

Instruções de uso

RealStar[®] VZV PCR Kit 1.2

11/2017 PT

RealStar[®]

VZV PCR Kit 1.2

Para utilização com

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

SmartCycler[®] II (Cepheid)



071212



48



11 2017



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

Conteúdo

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | Utilização Prevista | 6 |
| 2. | Componentes do Kit | 6 |
| 3. | Armazenamento | 6 |
| 4. | Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos..... | 7 |
| 5. | Informação de Base | 8 |
| 6. | Descrição do Produto..... | 8 |
| 6.1 | Instrumento de PCR em tempo real..... | 10 |
| 7. | Avisos e Precauções | 10 |
| 8. | Procedimento | 12 |
| 8.1 | Preparação de Amostras..... | 12 |
| 8.2 | Preparação da Master Mix..... | 13 |
| 8.3 | Preparação da Reação | 15 |
| 9. | Programação dos instrumentos de PCR em tempo real..... | 15 |
| 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 (qualitativo) | 17 |
| 10.1.2 | Processamento de Teste Inválido (qualitativo)..... | 18 |
| 10.1.3 | Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)..... | 18 |
| 10.1.4 | Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)..... | 19 |
| 10.2 | Interpretação dos Resultados | 19 |
| 10.2.1 | Análise Qualitativa | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 10.2.2 | Análise Quantitativa | 20 |
| 11. | Avaliação do Desempenho..... | 21 |
| 11.1 | Sensibilidade Analítica | 21 |
| 11.2 | Especificidade Analítica | 22 |
| 11.3 | Linear Range..... | 23 |
| 11.4 | Precisão | 25 |
| 12. | Limitações | 26 |
| 13. | Controlo de Qualidade..... | 26 |
| 14. | Apoio Técnico | 27 |
| 15. | Bibliografia | 27 |
| 16. | Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade..... | 27 |
| 17. | Explicação de Símbolos..... | 29 |

1. Utilização Prevista

O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do vírus varicela-zoster (VZV).

2. Componentes do Kit

| Cor cobertura | Componente | Número de frascos | Volume [µl/tubo] |
|---------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Azul | Master A | 4 | 60 |
| Violeta | Master B | 4 | 120 |
| Verde | Internal Control | 1 | 1000 |
| Vermelho | QS1-4* | 4 | 250 |
| Branco | Water (PCR grade) | 1 | 500 |

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

Internal Control (IC) = Controle interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da 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
- Minicentrífuga com um rotor para tubos de reação da Cepheid
- Agitador vortex
- Capilares LightCycler® com material de fecho correspondente
- Tubos de reação Cepheid para SmartCycler® II
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



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

5. Informação de Base

O *vírus varicela-zoster* (VZV) é um membro da família *Herpesviridae* e, juntamente com o vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o vírus do herpes simplex tipo 2 (HSV-2), classifica-se como *Alphaherpesvirus*. O VZV tem um genoma de ADN linear de cadeia dupla de aproximadamente 125 kbp.

O VZV transmite-se através da inalação de partículas ou pelo contacto direto com as lesões infecciosas. Mais de 90% dos adultos têm o anticorpo para o VZV. Este vírus causa duas manifestações clínicas diferentes: a varicela e o herpes zóster. A varicela é a infeção primária causada pelo VZV e é altamente contagiosa. A varicela ocorre mais frequentemente em crianças. Ao contrário das infeções primárias pelos outros *Herpesviridae*, que são normalmente assintomáticos, a varicela é geralmente clinicamente aparente e é caracterizada por um exantema vesicular generalizado, frequentemente acompanhado por febre. O herpes zóster é uma infeção secundária causada pela reativação do VZV latente nos gânglios sensoriais. O herpes zoster ocorre normalmente em adultos e doentes imunocomprometidos, consistindo numa erupção circunscrita de lesões vesiculares, acompanhada pela inflamação dos gânglios sensoriais dos nervos cranianos ou da raiz dorsal correspondente.

6. Descrição do Produto

O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção e quantificação do ADN específico do vírus varicela-zoster (VZV).

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

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a deteção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ADN do VZV estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo Cy®3.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ADN específico do VZV e do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Quatro Padrões de Quantificação (QS1 - QS4)
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ADN específico do VZV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ADN específico do VZV. Os Padrões de Quantificação podem ser utilizados individualmente como controlos positivos ou em conjunto para gerar uma **curva padrão**, a qual pode ser utilizada para a determinação da concentração do ADN específico do VZV na amostra.

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

| Padrões de quantificação | Concentração [cópias/μl] |
|--------------------------|--------------------------|
| QS1 | 1,00E+04 |
| QS2 | 1,00E+03 |
| QS3 | 1,00E+02 |
| QS4 | 1,00E+01 |

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)
- SmartCycler® II (Cepheid)

7. Avisos e Precauções

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

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.

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

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

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

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

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® VZV PCR Kit 1.2 deve ser validada pelo utilizador.

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

ATENÇÃO

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

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® VZV PCR Kit 1.2 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de PCR.

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

| Número de Reações (reações) | 1 | 12 |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 10 µl | 120 µl |
| Controlo Interno | 1 µl | 12 µl |
| Volume da Master Mix | 16 µl | 192 µl |

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

| Número de Reações (reações) | 1 | 12 |
|--------------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 10 µl | 120 µl |
| Volume da Master Mix | 15 µl | 180 µl |

ATENÇÃO

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

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 capilar LightCycler® necessário ou tubo de reação para SmartCycler® II.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (padrão de quantificação, controlo positivo ou negativo).

| Preparação da Reação | |
|----------------------|--------------|
| Master Mix | 15 µl |
| Controlo da Amostra | 10 µl |
| Volume Total | 25 µl |

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo (QS) e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Para fins de quantificação devem ser utilizados todos os Padrões de Quantificação (QS1 a QS4).
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche os capilares ou tubos, utilizando as tampas adequadas.
- ▶ Centrifugue os capilares LightCycler® ou os tubos de reação do SmartCycler® II utilizando uma centrifuga adequada durante 30 segundos a aproximadamente 400 x g (~ 2000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

| Definições | |
|------------------|--------------|
| Volume de Reação | 25 µl* |
| Ramp Rate | Predefinição |

* O volume de reação deve ser definido como 20 µl, se estiver a utilizar um instrumento LightCycler® 2.0 (Roche).

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

| Alvo | LightCycler® 1.2/1.5 | LightCycler® 2.0 | SmartCycler® II |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| ADN específico do VZV | F1 | 530 | FAM™ |
| Controlo Interno (Internal Control) | F2 | 610 | Cy®3 |

ATENÇÃO



Para uma análise de dados precisa nos instrumentos LightCycler®, pode ser necessário um ficheiro de compensação de cor específico. Contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter apoio técnico

ATENÇÃO



Se utilizar o instrumento LightCycler® 2.0, só devem ser ativados os canais de deteção 530 e 610 para a compensação de cor.

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

| | Modo de análise | Ciclo Repetições | Aquisição | Temperatura [°C] | Tempo [min:sec] |
|---------------|-----------------|------------------|-----------|------------------|-----------------|
| Desnaturação | Nenhuma | 1 | - | 95 | 02:00 |
| Amplification | Quantificação | 45 | Nenhuma | 95 | 00:05 |
| | | | Único | 60 | 00:30 |
| | | | Nenhuma | 72 | 00:10 |
| arrefecimento | Nenhuma | 1 | - | 40 | 00:30 |

10. Análise de Dados

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® VZV PCR Kit 1.2 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

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

| ID do Controle | Canal de Detecção | |
|------------------------|-------------------|-------------|
| | FAM™/F1/530 | Cy®3/F2/610 |
| Controlo Positivo (QS) | + | +/-* |
| Controlo Negativo | - | + |

* A presença ou ausência de um sinal no canal Cy®3/F2/610 não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

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

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

10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)

Um **quantitativo** de diagnóstico é **válido**, se existirem todas as condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo válido** [consulte o capítulo 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)]. Os resultados de **quantificação** são **válidos** se a **curva padrão** gerada atinge o valor do parâmetro seguinte:

| Parâmetro de Controlo | Valor Válido |
|------------------------------|--------------|
| R quadrado (R ²) | ≥ 0.98 |

NOTA

i

Nem todos os instrumentos de PCR em tempo real apresentam o valor de R quadrado (R^2). Para obter informações detalhadas, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

Um **quantitativo** de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **quantitativo válido** não estiver presente.

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

| Canal de Detecção | | Interpretação de Resultados |
|-------------------|-------------|---|
| FAM™/F1/530 | Cy®3/F2/610 | |
| + | +* | Foi detetado o ADN específico do VZV. |
| - | + | Não foi detetado o ADN específico do VZV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do VZV. |
| - | - | PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra. |

* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção Cy®3/F2/610 para resultados positivos no canal de deteção FAM™/F1/530. Uma carga elevada de ADN do VZV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para que seja gerada uma **curva padrão** para a análise quantitativa, estes padrões têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (capítulo 6. Descrição do Produto). A utilização de **padrões** concentrações conhecidas permite a geração de uma curva padrão para a análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

C_t = Limiar Ciclo

m = Declive

N_0 = Concentração inicial

b = Impedir

A partir da curva padrão, pode-se quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.

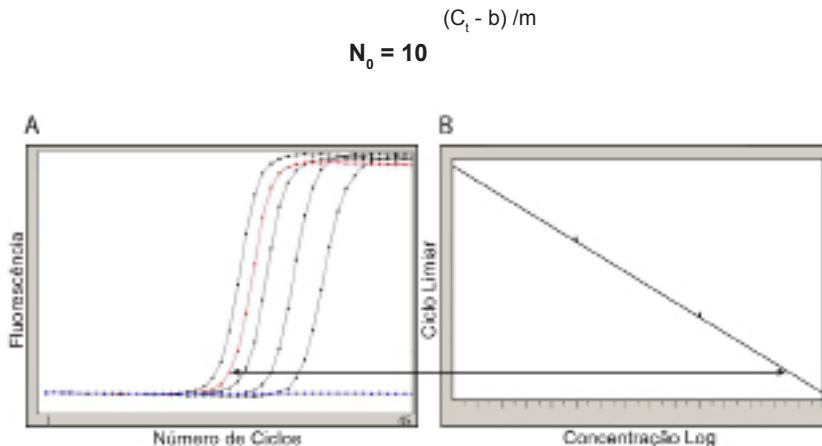


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [Um] e uma análise de Curva Padrão [B]

NOTA

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

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

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 foi efetuada utilizando o ADN específico do VZV quantificado [isolado da VZV estirpe ELLEN (ATCC® Número: VR-1367)].

11.1 Sensibilidade Analítica

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

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

| Concentração inserida [cópias/ μ l] | Número de Réplicas | Número de Positivos | Taxa de Positividade [%] |
|---|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 3,162 | 12 | 12 | 100 |
| 1,000 | 12 | 12 | 100 |
| 0,316 | 12 | 11 | 92 |
| 0,100 | 12 | 8 | 67 |
| 0,032 | 12 | 4 | 33 |
| 0,010 | 12 | 0 | 0 |
| 0,003 | 12 | 0 | 0 |

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

- Para a deteção de ADN específico do VZV, a sensibilidade analítica é de 0.34 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0.18 – 1.22 cópias/ μ l]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os génotipos relevantes do VZV serão detetados.

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

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

- Vírus BK
- Citomegalovírus
- Vírus Epstein-Barr
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Herpesvírus humano 6A
- Herpesvírus humano 6B
- Herpesvírus humano 7
- Herpesvírus humano 8
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Parvovírus humano B19
- Vírus JC

11.3 Linear Range

O intervalo linear do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ADN específico do VZV utilizando concentrações entre 1E+08 - 1E+00 cópias/μl. Pelo menos oito réplicas por diluição foram analisadas

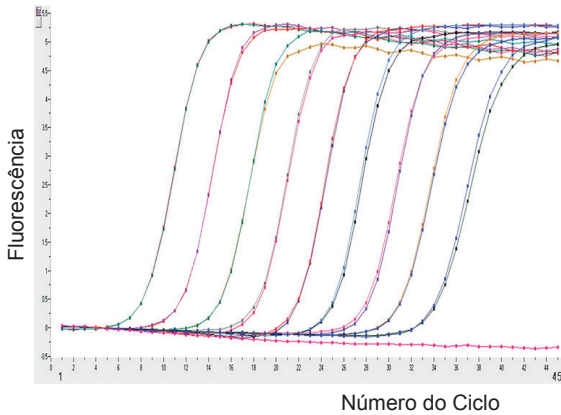
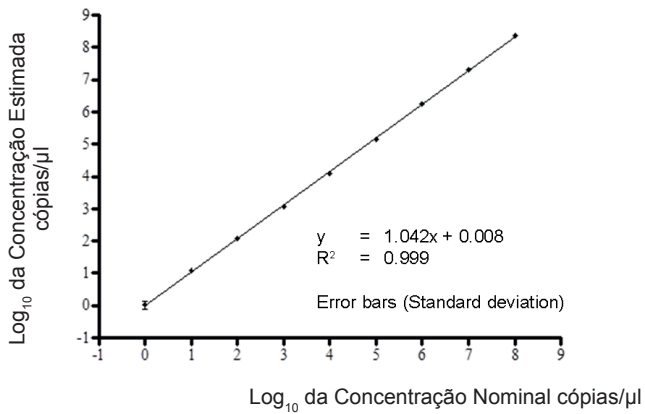
A**B**

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

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

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

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

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

| VZV | Concentração Média [cópias/ μ l] | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 132,87 | 2,64 | 1,99 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 135,87 | 10,74 | 7,90 |
| Variabilidade Inter-lote | 133,01 | 12,70 | 9,55 |
| Variabilidade Total | 134,96 | 13,37 | 9,91 |

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

| Controlo Interno | Ciclo limiar médio (C_t) | Desvio Padrão | Coefficiente de Variação [%] |
|----------------------------|------------------------------|---------------|------------------------------|
| Variabilidade Intra-ensaio | 25,27 | 0,09 | 0,35 |
| Variabilidade Inter-ensaio | 25,48 | 0,28 | 1,10 |
| Variabilidade Inter-lote | 25,53 | 0,29 | 1,12 |
| Variabilidade Total | 25,59 | 0,27 | 1,07 |

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR (p.e. heparina) pode provocar sub quantificação, falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma VZV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em sub quantificação ou na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® VZV PCR Kit 1.2 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade alta Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Bibliografia

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

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

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

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


O RealStar® VZV PCR Kit 1.2 é a CE-marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 98/79/EC.

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

Não disponível em todos os países.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

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

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

