altona DIAGNOSTICS

Instruções de utilização

RealStar®
CMV PCR Kit 1.0

09/2023 PT

RealStar®

RealStar®

CMV PCR Kit 1.0

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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

CE 0483

IVD

REF 021013

Σ 96

09 2023

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

MAN-021010-PT-S02

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 Instrumentos de PCR em tempo real 10

7. Avisos e Precauções 11

8. Procedimento 13

8.1 Armazenamento, Transporte e Colheita de Espécimes 13

8.2 Preparação de Amostras 13

8.3 Preparação da Master Mix 15

8.4 Preparação da Reação 17

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real 18

9.1 Definições 18

9.2 Detetores de fluorescência (corantes) 18

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante 19

10. Análise de Dados 19

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico 19

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo) 19

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo) 20

10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo) 20

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo) 21

10.2 Interpretação dos Resultados 21

10.2.1 Análise Qualitativa 21
10.2.2 Análise Quantitativa 22

11. Avaliação do Desempenho 24
11.1 Sensibilidade Analítica 24
11.1.1 Sensibilidade Analítica excluindo a Extração de Ácido Nucleico 24
11.1.2 Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA 26
11.1.3 Sensibilidade Analítica de Amostras de Sangue Total com EDTA 28
11.2 Especificidade Analítica 30
11.3 Faixa Linear 30
11.4 Precisão 33
11.5 Avaliação diagnóstica 34
11.5.1 Tipo de Espécime: Plasma com EDTA 34
11.5.2 Tipo de Espécime: Sangue Total com EDTA 36

12. Limitações 38

13. Controlo de Qualidade 39

14. Apoio Técnico 39

15. Bibliografia 39

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade 40

17. Explicação de Símbolos 41

1. Utilização Prevista

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do citomegalovírus (CMV) em plasma EDTA humano e sangue total com EDTA.

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	QS1-4*	4	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

* O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 contém Padrões de Quantificação em quatro concentrações diferentes (consulte o capítulo 6. Descrição do Produto)

Internal Control (IC) = Controle interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® CMV 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 8.2 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	
i	***Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.***
i	***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 *cytomegalovirus humano* (CMV) é um membro da família *Herpesviridae* e pertence à subfamília *Betaherpesvirinae*. O vírus consiste num capsídeo icosaédrico que tem um genoma de ADN de cadeia dupla linear de aproximadamente 230 kbp, um tegumento envolvente e invólucro exterior.

O CMV está presente a nível mundial e infeta humanos de todas as idades, sem padrões de transmissão sazonais ou epidémicos. A seroprevalência do CMV aumenta com a idade em todas as populações e varia entre 40 e 100%. Tal como nas infeções com outros vírus do herpes, a primeira infeção com o CMV resulta no estabelecimento de uma infeção persistente e latente. A reativação do vírus pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos, particularmente na imunossupressão. A vasta maioria das infeções por CMV é assintomática ou subclínica, mas as infeções congénitas e as infeções em pacientes imunocomprometidos poderão ser sintomáticas e graves. Em hospedeiros imunocomprometidos, como recetores de transplantes, pessoas infetadas pelo VIH ou doentes de cancro, a infeção por CMV ou reativação da infeção poderá tornar-se numa doença disseminada que os coloca em risco de vida.

6. Descrição do Produto

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do citomegalovírus (CMV) em em plasma EDTA humano e sangue total com EDTA.

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 CMV 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 deteção paralela do ADN específico do CMV 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 amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 consiste em:

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

- Água de 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 a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ADN específico do CMV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ADN específico do CMV. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados segundo a 1ª norma internacional da OMS para o Human Cytomegalovirus para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162). 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 CMV na amostra.

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

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

6.1 Instrumentos de PCR em tempo real

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi validado para plasma EDTA em combinação com o QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) nos 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi validado para plasma EDTA em combinação com o e sangue total com EDTA em combinação com o VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare) nos seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

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 infeciosos 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 Armazenamento, Transporte e Colheita de Espécimes

A colheita de sangue deve ser executada com sistemas de colheita de sangue com EDTA padrão disponíveis comercialmente (p. ex. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner ou equivalente). Os tubos devem ser misturados imediatamente após a recolha de amostras. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2 a 8 °C). O transporte deverá realizar-se de acordo com as instruções de transporte de material biológico locais e nacionais.

Para a produção de plasma com EDTA, o sangue total com EDTA deve ser centrifugado, no prazo de 24 horas após a colheita, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do sistema de colheita. O plasma com EDTA e o sangue total com EDTA devem ser armazenados a 2 a 8 °C, não excedendo 14 dias (Abdul-Ali et al. 2011).

8.2 Preparação de Amostras

O ADN extraído do plasma com EDTA humano ou do sangue total com EDTA é o material inicial para o RealStar® CMV PCR Kit 1.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo sobre o 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.

Para o **plasma com EDTA** foram validados os seguintes métodos de extração de ácido nucleico para utilização com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP em combinação com VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

De forma a aumentar a sensibilidade do sistema, o protocolo do QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) pode ser modificado de acordo com as especificações listadas na Tabela 3: Adaptações do protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) (consulte o capítulo 11.1.2 Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA).

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.

Para o **sangue total com EDTA,** foram validados os seguintes métodos de extração de ácido nucleico para utilização com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- VERSANT® kPCR Molecular System SP em combinação com VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

No caso de amostras de sangue total com EDTA, o protocolo de preparação de amostras dos VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents (SMN 10629800 e 10629801) deve ser modificado da seguinte forma: As amostras de sangue total com EDTA devem ser misturadas com um tampão PRE numa proporção 1:1 (350 µl + 350 µl), em vez da proporção indicada nas instruções de utilização.

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.
	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).

8.3 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® CMV PCR Kit 1.0 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	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 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

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

8.4 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 (padrão de quantificação, 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 (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 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® CMV 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	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
ADN específico do CMV	CMV	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	Repetições do ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	10:00
Amplificação	Realização de ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	01:00

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® CMV 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 (qualitativo)

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

ID do Controlo	Canal de Deteção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo (QS)	+	+/-*
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.

10.1.3 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 Controle	Valor Válido
R quadrado (R^2)	> 0,98

NOTA

Nem todos os instrumento 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 Deteção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ADN específico do CMV.
-	+	Não foi detetado o ADN específico do CMV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do CMV.
-	-	PCR iinibição 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 ADN do CMV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno.

Um resultado CMV específico positivo pode ser esperado com uma taxa de positividade de 95%, se a amostra analisada contiver pelo menos 265 UI de CMV por ml de plasma com EDTA [95% intervalo de confiança: 50 – 2278 UI/ml] e 835 UI de CMV por ml de sangue total com EDTA [90% intervalo de confiança: 614 - 1274 UI/ml].

Como com qualquer teste de diagnóstico, os resultados obtidos com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 devem ser interpretados considerando todos os achados clínicos e laboratoriais.

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 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 (consulte o 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.

$$N_0 = 10^{(C_t - b)/m}$$

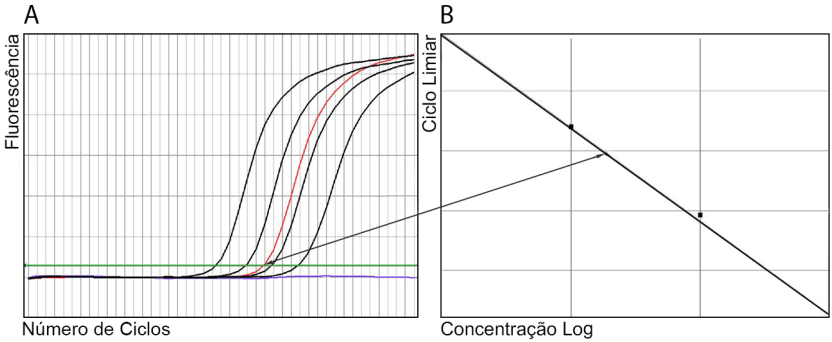


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [**A**] e uma análise de Curva Padrão [**B**]

NOTA

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

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

$$\text{Carga Viral (}\mathbf{Amostra}\text{) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (}\mathbf{Eluém}\text{) [µl]} \cdot \text{Carga Viral (}\mathbf{Eluém}\text{) [UI/µl]}}{\text{Entrada de amostra [ml]}}$$

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação de desempenho analítico sem um método de extração de ácido nucleico selecionado, foi efetuada utilizando ADN específico do CMV quantificado. A avaliação de desempenho analítico com métodos selecionados de extração de ácido nucleico, foi efetuada utilizando a 1ª norma internacional da OMS para o Citomegalovirus Humano de técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162).

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (Limite de deteção - LDD) RealStar® CMV PCR Kit 1.0 define-se como a concentração de moléculas de ADN no CMV que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada com e sem um método de extração de ácido nucleico selecionado.

11.1.1 Sensibilidade Analítica excluindo a Extração de Ácido Nucleico

Uma série de diluições de CMV de ADN foi preparada a partir de 1,21 UI/µl até 0,0004 UI/µl nominal e foram analisadas utilizando o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 em combinação com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Os testes foram realizados em dois dias com pelo menos oito réplicas por concentração de uma vez. Os resultados foram determinados pela análise probit.

Tabela 1: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica [Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)]

Concentração inserida [UI/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
1,2100	16	16	100
0,3826	16	16	100
0,1210	16	13	81
0,0383	16	4	25
0,0121	16	2	13
0,0038	16	0	0
0,0012	16	0	0
0,0004	16	0	0

Tabela 2: A sensibilidade analítica determinada pela análise probit utilizando diferentes instrumentos de PCR em tempo real

Instrumento de PCR em tempo real	Limite de detecção [95%]	Intervalo de confiança [95%]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	0,668 UI/µl	0,323 - 2,258 UI/µl
Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex	0,249 UI/µl	0,160 - 0,644 UI/µl
LightCycler® 480 Instrument II	0,238 UI/µl	0,149 - 0,624 UI/µl
Mx 3005P™ QPCR System	0,257 UI/µl	0,150 - 0,704 UI/µl
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	0,943 UI/µl	0,083 - 16,884 UI/µl
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	0,702 UI/µl	0,396 - 1,985 UI/µl

11.1.2 Sensibilidade Analítica de Amostras de Plasma com EDTA

A sensibilidade analítica deve ter em consideração o método de extração de ácido nucleico selecionado para amostras de plasma com EDTA sendo este determinado utilizando uma séria de diluições da 1ª norma internacional da OMS para o Citomegalovirus Humano para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162) variando entre CMV 316 UI/ml a 0,03 UI/ml nominal em CMV de plasma com EDTA negativo.

Em dois dias, oito alíquotas por concentração foram submetidos de uma vez à extração de ácido nucleico utilizando o QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN). O protocolo do QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) foi adaptado de acordo com a seguinte tabela.

Tabela 3: Adaptações do protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

	QIAGEN Protocol [µl]	Adaptação [µl]
Amostra	200	400
Protease	25	50
Lysisbuffer (AL)	200	400
Etanol[1] (abs.)	250	500
Tampão de lavagem (AW1)	500	700
Tampão de lavagem (AW2)	500	700
Etanol[2] (abs.)	500	700

[1] adicionado ao Amostra/Lysisbuffer misturar

[2] Lave passo 3

Cada eluato foi analisado utilizando o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 em combinação com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Os resultados foram determinados por análise probit.

Tabela 4: Resultados de PCR utilizados para o cálculo de sensibilidade analítica de amostras de plasma com EDTA [LightCycler® 480 Instrument II (Roche)]

Concentração inserida [UI/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,23	16	16	100
100,00	16	15	94
31,62	16	13	81
10,00	16	6	38
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0
0,10	16	0	0
0,03	16	0	0

Tabela 5: Sensibilidade analítica para amostras de plasma com EDTA determinada pela análise probit utilizando diferentes instrumentos de PCR em tempo real

Instrumento de PCR em tempo real	Limite de detecção [95%]	Intervalo de confiança [95%]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	92,10 UI/ml	46,94 - 288,29 UI/ml
Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex	106,29 UI/ml	51,05 - 356,08 UI/ml
LightCycler® 480 Instrument II	91,38 UI/ml	49,16 - 271,13 UI/ml
Mx 3005P™ QPCR System	85,14 UI/ml	45,09 - 256,13 UI/ml
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	116,32 UI/ml	59,67 - 357,43 UI/ml
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	264,98 UI/ml	49,54 - 2278,24 UI/ml

11.1.3 Sensibilidade Analítica de Amostras de Sangue Total com EDTA

A sensibilidade analítica deve ter em consideração o método de extração de ácido nucleico selecionado para amostras de sangue total com EDTA sendo este determinado utilizando uma séria de diluições da 1ª norma internacional da OMS para o Citomegalovirus Humano para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 09/162) variando entre 10000 UI/ml a 20 UI/ml em CMV de sangue total com EDTA negativo.

Em três execuções independentes, oito alíquotas por concentração, de cada vez, foram submetidas à extração de ácido nucleico utilizando o VERSANT® kPCR Molecular System SP em combinação com o VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare).

Os resultados foram determinados por análise probit.

Tabela 6: Resultados de PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica para amostras de sangue total com EDTA [VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)]

Concentração inserida [UI/ml]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10000	24	24	100
3162	24	24	100
1500	24	24	100
1000	24	24	100
750	24	22	92
500	24	20	83
250	24	16	67
100	24	10	42
20	22	1	5

Tabela 7: Analytical sensitivitypara amostras de sangue total com EDTA determined by probit analysis using the VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)

Instrumento de PCR em tempo real	Limite de detecção [95%]	Intervalo de confiança [90%]
VERSANT® kPCR Molecular System AD	835 UI/ml	614 - 1274 UI/ml

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 é assegurada pela selecção completa dos oligonucleótidos (iniciadores e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de sequências contra sequências publicamente disponíveis para assegurar que todos os genótipos relevantes de CMV serão detectados.

Mais de cem espécimes de CMV de plasma com EDTA negativo e mais de trinta espécimes de CMV de sangue total com EDTA negativo diferentes foram analisados com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Nenhum destes evidenciou um sinal específico CMV positivo, mas todos evidenciaram um sinal IC válido. Além disso, a especificidade do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste de um painel de ADN/ARN genómico extraído de outros vírus de herpes e outros agentes patogénicos significantes em doentes imunocomprometidos.

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Vírus BK
- Vírus de Epstein Barr
- Vírus da hepatite A
- 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
- Vírus símios 40
- Vírus varicela-zoster

11.3 Faixa Linear

O intervalo linear do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ADN específico do CMV (concentrações que variam de 1,21E+09 - 1,21E+00 UI/µl) usando o seguinte Instrumento de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Cada concentração foi analisada em oito réplicas por instrumento de PCR em tempo real. O intervalo linear do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 abrange um intervalo de pelo menos nove ordens de magnitude em todos os instrumentos de PCR em tempo real utilizados.

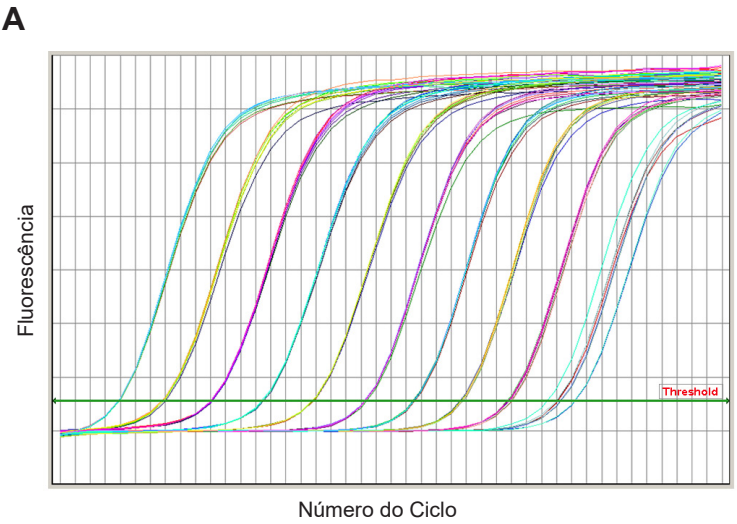
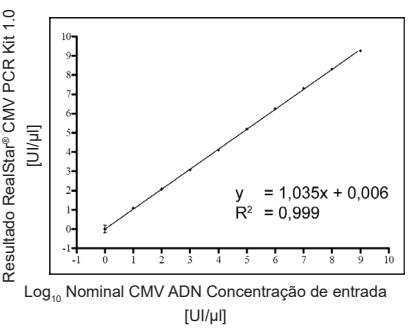
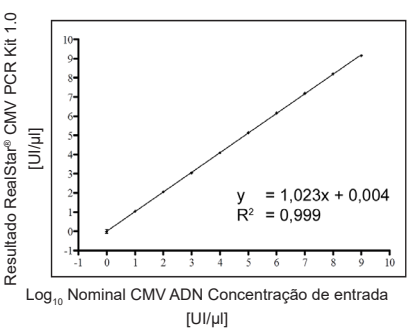


Figura 2: Curvas de amplificação no ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

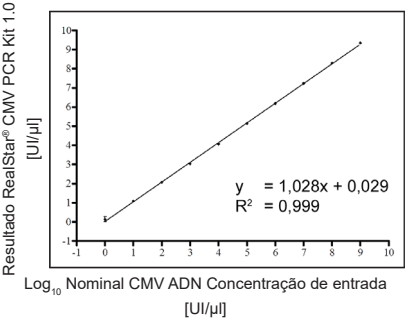
A


Resultado RealStar® CMV PCR Kit 1.0 [UI/µl]
y = 1,035x + 0,006
R² = 0,999
Log10 Nominal CMV ADN Concentração de entrada [UI/µl]

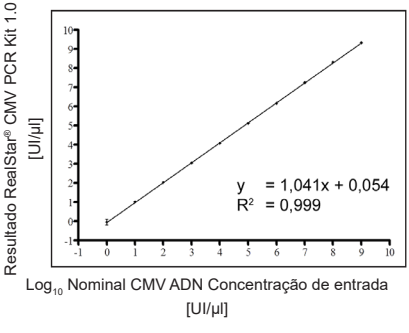
B


Resultado RealStar® CMV PCR Kit 1.0 [UI/µl]
y = 1,023x + 0,004
R² = 0,999
Log10 Nominal CMV ADN Concentração de entrada [UI/µl]

C


Resultado RealStar® CMV PCR Kit 1.0 [UI/µl]
y = 1,028x + 0,029
R² = 0,999
Log10 Nominal CMV ADN Concentração de entrada [UI/µl]

D


Resultado RealStar® CMV PCR Kit 1.0 [UI/µl]
y = 1,041x + 0,054
R² = 0,999
Log10 Nominal CMV ADN Concentração de entrada [UI/µl]

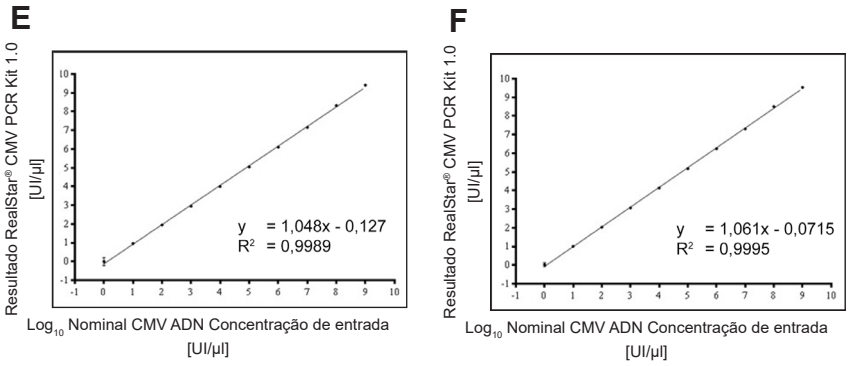


Figura 3: Regressão linear da série de diluições analisada na ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) [**A**], a Mx 3005PTM QPCR System (Stratagene) [**B**], a LightCycler® Instrument 480 II (Roche) [**C**], a Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene™ Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) [**D**], a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**E**], e a CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**F**]

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® CMV 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 variação expressam-se quanto ao coeficiente de variação da variação total. Os dados são baseados na análise quantitativa de um controlo positivo elevado (121 UI/µl) e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos de um controlo positivo reduzido (1,8 UI/µl) e Controlo Interno (IC). Pelo menos oito réplicas por amostra foram analisadas.

Tabela 8: Precisão em termos de Coeficiente de Variação da Variabilidade Total usando diferentes valores de PCR.

Instrumento de PCR em tempo real	Variabilidade Total / Coeficiente de Variação [%]		
	Controle Positivo Alto (HPC)	Controle Positivo Baixo (LPC)	Controle interno
ABI Prism® 7500 Fast SDS	4,89	1,49	0,91
LightCycler® 480 Instrument II	6,62	1,13	0,12
Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex	10,79	4,20	0,65
Mx 3005P™ QPCR System	19,77	1,22	0,60
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	5,33	1,85	1,74
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	7,28	1,59	3,36

11.5 Avaliação diagnóstica

11.5.1 Tipo de Espécime: Plasma com EDTA

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi avaliado num estudo comparativo com o Abbott RealTime CMV kit com a marcação CE da Abbott Diagnostics.

124 espécimes de plasma com EDTA remetidas para o teste de rotina de CMV, foram tratadas utilizando o sistema de extração de ácido nucleico m2000sp (Abbott Diagnostics) e analisadas com o Abbott RealTime CMV kit com a marcação CE num instrumento m2000rt (Abbott Diagnostics). Os eluatos de ADN foram armazenados a -20 °C e analisados novamente utilizando o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 num instrumento de m2000rt.

Tabela 9: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico

		RealStar® CMV PCR Kit 1.0	
		+	-
Abbott RealTime CMV	+	103	1
	-	0	20

A sensibilidade e especificidade de diagnóstico do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 comparado com o teste Abbott RealTime CMV foi de 99,04 e 100%, respetivamente.

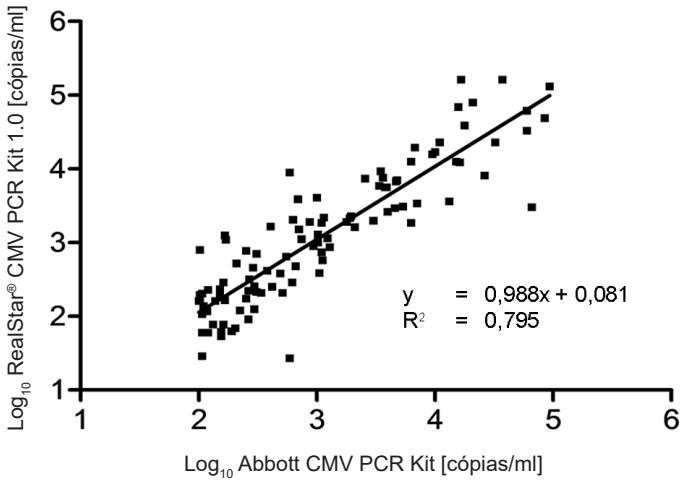


Figura 4: Correlação dos resultados de quantificação entre o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e o teste Abbott RealTime CMV (n=102).

Detetou-se uma boa correlação entre os resultados quantitativos do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e do Abbott RealTime CMV kit. Não foram identificadas diferenças sistemáticas ou proporcionais entre os dois métodos.

11.5.2 Tipo de Espécime: Sangue Total com EDTA

O RealStar® CMV PCR Kit 1.0 foi avaliado num estudo comparativo com o Q - CMV Real Time Complete Kit com a marcação CE da ELITech Molecular Diagnostics.

90 espécimes de CMV de sangue total com EDTA positivo da monitorização de rotina de CMV, foram testados em paralelo utilizando o sistema de extração de ácido nucleico NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux) com o Q - CMV Real Time Complete Kit no ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com a marcação CE e utilizando o kPCR Molecular System (Siemens) com o RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Para a correlação quantitativa, foram removidas da análise todas as amostras que mostraram resultados negativos com um ou ambos os ensaios, assim como dois "outliers". Os resultados das restantes 71 amostras foram utilizados para posterior análise. A correlação quantitativa dos resultados foi determinada através da análise de regressão Passing-Bablok.

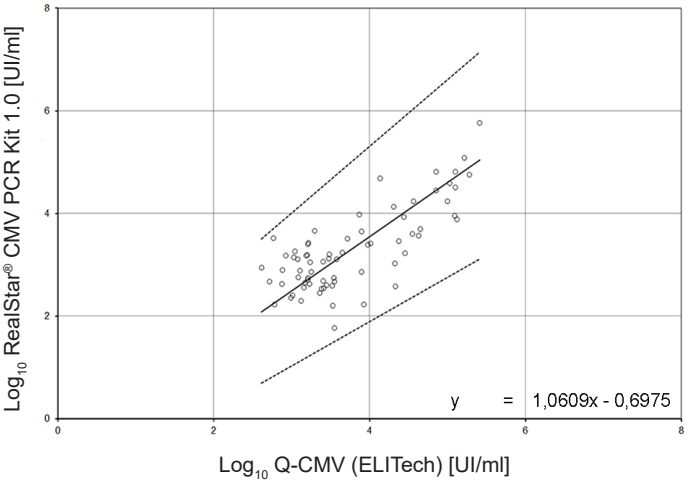


Figura 5: Correlação dos resultados de quantificação entre o RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e o Q-CMV Real Time Complete Kit da ELITech Molecular Diagnostics

Detetou-se uma boa correlação entre os resultados quantitativos do RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e do Q - CMV Real Time Complete Kit. Não foram identificadas diferenças sistemáticas ou proporcionais entre os dois métodos.

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 CMV 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® CMV 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® CMV 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**

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

15. Bibliografia

[1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.

[2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.

[3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.

[4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.

[5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Mx 3005P™ (Stratagene); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute® (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® CMV 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.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
LOT	Código de lote
CAP	Cor cap
REF	Número do produto
CONT	Conteúdo
NUM	Número
COMP	Componente
GTIN	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:

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