

Instruções de uso

RealStar[®] EHEC PCR Kit 2.0

01/2017 PT

RealStar®

EHEC 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)



292013

96

01 2017

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

Conteúdo

1. Utilização Prevista	6
2. Componentes do Kit	6
3. Armazenamento	6
4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5. Informação de Base	8
6. Descrição do Produto.....	9
6.1 Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7. Avisos e Precauções	11
8. Procedimento	12
8.1 Preparação de Amostras.....	12
8.2 Preparação da Master Mix.....	14
8.3 Preparação da Reação	15
9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	16
9.1 Definições	16
9.2 Detetores de fluorescência (corantes)	17
9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	17
10. Análise de Dados	18
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	18
10.2 Interpretação dos Resultados	19
10.2.1 Análise Qualitativa	19

11. Avaliação do Desempenho.....	20
11.1 Sensibilidade Analítica	20
11.2 Especificidade Analítica	22
11.3 Precisão	24
12. Limitações	25
13. Controlo de Qualidade.....	26
14. Apoio Técnico	26
15. Bibliografia	26
16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	27
17. Explicação de Símbolos	28

1. Utilização Prevista

O RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e diferenciação do ADN específico para o toxina Shiga 1 (*stx1*) e toxina Shiga 2 (*stx2*) da *Escherichia coli* e o antígeno H do plasmídeo de invasão (*ipaH*) da *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Shigella* ssp..

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® EHEC 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

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) são bactérias patogénicas para humanos, caracterizadas pela capacidade de produzir a toxina Shiga 1 e/ou toxina Shiga 2. Os sintomas de uma infeção EHEC podem incluir colites hemorrágicas e a síndrome hemolítico-urémica (SHU). As estirpes de EHEC possuem apenas um ou ambos dos genes que codificam a toxina Shiga (*stx1* e/ou *stx2*). A codificação do gene para a toxina Shiga 1 (*stx1*) também se encontra presente na *Shigella dysenteriae* tipo 1, a qual pode causar os mesmos sintomas que a EHEC. Nem todas as variantes da toxina Shiga 1 e a toxina Shiga 2 estão associadas a doenças graves, por ex., *stx1c*, *stx1d*, *stx2f* e *stx2ev* [1, 2, 3, 4]. Através do marcador "antigénio H do plasmídeo de invasão" (*ipaH*) *Shigella* *ssp.* pode ser distinguida da EHEC. A *ipaH* também se encontra presente na *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) que não possui nenhum dos genes que codificam a toxina Shiga, mas também podem causar diarreia com sangue.

É essencial o diagnóstico preciso da infeção EHEC para a gestão de doentes, controlo de infeções e epidemiologia.

- [1] http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung_des_virulenzpotenzials_von_shigatoxin_2estx2_e_bildenden_e_coli_staemmen.pdf.
- [2] Friedrich AW1, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002 Jan 1;185(1):74-84. Epub 2001 Dec 14.
- [3] Scheiring J1, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol.* 2008 Oct;23(10):1749-60. doi: 10.1007/s00467-008-0935-6. Epub 2008 Aug 13.
- [4] Friesema I1, van der Zwaluw K, Schuurman T, Kooistra-Smid M, Franz E, van Duynhoven Y, van Pelt W. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Euro Surveill.* 2014 May 1;19(17):26-32.

6. Descrição do Produto

O RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a deteção e diferenciação do ADN específico para o toxina Shiga 1 (*stx1*) e toxina Shiga 2 (*stx2*) da *Escherichia coli* e o antigénio H do plasmídeo de invasão (*ipaH*) da *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Shigella* *ssp.* O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

As variantes da toxina Shiga *stx1c*, *stx1d*, *stx2f* e *stx2ev*, sobre as quais não foi demonstrada uma associação a doenças graves, não podem ser detetadas com este teste.

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

As sondas específicas para o ADN do *stx1* estão marcadas com o fluoróforo Cy[®]5, as sondas específicas para o ADN do *stx2* estão marcadas com o fluoróforo FAM[™] e as sondas específicas para o ADN do *ipaH* estão marcadas com o fluoróforo ROX[™]. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE[™].

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ADN específico do *stx1*, *stx2* e *ipaH*, assim como a deteção do Controlo Interno nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

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

O RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo [*stx1* + *stx2*+ *ipaH*]
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção de alvos do ADN específico do *stx1*, do *stx2* e *ipaH*, assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® EHEC 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 de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nuclease (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.
- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.

- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- 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.

NOTA

As variantes da toxina Shiga *stx1c*, *stx1d*, *stx2f* e *stx2ev*, sobre as quais não foi demonstrada uma associação a doenças graves, não podem ser detetadas com este teste

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® EHEC PCR Kit 2.0.

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 de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a 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)

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

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

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

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

- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

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

ATENÇÃO



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



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

8.3 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 do controlo (controlo positivo ou negativo).

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

- ▶ Certifique-se de que são utilizados todos os controlos positivos e pelo menos 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® EHEC 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
ADN específico do <i>stx1</i>	<i>stx1</i>	Cy [®] 5	(Nenhum)
ADN específico do <i>stx2</i>	<i>stx2</i>	FAM™	(Nenhum)
ADN específico do <i>ipaH</i>	<i>ipaH</i>	ROX™	(Nenhum)
Controlo Interno	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 Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	0:15
			sim	58	0:45

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® EHEC 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			
	Cy ⁵	FAM TM	ROX TM	JOE TM
Controlo Positivo [<i>stx1</i> + <i>stx2</i> + <i>ipaH</i>]	+	+	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOETM 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
Cy ⁵	FAM TM	ROX TM	JOE TM	
+	-	-	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>stx1</i> .
-	+	-	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>stx2</i> .
+	+	-	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>stx1</i> e do <i>stx2</i> .
-	-	+	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>ipaH</i> .
+	-	+	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>stx1</i> e do <i>ipaH</i> .
-	+	+	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>stx2</i> e do <i>ipaH</i> foi detetado.
-	-	-	+	Não foi detetado o ADN específico do <i>stx1</i> nem do <i>stx2</i> ou do <i>ipaH</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis destes ADN específicos.
-	-	-	-	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 JOETM para resultados positivos no canal de deteção Cy⁵, FAMTM ou ROXTM. Uma carga elevada de ADN alvo na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno (Internal control).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação analítica do desempenho do RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 foi efetuada utilizando ADN quantificado específico de *stx1*, *stx2* e *ipaH*.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (limite de detecção: LDD) do RealStar®EHEC PCR Kit 2.0 define-se como a concentração de ADN específico de *stx1*, *stx2* e/ou *ipaH* que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ADN específico de *stx1*, *stx2* e *ipaH*.

Tabela 1: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à detecção de ADN específico do *stx1*

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	36	36	100
3,162	36	36	100
1,5	36	36	100
1,000	36	36	100
0,5	36	36	100
0,316	36	31	86
0,100	36	20	56
0,032	36	7	19
0,010	36	4	11
0,003	36	0	0

Tabela 2: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à detecção de ADN específico do *stx2*

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,5	18	18	100
1,000	18	18	100
0,5	18	17	94
0,316	18	17	94
0,100	18	7	39
0,032	18	4	22
0,010	18	1	16
0,003	18	2	11

Tabela 3: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à detecção do *ipaH* específico ADN

Concentração inserida [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,5	18	18	100
1,000	18	17	94
0,5	18	15	83
0,316	18	12	67
0,100	18	7	39
0,032	18	1	6
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a detecção de ADN específico do *stx1*, a sensibilidade analítica é de 0,48 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,33 cópias/μl a 0,77 cópias/μl]
- Para a detecção de ADN específico do *stx2*, a sensibilidade analítica é de 0,69 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,30 cópias/μl a 3,92 cópias/μl]
- Para a detecção de ADN específico do *ipaH*, a sensibilidade analítica é de 0,96 cópias/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,63 cópias/μl a 1,88 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® EHEC 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 EHEC serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 foi avaliada através do teste a um painel de ADN e ARN extraído de diferentes agentes patogénicos gastrointestinais e flora comensal encontrados nos intestinos e nas fezes.

O RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- | | |
|-----------------------|-------------------------------|
| • Astrovirus | • Norovirus (GII) |
| • Virus da hepatite A | • Rotavirus |
| • Virus da hepatite E | • Virus Sapporo |
| • Adenovirus | • <i>Campylobacter coli</i> |
| • Enterovirus 71 | • <i>Campylobacter jejuni</i> |
| • Norovirus (GI) | • <i>Campylobacter lari</i> |

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| • <i>Citrobacter freundii</i> | • <i>Listeria seeligeri</i> |
| • <i>Clostridium difficile</i> | • <i>Listeria welshimeri</i> |
| • <i>Entamoeba histolytica</i> | • <i>Proteus mirabilis</i> |
| • <i>Escherichia coli</i> | • <i>Proteus vulgaris</i> |
| • <i>Giardia lamblia</i> | • <i>Salmonella enteritidis</i> |
| • <i>Listeria innocua</i> | • <i>Salmonella typhimurium</i> |
| • <i>Listeria ivanovii</i> | • <i>Serratia marcescens</i> |
| • <i>Listeria monocytogenes</i> | • <i>Yersinia enterocolitica</i> |

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® EHEC 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 em termos de desvio padrão e coeficiente de variação com base nos valores C_t da toxina Shiga 1 (*stx1*), toxina Shiga 2 (*stx2*) e do ADN específico de antígeno H do plasmídeo de invasão (*ipaH*) e do Controlo Interno (Internal Control). Foram analisadas doze réplicas (*stx1*) e seis réplicas (*stx2*, *ipaH*) por amostra e por ensaio.

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção de ADN específico do *stx1*, *stx2* e *ipaH*

<i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>ipaH</i>		Ciclos limiares médios (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	<i>stx1</i>	28,48	0,09	0,31
	<i>stx2</i>	28,51	0,13	0,45
	<i>ipaH</i>	29,23	0,12	0,41
Variabilidade Inter-ensaio	<i>stx1</i>	28,46	0,09	0,30
	<i>stx2</i>	28,54	0,11	0,40
	<i>ipaH</i>	29,15	0,16	0,54
Variabilidade Inter-lote	<i>stx1</i>	28,31	0,20	0,71
	<i>stx2</i>	28,42	0,17	0,60
	<i>ipaH</i>	29,20	0,09	0,32
Variabilidade Total	<i>stx1</i>	28,35	0,18	0,63
	<i>stx2</i>	28,47	0,17	0,58
	<i>ipaH</i>	29,15	0,13	0,44

Tabela 5: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control)

Controlo Interno (Internal Control)	Ciclos limiares médios (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	28,71	0,21	0,73
Variabilidade Inter-ensaio	28,46	0,34	1,19
Variabilidade Inter-lote	27,97	0,81	2,88
Variabilidade Total	28,05	0,67	2,40

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma *ipaH*, *stx1* e/ou *stx2* abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® EHEC 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® EHEC 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

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®, 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® EHEC 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 do lote
	Cor cap
	Número do produto
	Índice
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

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

www.altona-diagnostics.com

