

Instruções de uso

RealStar[®] Dengue RT-PCR Kit 3.0

01/2019 PT

RealStar[®]

Dengue RT-PCR Kit 3.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

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

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

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

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



283013



96



01 2019



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	6
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	10
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	11
7.	Avisos e Precauções	12
8.	Procedimento	13
8.1	Preparação de Amostras.....	13
8.2	Preparação da Master Mix.....	14
8.3	Preparação da Reação	16
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	17
9.1	Definições	17
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	18
10.	Análise de Dados	18
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido	19
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	19
10.2	Interpretação dos Resultados	20
10.2.1	Análise Qualitativa	20
11.	Avaliação do Desempenho.....	20

11.1	Sensibilidade Analítica	20
11.2	Especificidade Analítica	21
11.3	Precisão	22
12.	Limitações	23
13.	Controlo de Qualidade.....	24
14.	Apoio Técnico	24
15.	Bibliografia	24
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	25
17.	Explicação de Símbolos	26

1. Utilização Prevista

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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 (IC) = Controle interno

Positive Control (PC) = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.

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

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (consulte o capítulo 8.2 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



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

NOTA



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

O vírus Dengue (DENV) é uma espécie do género *Flavivirus* que faz parte da família *Flaviviridae*. Esta espécie pode dividir-se em quatro serotipos conhecidos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. [1] O genoma é composto por ARN de cadeia simples, positivo, com cerca de 10,7 kb de comprimento, num envelope de nucleocapsídeo e coberto por um envelope lipídico. [2] O DENV é um arbovírus transmitido pelo mosquito fêmea da espécie *Aedes*. Esta espécie de mosquito específica era originalmente endémica na Ásia, tendo-se no entanto propagado rapidamente, na atualidade, pela América do Norte e do Sul, África, Europa e Austrália, bem como para várias ilhas no Oceano Pacífico e Índico. [4]

Nestas regiões mais de 50 milhões de pessoas são infetadas todos os anos por DENV, das quais aproximadamente 24 000 sucumbem à infeção. Como tal, o DENV é um dos patógenos virais mais perigosos para o ser humano transmitido por mosquitos. A patogenicidade do DENV está principalmente associada à proteína de envelope que medeia a ligação e a entrada do vírus na célula hospedeira. Além disso, esta proteína influencia respostas imunitárias do hospedeiro, causando lesões nas células. [3] As infeções por DENV causam frequentemente sintomas não específicos, incluindo febre e dores articulares severas, que normalmente desaparecem sem complicações ao fim de dois a sete dias. No entanto, a infeção pode também conduzir a outras condições mais graves, incluindo febre hemorrágica de dengue (FHD) e síndrome do choque de dengue (SCD), que são frequentemente o resultado de infeções sequenciais com múltiplos serotipos. [2]

Quando uma infeção por DENV causa febre hemorrágica de dengue (FHD), os sintomas incluem febre alta, falência circulatória e fenómenos hemorrágicos. Além disso, é possível os doentes desenvolverem uma encefalite, insuficiência hepática e miocardite. Os doentes afetados podem também desenvolver um choque ao qual podem sucumbir, com queda da tensão arterial e pulsação. Por outro lado, as infeções por DENV podem também causar a síndrome de choque de dengue (SCD), que é acompanhada de fuga plasmática e vômitos persistentes, que pode causar um choque fatal. Esta síndrome é uma condição muito grave com uma taxa de mortalidade que chega aos 47%. [3] Até ao momento não há tratamento específico para doentes infetados por DENV, e é por isso que os doentes só

podem ser tratados com medidas de suporte para atenuar os sintomas e prevenir o choque. [5]

O diagnóstico clínico da infecção por DENV pode ser um desafio, devido aos sintomas frequentemente não específicos da infecção. Por conseguinte, é essencial que o diagnóstico seja confirmado por laboratório. Um dos métodos mais frequentemente usados para detecção do vírus é o RT-PCR, um método rápido, sensível e fiável que pode apresentar resultados desde o despoletar da doença. [6] Uma infecção por um dos quatro serotipos de DENV não confere imunidade cruzada aos outros serotipos, motivo pelo qual é possível a infecção por quatro serotipos de DENV, deixando os doentes de áreas endémicas particularmente em risco. As infeções secundárias por outros serotipos levam frequentemente ao desenvolvimento de condições mais graves, devido aos efeitos de intensificação mediados por anticorpos. Por conseguinte, é necessário um grande esforço para desenvolver uma vacina que medeie a imunidade contra todos os, ou vários, serotipos em simultâneo. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina como esta é um desafio. Até ao momento não se conseguiu desenvolver a vacina porque não é possível neutralizar integralmente os anticorpos já existentes contra os outros serotipos. [7]

- [1] Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (1998). American Society for Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. Doi: 10.1128/CMR.11.3.480
- [2] Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R (1999). Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. American Society for Microbiology. *Journal of Virology*. Vol.73: 4738-4747.
- [3] Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL (2004). Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*. 80: 588-601.
- [4] Lambrechts L, Scott TW and Gubler DJ (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus transmission. *Plos neglected tropical diseases*. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000646.
- [5] Rajapakse S, Rodrigo C and Rajapakse A. Treatment of dengue fever. *Infection and Drug Resistance*. 2012. 5: 103-112.
- [6] Muller DA, Depelsenaire ACI and Young PR (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 215 (suppl_2): 89-95.

- [7] Gosh A and Dar L (2015). Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. Indian Journal of Medical Microbiology 33: 3-15.

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 uma acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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).

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

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

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

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

- Transcriptase reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Detecção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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 transcriptase reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ARN específico do DENV assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

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

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

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

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Rotulagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (ADNase/ARNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 .

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

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (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 3.0 deve ser validada pelo utilizador.

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

ATENÇÃO



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

ATENÇÃO



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 contém um Controlo Interno heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o

procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um controlo de inibição de RT-PCR.

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

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controlo Interno	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

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

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

ATENÇÃO

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

ATENÇÃO

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

8.3 Preparação da Reação

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

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que 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 3.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- ▶ Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Ramp Rate	Predefinição
Referência passiva	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- ▶ Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do DENV	DENV	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

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

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

10. Análise de Dados

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido

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

ID do 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 Inválido (qualitativo)

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

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 foi efetuada utilizando ARN genómica de vírus da dengue serotipo 1.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 define-se como a concentração (cópias/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 quantificado do .

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

Concentração inserida [cópias/ μ l]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,200	24	24	100
100,000	23	23	100
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	17	70,8
1,000	24	12	50
0,316	24	2	8,3
0,100	24	0	0

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

- Para a deteção de ARN específico do DENV, a sensibilidade analítica é de 7,04 cópias/ μ l [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 4,37 - 15,39 cópias/ μ l]

11.2 Especificidade Analítica

Reactividade

A especificidade analítica em relação a reactividade do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN genómico extraído do serotipos do vírus da dengue seguintes:

- Vírus da dengue 1
- Vírus da dengue 2
- Vírus da dengue 3
- Vírus da dengue 4

Reactividade cruzada

A especificidade analítica em relação a reactividade cruzada do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de vírus relacionados com os vírus da dengue e outros agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes aos vírus da dengue.

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

- Vírus da Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo
- Vírus Chikungunya
- Vírus Ebola
- Vírus da hepatite C
- Vírus da encefalite japonesa
- Vírus Lassa
- Vírus Marburg
- Vírus da encefalite Murray Valley
- Vírus Usutu
- Vírus do Nilo Ocidental
- Vírus da febre amarela
- Vírus Zika
- *Plasmodium falciparum*

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Tabela 2: Dados de precisão para a detecção de ARN específico do DENV

DENV	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	31,64	0,19	0,61
Variabilidade Inter-ensaio	31,37	0,31	1,00
Variabilidade Inter-lote	31,35	0,28	0,89
Variabilidade Total	31,45	0,28	0,90

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

Controlo Interno	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	30,17	0,17	0,56
Variabilidade Inter-ensaio	30,14	0,13	0,43
Variabilidade Inter-lote	29,96	0,26	0,87
Variabilidade Total	30,01	0,23	0,76

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 DENV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de detecção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade altaona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Bibliografia

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

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

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

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

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

O RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 é um kit de diagnóstico com marcação CE de acordo com a diretiva europeia de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC

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

Não disponível em todos os países.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

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

Notes:

Notes:

Notes:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

