC		Ensaio específico ao gene L		
FAM™	JOE™	FAM™	JOE™	
+	+*	+**	+*	ARN específico ao LASV detetado.
+	+*	-	+/- ^{***}	ARN específico ao LASV detetado.
-	+/- ^{***}	+**	+*	ARN específico ao LASV detetado.
-	+	-	+	ARN do LASV específico não foi detetado. A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico ao LASV.
-	+	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.
-	-	-	+	Inibição da RT-PCR ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.
-	-	-	-	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 Internal Control (Controlo Interno) no JOE™ canal de deteção para resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN do LASV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (controlo interno).

** As amostras que são altamente positivas para o VCL (vírus da coriomeningite linfocitária) podem dar resultados falsos negativos para o ARN específico ao gene L do LASV.

*** Se for observado um sinal no canal de detecção FAM™ num dos dois ensaios (o ensaio do gene GPC ou o ensaio do gene L), pode considerar-se que a amostra é positiva para o ARN do LASV. É irrelevante se o ensaio que não apresenta um sinal no canal de detecção FAM™ apresentar ou não um sinal no canal JOE™ (CI).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando uma transcrição *in vitro* específica para o gene L e para o gene GPC, respetivamente.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ARN específico do LASV gen GPC que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95 %. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluição de transcrições específicas *in vitro* dos genes GPC e L do vírus Lassa.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à detecção do ARN específico ao Gene L

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	23	23	100
1,000	24	22	91,67
0,316	24	9	37,5
0,032	48	4	8,33
0,010	48	3	6,25
0,003	48	1	2,08

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ARN específico ao Gene GPC

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	13	54,17
0,100	24	5	20,83
0,032	24	1	4,17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção do ARN específico ao gene L, a sensibilidade analítica é de 3,14 cópias/μl [intervalo de confiança (IC) de 95%: 1,67 - 7,60 cópias/μl]
- Para a deteção do ARN específico ao gene GPC, a sensibilidade analítica é de 1,00 cópias/μl [intervalo de confiança (IC) de 95%: 0,64 - 2,12 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 é assegurada pela seleção cuidadosa dos oligonucleótidos (primers e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de sequências em relação a sequências publicamente disponíveis para assegurar a deteção de todos os génotipos de LASV relevantes.

Foi avaliada a especificidade analítica do kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0

analisando um painel de ARN/ADN genómico extraído de agentes patogénicos relacionados com o vírus de Lassa, agentes patogénicos com probabilidade de se encontrarem presentes na mesma matriz de amostra ou agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes aos da infeção pelo vírus de Lassa.

O RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo
- Vírus Chikungunya
- Vírus da Dengue 1
- Vírus da Dengue 2
- Vírus da Dengue 3
- Vírus da Dengue 4
- Vírus Ébola
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Vírus de Marburgo
- Vírus da febre do vale do Rift
- Vírus do Nilo Ocidental
- Vírus da febre-amarela
- Vírus Zika
- *Plasmodium falciparum*

Foi avaliada a especificidade analítica em relação à reatividade do kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 por um painel de ARN genómico extraído de linhagens diferentes do vírus de Lassa (estirpes).

O kit RealStar® Lassa virus RT-PCR Kit 2.0 consegue detetar ARN das seguintes linhagens analisadas para diferentes estirpes:

- Linhagem II (Nig08-04; Nig08-A37)
- Linhagem III (Nig08-A18; Nig-CSF; Nig-SL-NL)
- Linhagem IV (Lib05-4094; BA366; Josiah)
- Linhagem V (AV)

11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 foi determinada para o ensaio específico ao Gene GPC e para o ensaio específico ao Gene L com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade interensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (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 intraensaio, variabilidade interensaio e variabilidade interlote.

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção do ARN específico ao LASV gen L

LASV gen L	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	31,51	0,16	0,51
Variabilidade Inter-Ensaio	30,98	0,16	0,53
Variabilidade Entre Lotes	31,32	0,24	0,76
Variabilidade Total	31,16	0,30	0,97

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção do ARN específico ao LASV gen GPC

LASV gen GPC	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	31,65	0,22	0,70
Variabilidade Inter-Ensaio	32,14	0,18	0,57
Variabilidade Entre Lotes	31,96	0,37	1,16
Variância Total	31,98	0,31	0,96

Tabela 5: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control) utilizando Master Mix gen L

Internal Control	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	32,46	0,16	0,50
Variabilidade Inter-Ensaio	32,24	0,27	0,83
Variabilidade Entre Lotes	32,51	0,13	0,41
Variabilidade Total	32,34	0,27	0,83

Tabela 6: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control) utilizando Master Mix gen GPC

Internal Control (controlo interno)	Média do Ciclo Limiar (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	30,72	0,22	0,71
Variabilidade Inter-Ensaio	30,67	0,17	0,55
Variabilidade Entre Lotes	30,65	0,17	0,54
Variância Total	30,68	0,18	0,59

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 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. Consulte "Guia provisório da OMS (Guia provisório, Organização Mundial da Saúde, 2014, <https://www.who.int/emergencies/diseases/lassa-fever/collection-of-blood-samples-for-lassa.pdf?ua=1>) e as "Diretrizes nacionais relativas à prevenção e controlo das febres virais hemorrágicas" (Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), abril de 2017. https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf).
- 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 de (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou sub falsos negativos em .
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma dos LASV gen GPC abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do

E-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Bibliografia

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

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

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 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.

© altona Diagnostics GmbH 2019 ; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>In vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	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

