

# Instruções de utilização

## RealStar<sup>®</sup> Chagas PCR Kit 1.0

04/2022 PT



# RealStar<sup>®</sup>

## Chagas 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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

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

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



611013



96



04 2022



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

## Conteúdo

<b>1.</b>	<b>Utilização prevista.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes do kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Armazenamento .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiais e dispositivos requeridos mas não fornecidos .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informação de base .....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrição do produto .....</b>	<b>9</b>
6.1	Instrumento PCR em tempo real.....	11
<b>7.</b>	<b>Avisos e precauções.....</b>	<b>11</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimento .....</b>	<b>13</b>
8.1	Preparação de amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	14
8.3	Preparação da reação.....	16
<b>9.</b>	<b>Programação dos instrumentos PCR em tempo real .....</b>	<b>17</b>
9.1	Definições .....	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes) .....	17
9.3	Perfil de temperatura e aquisição de corante .....	19
<b>10.</b>	<b>Análise de dados.....</b>	<b>19</b>
10.1	Validade dos processamentos do teste de diagnóstico .....	21
10.1.1	Processamento de teste de diagnóstico válido (qualitativo) .....	21
10.1.2	Processamento de teste inválido (qualitativo).....	21
10.2	Interpretação dos resultados.....	22
10.2.1	Análise qualitativa .....	22
<b>11.</b>	<b>Avaliação do desempenho .....</b>	<b>22</b>

11.1	Sensibilidade analítica .....	23
11.2	Especificidade analítica.....	24
11.3	Precisão .....	25
11.4	Avaliação de diagnóstico .....	26
<b>12.</b>	<b>Limitações .....</b>	<b>27</b>
<b>13.</b>	<b>Controlo de qualidade .....</b>	<b>28</b>
<b>14.</b>	<b>Apoio técnico .....</b>	<b>28</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>28</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas comerciais e isenções de responsabilidade.....</b>	<b>29</b>
<b>17.</b>	<b>Explicação de símbolos .....</b>	<b>30</b>

## 1. Utilização prevista

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ADN específico de *Trypanosoma cruzi*.

## 2. Componentes do kit

**Tabela 1:** Componentes do kit

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

Internal Control = controlo interno

Positive Control = controlo positivo

Water (PCR grade) = água de PCR

## 3. Armazenamento

- O RealStar® Chagas 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 receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e 15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

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

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

- Instrumento PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos 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 vórtex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (ótico) 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

A doença de Chagas é uma infecção parasitária transmitida por vetores causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O parasita protozoário pertence à ordem Trypanomastida, a qual inclui parasitas obrigatórios flagelados unicelulares. A doença de Chagas é endêmica na América Central e na América do Sul, mas estima-se que estejam infetados 6 a 7 milhões de pessoas no mundo inteiro [1]. O protozoário é transmitido aos humanos através do contacto com fezes de insetos triatomíneos infetados, que durante a noite se alimentam do hospedeiro adormecido. As infecções podem também ocorrer por via oral [2], congénita [3] ou através de transfusões de sangue ou transplantes de órgãos contaminados [4,5]. A doença de Chagas apresenta-se em duas fases: aguda e crónica. A fase aguda dura cerca de dois meses e é normalmente uma doença febril autolimitada e assintomática, caracterizada por parasitemia elevada no sangue circulante. Se houver sinais e sintomas, normalmente são ligeiros e podem incluir: edema no local da infeção, febre, fadiga, erupção cutânea, edema das pálpebras (sinal de Romaña), cefaleia, náuseas, diarreia ou vômitos, gânglios inchados, aumento do tamanho do fígado ou do baço [6]. Se a fase aguda não for diagnosticada e não for tratada, a infeção persiste e pode avançar para a fase crónica. A fase crónica pode durar o resto da vida sem causar sintomas, ou evoluir para uma manifestação clínica em 10–30 % dos doentes. Os sinais e sintomas da fase crónica da doença de Chagas podem ocorrer 10 a 20 anos depois da infeção inicial, ou podem nunca ocorrer. Porém, em casos graves, os sinais e sintomas da doença de Chagas podem incluir: batimento cardíaco irregular, insuficiência cardíaca congestiva, paragem cardíaca súbita, dificuldade de deglutição devido ao esfago aumentado, dor abdominal ou obstipação, devido ao cólon aumentado [6]. Não existe uma norma de ouro definida para o diagnóstico da doença de Chagas. Na fase aguda da doença, a carga parasitária no sangue circulante é elevada e a doença de Chagas pode ser diagnosticada por microscopia de esfregaços de sangue corado por Giemsa [7]. No Center of Disease Control and Prevention (CDC, Centro de Controlo e Prevenção de Doenças), a deteção molecular do ADN de *T. cruzi* é feita atualmente usando uma combinação de três ensaios diferentes de PCR em tempo real. O diagnóstico molecular da doença de Chagas é realizado em casos de suspeita de transmissão por transfusão de sangue, por transplantes e de Chagas congénita.

A detecção molecular pode também ser útil para a detecção precoce do *T. cruzi* em dádivas de sangue e em recetores de transplantes de órgãos de dadores com doença de Chagas assintomática crónica [8].

- [1] World Health Organization (WHO) Chagas disease (American trypanosomiasis) Geneva: WHO; 2010.
- [2] Nobrega AA, García MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:653–5.
- [3] Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:29–32.
- [4] Tropical Disease Research, World Health Organization. Insect vectors and human health. Report of the scientific working group meeting. Geneva. Organization. 2003;23–5.
- [5] Grant IH, Gold J, Wittner M, Tanowitz H, Nathan C, Mayer K, et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med.* 1989;111:849–51.
- [6] World Health Organization (WHO), Chagas disease (American trypanosomiasis) (01.02.2018): Fact-Sheets –Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). viewed 02 October 2018.
- [7] Bonomo, R. & Salata, R. (2000). American Trypanosomiasis (Chagas's Disease: *Trypanosoma cruzi*). In R. Behrman, R. Kliegman, & H. Jenson, (Eds.), *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16th Edition (pp. 1046-1048). Philadelphia: W. B. Saunders.
- [8] Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn* 17(7):699-710.

## 6. Descrição do produto

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a detecção qualitativa do ADN específico de *Trypanosoma cruzi*.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga [Internal Control (controle interno)] para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia 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 detecção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com reporter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ADN do *T. cruzi* estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Internal Control (controle interno, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associadas a colorações distinguíveis permite a detecção paralela de ADN específico de *T. cruzi* e do Internal Control (controle interno) nos canais de detecção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

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

- Amplificação de PCR do ADN alvo e do Internal Control (controle interno)
- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 consiste em:

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

Internal Control = controle interno

Positive Control = controle positivo

Water (PCR grade) = água de PCR

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e a detecção de ADN específico de *T. cruzi* e do Internal Control (controlo interno) numa preparação de reação.

### 6.1 Instrumento PCR em tempo real

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para ser usado com os seguintes instrumentos PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

### 7. Avisos e precauções

*Leia atentamente as instruções de utilização antes de usar o produto.*

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes quanto a:
  - Integridade
  - Integralidade com respeito ao número, tipo e enchimento (consulte o capítulo 2. Componentes do kit)
  - Rotulagem correta
  - Congelamento à chegada

- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- Amostras devem ser tratadas sempre como infecciosas e/ou riscos biológicos, seguindo os procedimentos laboratoriais seguros.
- Use luvas de proteção descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular sempre que manusear amostras.
- Evite a contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) das amostras e dos componentes do kit.
- Use sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase com barreiras de aerossol.
- Use sempre luvas de proteção descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Use zonas de trabalho separadas e segregadas para (i) preparação de amostras, (ii) configuração da reação e (iii) atividades de amplificação/deteção. O fluxo de trabalho no laboratório deve prosseguir de forma unidirecional. Use sempre luvas descartáveis em cada zona e troque de luvas antes de entrar numa zona diferente.
- Dedique consumíveis e equipamento a zonas de trabalho separadas e não os mude de uma zona para a outra.
- Conserve o material positivo, e/ou potencialmente positivo, separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra tubos/placas de reação pós amplificação, para evitar contaminação com produtos de amplificação.
- Poderão ser testados controlos adicionais de acordo com as diretrizes e ou requisitos de regulamentos locais, estaduais e/ou federais, bem como de organizações de acreditação.
- Não aplique autoclave aos tubos de reação depois da PCR, porque não irá degradar o ácido nucleico amplificado e corre-se o risco de contaminar a zona de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.

- Descarte a amostra e os resíduos dos ensaios cumprindo os regulamentos de segurança aplicáveis localmente.

## 8. Procedimento

### 8.1 Preparação de amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

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 PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para extração de ácido nucleico:

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

Sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico também podem ser apropriados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 1 minuto a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, 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® Chagas PCR Kit 1.0 contém um Internal Control (controlo interno, IC) 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 PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (controlo interno)	1 µl	12 µl
<b>Volume do Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

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

Número de reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume do Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**ATENÇÃO**

*Se o IC [Internal Control (controlo interno)] tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.*

**ATENÇÃO**

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

**8.3 Preparação da reação**

- ▶ Pipette 20 µl do 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
Amostra ou controlo	10 µl
<b>Volume total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo e um controlo negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrifugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~ 3 000 rpm).

## 9. Programação dos instrumentos PCR em tempo real

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 em instrumentos PCR em tempo real específicos, contacte o nosso apoio técnico (consulte o capítulo 14. Apoio técnico).

### 9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência passiva	Nenhuma

### 9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do detetor	Reporter	Quencher
ADN específico do <i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (controlo interno, IC)	IC	JOE™	(Nenhum)

Dependendo do instrumento PCR em tempo real, o canal de fluorescência para detectar o fluoróforo JOE™ não se chama “JOE™”, mas, por ex., “VIC™” ou “Yellow”. Consulte a tabela 2 para informação sobre o canal de fluorescência a selecionar para a detecção do Internal Control (controle interno) incluído no RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

**Tabela 2:** Canal de detecção a selecionar para a detecção do Internal Control (controle interno) dependente do instrumento PCR em tempo real utilizado

Instrumento PCR em tempo real	Canal de detecção para o Internal Control (controle interno)
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
CFX96™ Real-Time PCR Detection System/ CFX96™ Dx System (Bio-Rad)	VIC™
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System/ CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)	VIC™
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)	Ex: 498/533 nm; Em: 580 nm
Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)	JOE™
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)	Yellow
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)	Yellow
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)	JOE™

### 9.3 Perfil de temperatura e aquisição de corante

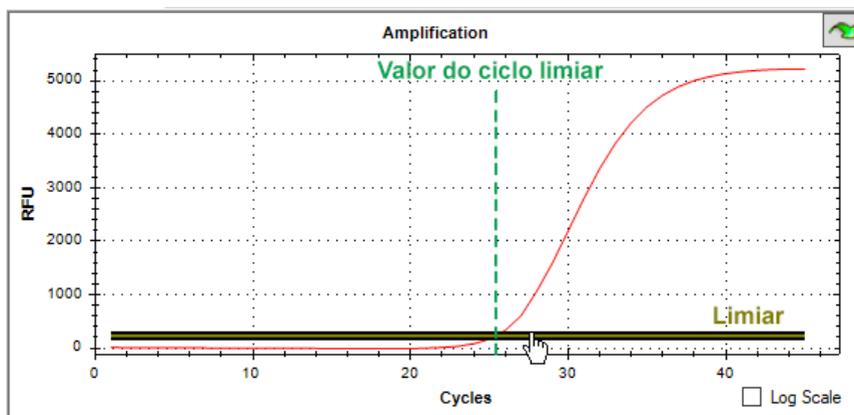
- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Repetições do ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:s]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de ciclo	45	-	95	00:15
			Sim	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Análise de dados

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

Para a análise dos resultados PCR em tempo real é necessário definir um limiar para cada canal de deteção por fluorescência individualmente. Para definir o limiar, este deve ser arrastado para a área exponencial da curva de amplificação como ilustrado na figura 1. Para mais pormenores sobre a definição de um limiar, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento PCR em tempo real. O valor do ciclo limiar (também denominado “crossing point” ou ciclo de quantificação) é o ponto em que o limiar intersecta a curva de amplificação.



**Figura 1:** Definição do limiar para um canal de detecção por fluorescência

Os sinais positivos são representados por um número de ciclos. Cada valor numérico acima de 0 e abaixo de 45 indica um sinal positivo. Dependendo do ciclador, o número de ciclos será apresentado em  $C_t$  (ciclo limiar),  $C_p$  ("crossing point") ou  $C_q$  (ciclo de quantificação). Os resultados positivos apresentam normalmente uma curva sigmoide (isto é, em forma de "S"). Para a representação específica de um sinal positivo, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento PCR em tempo real.

Os sinais negativos são representados, por ex., como "N/A" (o que significa não disponível), ausência de um valor numérico, indeterminado ou ausência de números digitais numéricos em geral. Para a representação específica de um sinal negativo, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento PCR em tempo real.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos 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 teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do controlo	Canal de deteção	
	FAM™	JOE™
Controlo positivo	$C_t < 37$	$C_t < 40$ ou nenhum $C_t^*$
Controlo negativo	Nenhum $C_t$	$C_t < 40$

\* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

### 10.1.2 Processamento de teste inválido (qualitativo)

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

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

## 10.2 Interpretação dos resultados

### 10.2.1 Análise qualitativa

Canal de detecção		Interpretação de resultados
FAM™	JOE™	
$C_t < 45^1$	Qualquer ou nenhum $C_t^*$	Foi detetado ADN específico de <i>T. cruzi</i> .
Nenhum $C_t$	$C_t < 40$	Não foi detetado ADN específico de <i>T. cruzi</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico de <i>T. cruzi</i> .
Nenhum $C_t$	$C_t > 40$ ou nenhum $C_t$	Inibição de PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

\* A deteção do Internal Control (controlo interno) no canal de deteção JOE™ não é necessária para os resultados positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ADN do *T. cruzi* na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Internal Control (controlo interno).

<sup>1</sup> *Trypanosoma rangeli* é uma espécie de *Trypanosoma* patogénico não humano, com a mesma prevalência e via de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Devido ao desenho do ensaio, as amostras positivas de *Trypanosoma rangeli* geram um sinal positivo no canal FAM™.

## 11. Avaliação do desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando um produto de PCR específico do *Trypanosoma cruzi*.

## 11.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 é definida como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ADN específico do *T. cruzi* que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95 %. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de uma série de diluições de um produto de PCR específico para *T. cruzi* contendo a região alvo (kDNA) utilizado pelo RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

**Tabela 3:** Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico de *T. cruzi*

Conc. de entrada [cópias/μl]	Número de réplicas	Número de positivos	Taxa de positividade [%]
31,600	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
5,000	24	24	100,0
3,160	48	46	95,8
2,500	24	23	95,8
1,500	24	9	37,5
1,000	48	2	4,2
0,316	24	0	0,0
0,100	24	0	0,0
0,032	24	0	0,0
0,010	24	0	0,0
0,003	24	0	0,0

A sensibilidade analítica do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi determinada por análise de probit:

- Para a deteção de ADN específico de *T. cruzi*, a sensibilidade analítica é de 2,8 cópias/μl [intervalo de confiança (CI) de 95 %: 2,5–3,4 cópias/μl]

## 11.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 é assegurada pela seleção cuidadosa dos oligonucleótidos (primers e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de sequências em relação a sequências publicamente disponíveis para assegurar a detecção de todos os genótipos de *T. cruzi* relevantes.

A especificidade analítica do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genômico extraído de agentes patogênicos relacionados com *T. cruzi* e outros agentes patogênicos que provocam sintomas semelhantes a *T. cruzi*.

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogênicos:

- Vírus Chikungunya
- Vírus da dengue
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Vírus da gripe A
- Vírus da gripe B
- Vírus do Nilo Ocidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Leishmania tropica*
- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*

### 11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi determinada como variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), variabilidade interensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e variabilidade entre lotes (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada combinando as 3 análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base nos valores do ciclo limiar ( $C_t$ ). Foram analisadas pelo menos 6 réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

**Tabela 4:** Dados de precisão para a detecção de ADN específico de *T. cruzi*

<i>T. cruzi</i>	Ciclo limiar médio ( $C_t$ )	Desvio padrão	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intraensaio	26,82	0,11	0,40
Variabilidade interensaio	27,14	0,28	1,04
Variabilidade entre lotes	26,85	0,09	0,34
Variabilidade total	27,03	0,28	1,04

**Tabela 5:** Dados de precisão para a detecção do Internal Control (controlo interno)

Internal Control (controlo interno)	Ciclo limiar médio ( $C_t$ )	Desvio padrão	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intraensaio	24,91	0,08	0,31
Variabilidade interensaio	24,99	0,07	0,28
Variabilidade entre lotes	24,92	0,07	0,28
Variabilidade total	24,96	0,08	0,32

## 11.4 Avaliação de diagnóstico

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 foi avaliado num estudo comparativo com o ensaio kDNA-PCR convencional in-house [com base em Norman *et al.* (2011) e Ramírez *et al.* (2015)]. Foram testadas retrospectivamente 55 amostras individuais de sangue total.

O RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 e o ensaio kDNA-PCR convencional in-house [com base em Norman *et al.* (2011) e Ramírez *et al.* (2015)] foram utilizados em combinação com o High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

Para a análise qualitativa, foram excluídas todas as amostras com um resultado inválido para um ou ambos os ensaios.

Os resultados das 55 amostras restantes são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0

		Ensaio kDNA-PCR convencional in-house [com base em Norman <i>et al.</i> (2011) e Ramírez <i>et al.</i> (2015)]	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® Chagas PCR Kit 1.0	POSITIVO	27	0
	NEGATIVO	0	28

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 em comparação com o ensaio kDNA-PCR convencional in-house [com base em Norman *et al.* (2011) e Ramírez *et al.* (2015)] para a detecção de ADN de *Trypanosoma cruzi* em doentes com doença de Chagas aguda, reativa ou congénita foram de 100 % (intervalo de confiança: 87,23 % a 100 %) e 100 % (intervalo de confiança: 87,66 % a 100 %), respetivamente.

## 12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para obter resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento de amostras adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do *T. cruzi* abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de detecção da presença dos agentes patogénicos.
- A parasitémia muito baixa associada a infeção crónica por *Trypanosoma cruzi* poderá conduzir a resultados falsos negativos.

- À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados do RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

### **13. Controlo de qualidade**

De acordo com o sistema de gestão da qualidade da Altona Diagnostics GmbH certificado pela EN ISO 13485, cada lote de RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

### **14. Apoio técnico**

Para apoio ao cliente, contacte o nosso apoio técnico através do:

**e-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

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

### **15. Bibliografia**

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terceira Edição. Mosby, 2010.

## 16. Marcas comerciais e isenções de responsabilidade

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); Maxwell® (Promega); MinElute®, QIAamp®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (QIAGEN); FAM™, JOE™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene).

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® Chagas PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao diagnóstico *in vitro*.

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

Não disponível em todos os países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

## 17. Explicação de símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de item de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante

Símbolo	Explicação
	Atenção: Destaca os procedimentos ou as instruções de funcionamento que, se não forem seguidos corretamente, podem resultar em lesões pessoais ou afetar o desempenho do produto. Contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência.
	Nota: Consiste em informações úteis para o utilizador mas que não são essenciais para a tarefa em questão.
	Versão

**Notas:**

**Notas:**

**Notas:**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

