

Instruções de uso

RealStar[®] Norovirus RT-PCR Kit 3.0

04/2017 PT

RealStar[®]

Norovirus RT-PCR Kit 3.0

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)

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



053013



96



04 2017



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

Conteúdo

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | Utilização Prevista | 6 |
| 2. | Componentes do Kit | 6 |
| 3. | Armazenamento | 6 |
| 4. | Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos..... | 7 |
| 5. | Informação de Base | 8 |
| 6. | Descrição do Produto..... | 9 |
| 6.1 | Instrumento de PCR em tempo real..... | 10 |
| 7. | Avisos e Precauções | 10 |
| 8. | Procedimento | 12 |
| 8.1 | Preparação de Amostras..... | 12 |
| 8.2 | Preparação da Master Mix..... | 13 |
| 8.3 | Preparação da Reação | 15 |
| 9. | Programação dos instrumentos de PCR em tempo real..... | 16 |
| 9.1 | Definições | 16 |
| 9.2 | Detetores de fluorescência (corantes) | 16 |
| 9.3 | Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante..... | 17 |
| 10. | Análise de Dados | 17 |
| 10.1 | Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico..... | 17 |
| 10.1.1 | Processamento de Teste de Diagnóstico Válido | 17 |
| 10.1.2 | Processamento de Teste Inválido (qualitativo)..... | 18 |
| 10.2 | Interpretação dos Resultados | 18 |
| 10.2.1 | Análise Qualitativa | 18 |
| 11. | Avaliação do Desempenho..... | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 11.1 | Sensibilidade Analítica | 19 |
| 11.2 | Especificidade Analítica | 21 |
| 11.3 | Precisão | 22 |
| 12. | Limitações | 23 |
| 13. | Controlo de Qualidade..... | 24 |
| 14. | Apoio Técnico | 24 |
| 15. | Bibliografia | 24 |
| 16. | Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade..... | 24 |
| 17. | Explicação de Símbolos | 26 |

1. Utilização Prevista

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ARN específico do -. Além disso, o teste permite a diferenciação entre do ARN específico do norovírus do genogrupo I (NV GI) e norovírus do genogrupo II (NV GII).

2. Componentes do Kit

| Cor cobertura | Componente | Número de frascos | Volume [µl/tubo] |
|---------------|----------------------|-------------------|------------------|
| Azul | Master A | 8 | 60 |
| Violeta | Master B | 8 | 180 |
| Verde | Internal Control | 1 | 1000 |
| Vermelho | Positive Control GI | 1 | 250 |
| Laranja | Positive Control GII | 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 género *Norovirus* (norovírus) pertence à família *Caliciviridae* e era anteriormente conhecido como o *vírus tipo Norwalk*. Os norovírus são vírus ARN de cadeia simples, descobertos em 1972 através de microscopia eletrónica. São caracterizados pelo seu elevado grau de variabilidade genómica. Os norovírus foram classificados em cinco genogrupos (G I a G V) com base na sequência em comparação com a polimerase de ARN e capsídeo da região do genoma. Os genogrupos I, II e IV são associados a infeções em humanos. Até à data, os genogrupos G I e G II são subdivididos em pelo menos 8 e 17 genótipos, respetivamente.

Os norovírus são responsáveis pela maioria das gastroenterites agudas não bacteriana em humanos em países industrializados. Os sintomas como vómitos e diarreia podem ocorrer após um curto período de incubação de 8 a 72 horas. Os norovírus são altamente infecciosos. As infeções com norovírus podem ser causadas tanto por água potável e/ou alimentos contaminados, como pela transmissão do vírus entre pessoas. Os norovírus podem causar situações de grandes surtos em contextos de estreito contacto humano, tal como em hospitais, lares, navios de cruzeiro, etc.

Nos últimos anos, foi comunicado um aumento substancial de surtos do norovírus na Europa Ocidental. Para evitar uma maior propagação do agente responsável durante uma situação de surto, é necessária uma aplicação imediata de medidas de higiene, assim como diagnósticos rápidos e sensíveis. Visto que o norovírus dos genogrupos I e II não pode ser cultivado em culturas de células e, dado que os imunoensaios foram considerados insuficientemente sensíveis e/ou específicos, a RT-PCR tornou-se o método de eleição para o diagnóstico de infeções por norovírus.

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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa e diferenciação do ARN específico do -. Além disso, o teste permite a diferenciação entre do ARN específico do norovírus do genogrupo I (NV GI) e norovírus do genogrupo II (NV GII).

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 NV G I ARN estão marcadas com o fluoróforo Cy⁵, ao passo que as sondas específicas para NV G II ARN 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 NV G I e ARN específico do NV G II, assim como 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Dois Controlos Positivos:
 - Controlo Positivo NV G I
 - Controlo Positivo NV G II
- 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 deteção de alvos do ARN específico do NV G I, ARN específico do NV G II assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 foi desenvolvido e validado para utilização 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)
- 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0.

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 | 15 µl | 180 µl |
| Controlo Interno | 1 µl | 12 µl |
| Volume da Master Mix | 21 µl | 252 µl |

- ▶ 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 | 15 µl | 180 µl |
| Volume da Master Mix | 20 µl | 240 µl |

ATENÇÃO

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

ATENÇÃO

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

8.3 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 são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 |
| Ramp Rate | 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 NV G I | NV G I | Cy®5 | (Nenhum) |
| ARN específico do NV G II | NV G II | 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 Re- petições | 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 | 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 Controle | Canal de Detecção | | |
|---------------------------|-------------------|------|------|
| | Cy ⁵ | FAM™ | JOE™ |
| Controlo Positivo NV G I | + | - | +/-* |
| Controlo Positivo NV G II | - | + | +/-* |
| 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 |
|-------------------|------|------|--|
| Cy ⁵ | FAM™ | JOE™ | |
| + | - | +* | Foi detetado o ARN específico do NV G I. |
| - | + | +* | NV G II specific ARN detected. |

| Canal de Detecção | | | Interpretação de Resultados |
|-------------------|------|------|---|
| Cy [®] 5 | FAM™ | JOE™ | |
| - | - | + | Não foi detetado o ARN específico do NV G I nem do NV G II. A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico do NV G I ou NV G II. |
| - | - | - | 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 Cy[®]5 ou no canal de deteção FAM™. Carga(s) elevada(s) do ARN do NV G I e/ou NV G II na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de controlo interno.

11. Avaliação do Desempenho

Dado que o norovírus não pode ser cultivado em cultura, não existe material padrão quantificado disponível. Por conseguinte, o desempenho avaliado do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 foi efetuado através da utilização de ARN extraído de um isolado do norovírus do genótipo I (G I.3) e do ARN extraído do isolado do norovírus do genótipo II (G II.4).

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 define-se como a concentração (cópias/μl de eluato) de moléculas de ARN específico do norovírus que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas do ARN extraído de um isolado do norovírus do genótipo I e um isolado do norovírus do genótipo II.

Tabela 1: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do NV G I

| Concentração inserida [cópias/ μ l] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|---|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 100,000 | 24 | 24 | 100 |
| 50,000 | 24 | 24 | 100 |
| 31,62 | 24 | 24 | 100 |
| 10,00 | 24 | 23 | 98,9 |
| 5,0 | 24 | 17 | 70,8 |
| 3,16 | 24 | 11 | 24,8 |
| 1,0 | 24 | 5 | 20,8 |
| 0,316 | 24 | 3 | 12,5 |
| 0,10 | 24 | 0 | 0 |

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do NV G II

| Concentração inserida [cópias/ μ l] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|---|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 10,000 | 24 | 24 | 100 |
| 5,0 | 24 | 24 | 100 |
| 3,16 | 24 | 23 | 95,8 |
| 1,0 | 24 | 21 | 87,5 |
| 0,5 | 24 | 15 | 62,5 |
| 0,316 | 24 | 10 | 41,7 |
| 0,10 | 24 | 6 | 25 |
| 0,0316 | 24 | 4 | 16,7 |
| 0,01 | 24 | 0 | 0 |

A sensibilidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a detecção de ARN específico do NV G I, a sensibilidade analítica é de 16,69 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 10,73 - 32,41 cópias/μl]
- Para a detecção de ARN específico do NV G II, a sensibilidade analítica é de 2,87 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 1,74 - 5,99 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 NV G I e G II serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 foi avaliada através do teste a a um painel de ARN/ADN genómico extraído de vírus relacionados com norovírus outros agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes.

O RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Astrovirus
- Vírus da hepatite A
- Vírus da hepatite E
- Rotavírus
- Sapovirus
- *Campylobacter spec.*
- *Clostridium difficile*
- *Cryptococcus spec.*

- *Entamoeba histolytica*
- *Entamoeba spec.*
- *Escherichia coli*
- *Giardia lamblia*
- *Salmonella spec.*

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 e variabilidade Inter-ensaio e Inter-lote.

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção de ARN específico do NV G I e do NV G II

| NV G I and NV G II | | Ciclo limiar médio (C_t) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|---------|------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | NV G I | 32,08 | 0,05 | 0,10 |
| | NV G II | 29,23 | 0,04 | 0,10 |
| Variabilidade Inter-ensaio | NV G I | 31,65 | 0,43 | 1,36 |
| | NV G II | 29,35 | 0,12 | 0,41 |
| Variabilidade Inter-lote | NV G I | 31,49 | 0,28 | 0,89 |
| | NV G II | 30,37 | 0,90 | 2,96 |
| Variabilidade Total | NV G I | 31,68 | 0,37 | 1,17 |
| | NV G II | 29,99 | 0,94 | 3,13 |

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno

| Controlo Interno | Ciclo limiar médio (C _t) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 30,47 | 0,08 | 0,27 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 30,41 | 0,12 | 0,38 |
| Variabilidade Inter-lote | 30,77 | 0,25 | 0,83 |
| Variabilidade Total | 30,68 | 0,22 | 0,72 |

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 NV G I e NV G II 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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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 altaona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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

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® Norovirus RT-PCR Kit 3.0 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.

© 2017 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

www.altona-diagnostics.com

