

## Instruções de uso

# RealStar<sup>®</sup> Dengue RT-PCR Kit 2.0

01/2017 PT

# RealStar®

## Dengue RT-PCR Kit 2.0

Para utilização com

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



282013



96



01 2017



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

## Conteúdo

<b>1. Utilização Prevista .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Componentes do Kit .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Armazenamento .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....</b>	<b>7</b>
<b>5. Informação de Base .....</b>	<b>8</b>
<b>6. Descrição do Produto.....</b>	<b>9</b>
6.1 Instrumento de PCR em tempo real.....	11
<b>7. Avisos e Precauções .....</b>	<b>11</b>
<b>8. 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. Programação dos instrumentos de 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.....	18
<b>10. Análise de Dados .....</b>	<b>18</b>
10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	18
10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido.....	18
10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido .....	19
10.2 Interpretação dos Resultados .....	19
10.2.1 Análise Qualitativa .....	19

<b>11. Avaliação do Desempenho.....</b>	<b>21</b>
11.1 Sensibilidade Analítica .....	20
11.2 Especificidade Analítica .....	22
11.3 Precisão .....	23
<b>12. Limitações .....</b>	<b>24</b>
<b>13. Controlo de Qualidade.....</b>	<b>25</b>
<b>14. Apoio Técnico .....</b>	<b>25</b>
<b>15. Bibliografia .....</b>	<b>25</b>
<b>16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade .....</b>	<b>26</b>
<b>17. Explicação de Símbolos .....</b>	<b>27</b>

## 1. Utilização Prevista

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção qualitativa do ARN específico do vírus da dengue (DENV).

## 2. Componentes do Kit

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

Internal Control = Controle Interno

Positive Control = Controle Positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

## 3. Armazenamento

- O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 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
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

### NOTA



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



***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 *vírus da Dengue* (DENV) pertence à família *Flaviviridae*. Existem 4 serotipos conhecidos (DENV 1 - 4). O genoma de DENV ARN é de cadeia simples e tem uma orientação positiva [(+)ssRNA]. Os genes estão alocados num único segmento de aproximadamente 11 kb de comprimento. As extremidades 5' e 3' do genoma contêm sequências específicas que permitem a tradução direta e a síntese de proteína por ribossomas hospedeiros sem cap. Os flavivírus são vírus com invólucro com um diâmetro aproximado de 50 nm. O invólucro viral de proteína E medeia a ligação com o recetor e é o principal antigénio reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro. Após a entrada da partícula do vírus na célula, a replicação e a transcriptase ocorrem no citoplasma da célula hospedeira sem fases intermitentes dentro dos núcleos. Durante este processo são produzidas três proteínas estruturais (E, M e C) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2 A/B, NS3, NS4A/B, NS5). A libertação das partículas maduras do vírus resulta na formação no retículo endoplasmático e no transporte através do complexo de Golgi até à superfície da célula.

O vírus da Dengue é transmitido por vetores artrópodes (sobretudo *Aedes aegypti* e *A. albopictus*). Existem ciclos de vida urbanos e selváticos, o primeiro envolvendo apenas humanos e mosquitos e o segundo sobretudo animais selvagens e mosquitos. Infecções em humanos através de estirpes de ciclos selváticos são raras. Todos os quatro serotipos podem ser encontrados em todo o mundo em regiões tropicais onde está presente o vetor. Após a infeção com o DENV, o período de incubação é de 3 a 14 dias. Os primeiros sintomas da doença são febre, mal-estar geral e dor nos músculos e nas articulações. 80% das infeções são bastante moderadas e o desenvolvimento não é complexo. Em alguns doentes, a doença é mais grave e, por vezes, pode colocar o doente em risco de vida. O hospedeiro desenvolve imunidade protetora ao serotipo que causou a infeção. Em contraste, infeções secundárias com outros serotipos poderão causar uma doença ainda mais grave. Uma provável explicação mecanicista para este fenómeno poderá ser a entrada facilitada dependente de anticorpos de células imunes nas quais o vírus se pode replicar.

Isto torna o desenvolvimento de uma vacina particularmente complexo e, até ao momento, nenhuma vacina candidata foi aprovada em todos os testes clínicos. Não se encontra disponível medicação específica e o tratamento do doente está concentrado no tratamento sintomático. A deteção direta do vírus é possível na maioria dos doentes durante a primeira semana após o aparecimento dos sintomas. A deteção através da tecnologia RT-PCR em tempo real e de antigénio (NS1) são métodos sensíveis. Após a fase virémica serão detetadas IgM e IgG. Em muitos países a febre de Dengue é uma doença de declaração obrigatória e tem de ser registada junto da autoridade responsável.

### NOTA



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

## 6. Descrição do Produto

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção qualitativa do ARN específico do vírus da dengue (DENV). O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ARN do DENV 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 ARN específico do DENV e do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O primer e as sondas do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 são baseados em alinhamentos de sequência atuais (2010) de todos os quatro tipos de subtipos de vírus da dengue (1 – 4), permitindo a deteção (rastreamento) de ARN, mas não a diferenciação (tipagem) entre esses subtipos.

Mas, devido à elevada sensibilidade do teste de diagnóstico RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 *in vitro*, as amostras positivas muito baixas poderão não conter ARN suficiente para subtipagem.

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

- Transcritase reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 consiste em:

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

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, transcriptase reversa, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcritase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do DENV e do Controlo interno numa preparação de reacção.

## 6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

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

## 7. Avisos e Precauções

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

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
  - Integridade
  - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
  - Rotulagem correta
  - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e 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 laboratório e protecção 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.
- 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 daboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

## 8. Procedimento

### 8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0.

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

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados.

A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 deve ser validada pelo utilizador.

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

**ATENÇÃO**

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



*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® Dengue RT-PCR Kit 2.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

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

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controlo Interno (Internal Control)	1 µl	12 µl
<b>Volume da Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

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

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



**ATENÇÃO**

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



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

**8.3 Preparação da Reação**

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
<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 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® Dengue RT-PCR Kit 2.0 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
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
ARN específico do DENV	DENV	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	Controlo Interno	JOE™	(Nenhum)

### 9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

	Fase	Ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	00:45
			-	72	00:15

## 10. Análise de Dados

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 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

Para que um processamento de teste de diagnóstico seja **válido**, devem existir as seguintes condições de controlo:

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

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

#### 10.1.2 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido

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

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

## 10.2 Interpretação dos Resultados

### 10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ARN específico do DENV.
-	+	Não foi detetado o ARN específico do DENV. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do DENV.
-	-	RT-PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

\* Não é necessária a deteção do Controlo Interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados Positivos no canal de deteção FAM™. Uma carga elevada de ARN do DENV na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno (Internal control).

## 11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando séries de ARN transcrito *in vitro* quantificado.

### 11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (Limite de Detecção: LDD) do RealStar®Dengue RT-PCR Kit 2.0 define-se como a concentração (cópias por µl de eluato) de moléculas de ARN específico do DENV que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ARN transcrito *in vitro* quantificado.

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

Concentração inserida [cópias/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
31,622	12	12	100
10,000	18	18	100
3,162	18	17	94
1,000	18	7	39
0,500	18	4	22
0,316	18	6	33
0,100	18	0	0
0,032	18	1	6

Tabela 2: Resultados da RT-PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ARN específico do DENV serotipo 4

Concentração inserida [cópias/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,000	18	18	100
0,500	18	14	78
0,316	18	16	89
0,100	18	9	50
0,032	18	1	6
0,010	12	0	0
0,003	12	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para o serotipo 1 do vírus da dengue, a sensibilidade analítica é de 4,7 cópias/µl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 2,76 a 13,55 cópias/µl]
- Para o serotipo 4 do vírus da dengue, a sensibilidade analítica é de 0,7 cópias/µl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,44 a 1,48 cópias/µl]

## 11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos relevantes do DENV serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste de diferentes ADN/ARN genómicos extraídos de outros flavivírus, de outros agentes patogénicos transmitidos por via sanguínea e de agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes.

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Virus de la hepatitis A
- Virus da hepatitis C
- Virus da hepatitis E
- Virus do Nilo Occidental
- Virus da febre amarilla
- Virus Usutu
- Virus da encefalitis transmitida por garrapatas
- Virus da encefalitis do valle do Murray
- Virus da encefalitis japonesa
- Virus del Zika

## 11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

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

Tabela 3: Dados de precisão para a deteção de ARN específico do DENV

DENV	Ciclo limiar médio ( $C_t$ )	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	35,89	0,16	0,44
Variabilidade Inter-ensaio	35,88	0,15	0,40
Variabilidade Inter-lote	35,59	0,33	0,93
Variabilidade Total	35,69	0,31	0,88

Tabela 4: Dados de precisão para a deteção do Controlo Interno (Internal Control)

Controlo Interno (Internal Control)	Ciclo limiar médio ( $C_t$ )	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	29,66	0,14	0,47
Variabilidade Inter-ensaio	30,38	0,77	2,52
Variabilidade Inter-lote	30,43	0,71	2,34
Variabilidade Total	30,17	0,69	2,29

## 12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores RT-PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do DENV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 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® Dengue RT-PCR Kit 2.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

## 14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

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

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

## 15. Bibliografia

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

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

## 16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (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® Dengue RT-PCR Kit 2.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC 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.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

## 17. Explicação de Símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

**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)

