

## Instruções de uso

# RealStar<sup>®</sup> MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0

09/2018 PT



# RealStar®

## MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0

Para utilização com

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

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

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)



651013



96



09 2018



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

## Conteúdo

<b>1.</b>	<b>Utilização Prevista .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes do Kit .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Armazenamento .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informação de Base .....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrição do Produto.....</b>	<b>9</b>
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
<b>7.</b>	<b>Avisos e Precauções .....</b>	<b>11</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimento .....</b>	<b>13</b>
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	14
8.3	Preparação da Reação .....	16
<b>9.</b>	<b>Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....</b>	<b>17</b>
9.1	Definições .....	17
9.1.1	Observações Especiais para Rotor-Gene® 6000 e Q5/6 plex Platform Rotor-Gene® 6000 e Q5/6 plex Platform .....	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes) .....	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	18
<b>10.</b>	<b>Análise de Dados .....</b>	<b>19</b>
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido .....	19
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	20
10.2	Interpretação dos Resultados .....	20
10.2.1	Análise Qualitativa .....	21

<b>11.</b>	<b>Avaliação do Desempenho.....</b>	<b>21</b>
11.1	Sensibilidade Analítica .....	21
11.2	Especificidade Analítica .....	22
11.3	Precisão .....	23
<b>12.</b>	<b>Limitações .....</b>	<b>24</b>
<b>13.</b>	<b>Controlo de Qualidade.....</b>	<b>25</b>
<b>14.</b>	<b>Apoio Técnico .....</b>	<b>25</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>25</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade .....</b>	<b>26</b>
<b>17.</b>	<b>Explicação de Símbolos .....</b>	<b>27</b>

## 1. Utilização Prevista

O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa do ARN específico do N gene of *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS-CoV).

## 2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	120
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controle interno

Positive Control (PC) = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

## 3. Armazenamento

- O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do

ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

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

#### 4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (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 Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) pertence à linhagem C dos beta-coronavírus da família Coronaviridae. O MERS-CoV foi identificado pela primeira vez na Arábia Saudita em 2012, num doente com síndrome de dificuldade respiratória aguda [1]. O MERS-CoV é um vírus ARN de cadeia simples e sentido positivo, encapsulado, com um genoma de tamanho B 30 kb [2], codificando quatro proteínas estruturais [3]. O MERS-CoV é um vírus zoonótico que tem os camelos dromedários como hospedeiros reservatórios, muito provavelmente originário dos morcegos. As principais vias de transmissão do vírus são dos camelos dromedários para os humanos e de humano para humano [1].

O espectro clínico da infeção por MERS-CoV varia desde o estágio assintomático ou sintomas respiratórios ligeiros, até doença respiratória aguda grave e morte. Uma apresentação típica da doença de MERS-CoV é febre, tosse e dispneia. Pode também ocorrer pneumonia e sintomas gastrointestinais, incluindo diarreia [4]. A doença grave pode causar falha respiratória grave que requer ventilação mecânica e suporte numa unidade de cuidados intensivos. O vírus parece causar patologia mais grave nos idosos e em pessoas com doenças crónicas como, por exemplo, doença renal, cancro, doença pulmonar crónica e diabetes [3, 4].

Para o diagnóstico molecular, a OMS recomenda um esquema de diagnóstico em dois passos, fazendo primeiro a triagem de amostras com a chamada análise upE (parte montante do gene da proteína E) seguido de uma análise de confirmação visando ORF1a. Para amostras com resultados discrepantes para *upE* ou ORF1a, a OMS recomenda a sequenciação de um terceiro alvo, o RdRp (polimerase do ARN dependente do ARN) ou o gene N. É preferível os laboratórios de diagnósticos de rotina realizarem uma terceira RT-PCR (transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase) visando o gene N. O vírus pode ser detetado diretamente em diferentes fluidos corporais (p.ex. urina, sangue, fezes) bem como em amostras respiratórias (trato superior: zaragatoas; trato inferior: expetoração, lavado broncoalveolar, aspirados) [1, 5].



- [1] Chan, Jasper F. W., et al. "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease." *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 28, no. 2, 2015, pp. 465–522., doi:10.1128/cmr.00102-14.
- [2] Omrani, Ali S., et al. "Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): animal to human interaction." *Pathogens and Global Health*, vol. 109, no. 8, 2015, pp. 354–362., doi:10.1080/20477724.2015.1122852.
- [3] Mackay, Ian M., and Katherine E. Arden. "MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission." *Virology Journal*, vol. 12, no. 1, 2015, doi:10.1186/s12985-015-0439-5.
- [4] Arabi, Yaseen M., et al. "Middle East Respiratory Syndrome." *New England Journal of Medicine*, vol. 376, no. 6, Sept. 2017, pp. 584–594., doi:10.1056/nejmsr1408795.
- [5] "Laboratory testing for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Interim guidance." World Health Organization, World Health Organization, June 2015, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176982/1/WHO\\_MERS\\_LAB\\_15.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176982/1/WHO_MERS_LAB_15.1_eng.pdf).

#### NOTA



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

## 6. Descrição do Produto

O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa do ARN específico do *N* gene of *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS-CoV).

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 para o ARN do MERS-CoV *N* gene estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do ARN específico do MERS-CoV *N* gene e do Controlo Interno nos canais de detecção correspondentes do instrumento de 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
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo
- Água de grau PCR

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

## 6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- 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™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

## 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.
- Avoid microbial and nuclease (ADNase/ARNase) contamination of the specimens and the components of the kit.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (ADNase/ARNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

## 8. Procedimento

### 8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0.

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

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

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

### ATENÇÃO



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

### ATENÇÃO



*A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.*

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

## 8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Controlo Interno	1 µl	12 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>16 µl</b>	<b>192 µl</b>

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

**ATENÇÃO**

*Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno*

**ATENÇÃO**

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

**8.3 Preparação da Reação**

- ▶ Pipete 15 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	15 µl
Controlo da Amostra	10 µl
<b>Volume Total</b>	<b>25 µl</b>

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



(~ 3000 rpm).

## 9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

### 9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

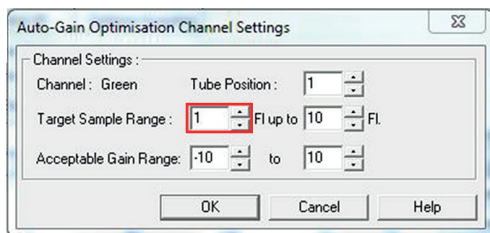
Definições	
Volume de Reação	25 µl
Ramp Rate	Predefinição
Referência passiva	Nenhuma

#### 9.1.1 Observações Especiais para Rotor-Gene® 6000 e Q5/6 plex Platform Rotor-Gene® 6000 e Q5/6 plex Platform

Instrument Definições	
Rotor	72-Well Rotor
Volume de Reação	25 µl

**ATENÇÃO**

*Realize a otimização de ganho: realize a otimização antes da primeira aquisição. Ajuste a otimização de ganho para o Green. Escolha um "Target Target Range" de 1 FI até 10 FI.*



## 9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do MERS-CoV N gene	MERS-CoV N gene	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	IC	JOE™	(Nenhum)

## 9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Transcristase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplification	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

### 10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

#### 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido

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

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 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.

## 10.2 Interpretação dos Resultados

### 10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ARN específico do MERS-CoV <i>N</i> gene.
-	+	Não foi detetado o ARN específico do MERS-CoV <i>N</i> gene. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do MERS-CoV <i>N</i> gene.
-	-	RT-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 JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN do MERS-CoV *N* gene na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno

## 11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando ARN quantificado do MERS-CoV *N* gene (transcrições *in vitro*).

### 11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ARN específico do MERS-CoV *N* gene que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada pela análise de séries de diluição de ARN específico do MERS-CoV *N* gene.

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

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,600	24	24	100
10,000	24	24	100
3,160	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79,2
0,100	24	11	45,8
0,032	24	4	16,7
0,010	24	1	4,2
0,003	24	0	0

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

- Para a deteção de ARN específico do MERS-CoV *N* gene, a sensibilidade analítica é de 0,71 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,43 - 1,62 cópias/μl]

## 11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do MERS-CoV *N* gene serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste diferentes ADN/ARN genómicos extraídos de outros flavivírus, de outros agentes patogénicos transmitidos por via sanguínea e de

agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes.

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

- Coronavirus 229E
- Coronavirus HKU-1
- Coronavirus NL63
- Coronavirus OC43
- Adenovírus humano
- Metapneumovirus humano
- Vírus da parainfluenza humana
- Vírus sincicial respiratório humano
- Gripe A
- Gripe B
- Rinovírus
- SARS-CoV
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*

### 11.3 Precisão

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

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

**Tabela 2:** Dados de precisão para a detecção de ARN específico do MERS-CoV N gene

MERS-CoV N gene	Ciclo limiar médio (C <sub>t</sub> )	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	31,21	0,11	0,35
Variabilidade Inter-ensaio	31,12	0,12	0,39
Variabilidade Inter-lote	31,21	0,08	0,26
Variabilidade Total	31,15	0,11	0,35

**Tabela 3:** Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno

Controlo Interno	Ciclo limiar médio (C <sub>t</sub> )	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	29,60	0,60	2,04
Variabilidade Inter-ensaio	30,61	0,82	2,67
Variabilidade Inter-lote	29,72	0,44	1,49
Variabilidade Total	30,28	0,88	2,92

## 12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.



- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma MERS-CoV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de detecção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

### 13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

### 14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto: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® MERS-CoV (N gene) RT-PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com marcação CE de acordo com a diretiva europeia de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2018 Altona Diagnostics GmbH; all rights reserved.

## 17. Explicação de Símbolos

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

**Notes:**

**Notes:**

**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

