

Instruções de Utilização

RealStar[®] WNV RT-PCR Kit 2.0

03/2020 PT

RealStar[®]

WNV 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)



322013



96



03 2020



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.....	8
5.	Informação de Base	9
6.	Descrição do Produto.....	10
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	12
6.2	Tipos de amostras.....	12
7.	Avisos e Precauções	13
8.	Procedimento	15
8.1	Preparação de Amostras.....	15
8.2	Preparação da Master Mix.....	17
8.3	Preparação da Reação	19
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	21
9.1	Definições	21
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	21
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	22
10.	Análise de Dados	22
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	23
10.1.1	Processamento de teste de diagnóstico válido.....	23
10.1.2	Processamento de teste de diagnóstico inválido	23
10.2	Interpretação dos Resultados	23
10.2.1	Análise Qualitativa	24

11.	Avaliação do Desempenho.....	24
11.1	Sensibilidade analítica	24
11.2	Especificidade Analítica	26
11.3	Precisão	27
12.	Limitações	28
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® WNV RT-PCR Kit 2.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico do Vírus do Nilo Ocidental (WNV).

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de tubos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Controlo Interno

Positive Control = Controlo Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

CUIDADO



Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integralidade com respeito ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto com defeitos ou incompleto, pois o desempenho poderá estar comprometido.

3. Armazenamento

- O kit RealStar® WNV 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.

CUIDADO



Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.

CUIDADO



Não exceda a sequência descongelar-congelar e as durações de manuseamento, conforme especificado nestas Instruções de Utilização.

CUIDADO



Não utilize componentes de produtos para além da data de validade indicada na etiqueta do componente.

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
- 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 do Nilo Ocidental* (WNV) é uma espécie de vírus que pertence à família *Flaviviridae*. O genoma de ARN de flavivírus é de cadeia simples e tem uma orientação positiva [(+)ssRNA]. Os genes estão localizados num único segmento de aproximadamente 9-12 kb de comprimento. A extremidade 5' dos genomas contém sequências específicas que se juntam em conformações relativamente estáveis. Estas, assim denominadas, sequências de entrada ribossomal permitem a tradução direta e a síntese de proteína por ribossomas hospedeiros.

O *Vírus do Nilo Ocidental* é transmitido através de vetores artrópodes (diferentes mosquitos do género *Culex*, *Aedes* ou *Ochlerotatus*). Pode infetar uma variedade de diferentes espécies hospedeiras como cavalos, aves e, finalmente, humanos. O vírus foi identificado pela primeira vez em 1937 no Uganda e, desde então, foi continuamente encontrado em aves, cavalos e humanos em África, no Médio Oriente e no Sul da Europa. Em 1999 o vírus alcançou a América do Norte. Um mosquito transmissor do vírus foi provavelmente transportado de Israel para Nova Iorque. Foram registados vários surtos nos EUA desde então.

Na maioria dos casos (70-80 %), a infeção é assintomática em humanos. Em casos sintomáticos de febre podem ser observados outros sinais e sintomas como cefaleia, dores nas articulações, vômitos e outras doenças bastante inespecíficas. Em alguns casos, cerca de 1% de todas as infeções, irão ocorrer complicações neurológicas graves. Estes doentes desenvolvem cefaleias graves, pescoço rígido, coma ou paralisia como consequência. 10% destes doentes irão falecer devido à infeção por WNV.

Não existe tratamento específico disponível para curar infeções por WNV. Pode ser administrada medicação para reduzir a febre e dores e os casos graves irão receber tratamento de apoio e ser hospitalizados.

O vírus pode ser detetado a partir do dia 2-3 até 14-19 dias após a infeção no soro/plasma de doentes. Curiosamente, a deteção do vírus ARN a partir da urina é possível mesmo após este ter desaparecido do sangue.

A serologia é difícil, dado que os anticorpos apresentam reatividade cruzada com outros flavivírus. Podem ser detetadas as IgM e IgG em doentes, 4-8 dias após a deteção do vírus no sangue. O teste serológico mais específico é o teste de neutralização por redução em placas, mas este requer a cultura de vírus e só pode ser realizado por laboratórios especializados.

A deteção do ARN do vírus é efetuada sobretudo para dois fins diferentes. Em primeiro lugar, é realizada a RT-PCR em amostras de casos suspeitos para efetuar o diagnóstico *in vitro*. Aqui, a carga viral é normalmente elevada e o limite de deteção do ensaio é de menor preocupação. Em segundo lugar, em zonas onde o WNV é endémico, a transmissão do vírus ocorreu através da transfusão de sangue. Por conseguinte, deve ser efetuada a despistagem de segurança das dádivas de sangue e, para tal, é necessária uma sensibilidade muito elevada.

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® WNV RT-PCR Kit 2.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico do Vírus do Nilo Ocidental (WNV).

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

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a detecção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ARN de WNV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associadas a colorações distinguíveis permite a detecção paralela de ARN específico de WNV e do Internal Control (Controlo Interno) nos canais de detecção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

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

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

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

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

Internal Control (IC) = Controlo Interno

Positive Control = Controlo Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcrição reversa, a amplificação mediada por PCR e a detecção de ARN específico de WNV e do Internal Control (Controlo Interno) numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para ser usado com os seguintes instrumentos 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)

6.2 Tipos de amostras

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi validado para utilização com o seguinte tipo de amostras:

- Plasma EDTA humano

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi validado utilizando o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) para a extração e purificação de ácido nucleico.

7. Avisos e Precauções

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade com respeito ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto com defeitos ou incompleto, pois o desempenho poderá estar comprometido.
- Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.
- A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.
- Se a amostra apresentar outros agentes patogénicos diferentes do WNV, poderá ocorrer concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas.
- Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.
- A falta de centrifugação dos componentes do produto após o descongelamento pode provocar a contaminação dos componentes com os resíduos de reagente nas tampas e, como consequência, comprometer o desempenho do produto.
- Não exceda a sequência descongelar-congelar e as durações de manuseamento, conforme especificado nestas Instruções de Utilização.
- Não utilize componentes de produtos para além da data de validade indicada na etiqueta do componente.
- O manuseamento incorreto dos componentes do produto e das amostras pode provocar contaminação, causando resultados de exame de IVD incorretos.
 - Não troque as tampas de frascos ou garrafas, para evitar o risco de contaminação cruzada.
 - Para minimizar o risco de contaminação por transferência, armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
 - Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação de amostras/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.

- Use sempre luvas descartáveis.
- Não abra as placas PCR ou os tubos pós-amplificação, para evitar a contaminação com amplicões.
- O armazenamento de eluatos em condições incorretas pode provocar a degradação das sequências alvo do WNV.
- Não exceda o tempo de armazenamento da Mistura PCR. Tal pode comprometer o desempenho do produto.
- As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco biológico, em conformidade com os procedimentos laboratoriais de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.
- Elimine os resíduos perigosos e biológicos apenas em conformidade com os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.
- À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- A existência potencial de mutações nas regiões-alvo do genoma do WNV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- 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.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.

8. Procedimento

CUIDADO



O manuseamento incorreto dos componentes do produto e das amostras pode provocar contaminação, causando resultados de exame de IVD incorretos.

- Não troque as tampas de frascos ou garrafas, para evitar o risco de contaminação cruzada.

- Para minimizar o risco de contaminação por transferência, armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.

- Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação de amostras/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.

- Use sempre luvas descartáveis.

- Não abra as placas PCR ou os tubos pós-amplificação, para evitar a contaminação com amplicões.

8.1 Preparação de Amostras

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

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi validado com plasma EDTA humano utilizando o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico (consulte abaixo). A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 deve ser validada pelo utilizador.

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

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, antes da eluição do ácido nucleico.

Após a conclusão do procedimento de extração, os eluatos na placa de eluato não selada mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (máx. 30 °C) durante 6 horas. Os eluatos numa placa de eluato selada podem ser armazenados a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C até 24 horas antes do início de uma preparação da reação PCR.

CUIDADO



Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.

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.

CUIDADO

As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco biológico, em conformidade com os procedimentos laboratoriais de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.

CUIDADO

A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.

CUIDADO

Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.

CUIDADO

Elimine os resíduos perigosos e biológicos apenas em conformidade com os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.

CUIDADO

O armazenamento de eluatos em condições incorretas pode provocar a degradação das sequências alvo do WNV.

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 kit RealStar® WNV 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Controlo Interno)	1 µl	12 µl
Volume do 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 IC **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume de eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de Elution Buffer (tampão de eluição) ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de 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 (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume do Master Mix	20 µl	240 µl

CUIDADO

A falta de centrifugação dos componentes do produto após o descongelamento pode provocar a contaminação dos componentes com os resíduos de reagente nas tampas e, como consequência, comprometer o desempenho do produto.

NOTA

Se o IC (Internal Control - Controlo Interno) for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo terá de incluir o IC.

NOTA

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 da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (Controlo Positivo ou Negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um Controlo Positivo e um Controlo Negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

Após a conclusão da Preparação da Reação PCR, a Mistura PCR é estável à temperatura ambiente (máx. 30 °C) durante 30 minutos.

CUIDADO



Não exceda o tempo de armazenamento da Mistura PCR. Tal pode comprometer o desempenho do produto.

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® WNV 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	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do WNV	WNV	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (Controlo Interno)	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]
Transcriptase 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 kit RealStar® WNV 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

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

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo	+	+/-*
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 de diagnóstico inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é considerado **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se qualquer uma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não for cumprida.

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

10.2 Interpretação dos Resultados

CUIDADO



À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado ARN específico do WNV.
-	+	Não foi detetado ARN específico de WNV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico de WNV.
-	-	Inibição da RT-PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo Interno no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN de WNV na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Controlo Interno.

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho analítico do kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando o Vírus do Nilo Ocidental (estirpe NY2001-6263) fornecido pela ZeptoMetrix®.

11.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (cópias/ml) de moléculas de ARN específico do WNV que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluições do WNV em plasma EDTA humano. O material do Vírus do Nilo Ocidental (estirpe NY2001-6263) foi fornecido pela ZeptoMetrix®.

Cada diluição foi testada em 8 réplicas em 3 dias diferentes (total n = 24 por diluição) utilizando combinações de 3 lotes de kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0, 3 lotes de kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5 (controle interno). Foram efetuados processamentos utilizando 3 instrumentos diferentes de AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção).

Os dados de todos os processamentos foram combinados e foi realizada uma análise probit para determinar o valor do LDD de 95 %.

Tabela 1: Resultados RT-PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à detecção de ARN específico de WNV

Conc. de Entrada [cópias/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	19	79
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

A sensibilidade analítica do kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi determinada por análise probit:

- Para a detecção de ARN específico do WNV, a sensibilidade analítica é de 258 cópias/ml [intervalo de confiança (IC) de 95 %: 150 - 599 cópias/ml]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® WNV 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 detecção de todos os genótipos de WNV relevantes.

A especificidade analítica do kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogênicos que não o WNV foi avaliada através do teste de vírus relacionados com o WNV, agentes patogênicos que causam sintomas semelhantes a uma infecção com WNV, e agentes patogênicos provavelmente presentes em doentes que sofrem de infecção por WNV.

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum um dos seguintes patogênicos:

- Vírus da Dengue 1
- Vírus da Dengue 2
- Vírus da Dengue 3
- Vírus da Dengue 4
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite C
- Vírus da Hepatite E
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Vírus da encefalite japonesa
- Vírus da encefalite de Murray Valley
- *Neisseria meningitidis*
- Vírus da encefalite de St. Louis
- *Streptococcus pneumoniae*
- Vírus da encefalite da carraça (FSME)
- Vírus Usutu
- Vírus da febre-amarela
- Vírus Zika

O kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 é capaz de detetar o WNV a partir de linhagens 1 e 2:

- Linhagem 1 (NY99)
- Linhagem 2 (Heja, B-956 Uganda, 1986)

CUIDADO



Se a amostra apresentar outros agentes patogénicos diferentes do WNV, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas.

11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de uma experiência), variabilidade interensaio (variabilidade entre experiências diferentes) e na variabilidade entre lotes (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada combinando as 3 análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do coeficiente de variação com base nos valores do ciclo limiar (C_t). Foram analisadas pelo menos 4 réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

Tabela 2: Dados de precisão (CV % [valores C_t]) para amostras de plasma EDTA muito positivas de WNV

	Amostra muito positiva de WNV [CV % baseada nos valores C_t]
Variabilidade Intraensaio	0,32 - 0,95
Variabilidade Interensaio	0,02 - 0,40
Variabilidade Entre Lotes	1,38
Variabilidade Total	1,21

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas para o WNV.

Tabela 3: Dados de precisão (CV % [valores C_i]) para o Internal Control (Controlo Interno) nas amostras de plasma EDTA negativo de WNV

	Internal Control (controlo interno)
Variabilidade Intraensaio	0,18 - 0,67
Variabilidade Interensaio	0,04 - 0,32
Variabilidade Entre Lotes	0,61
Variabilidade Total	1,52

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 diagnóstico *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 de amostras adequados para o desempenho ideal deste teste.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de kit RealStar® WNV 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

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIA Symphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); ZeptoMetrix®.

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 kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE 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.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; 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:

Notas:

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

