

Instruções de uso

RealStar[®] HHV-6 PCR Kit 1.0

09/2018 PT

RealStar[®]

HHV-6 PCR Kit 1.0

Para utilização com

m2000rt (Abbott Diagnostics)

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)



311013



96



09 2018



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.....	8
5.	Informação de Base	9
6.	Descrição do Produto.....	9
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	12
6.2	Tipos de amostras.....	12
7.	Avisos e Precauções	12
8.	Procedimento	14
8.1	Preparação de Amostras.....	14
8.2	Preparação da Master Mix.....	15
8.3	Preparação da Reação	17
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	18
9.1	Definições	18
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	18
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	19
10.	Análise de Dados	19
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	19
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	19
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	20
10.1.3	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)	20
10.1.4	Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo).....	21
10.2	Interpretação dos Resultados	21

10.2.1	Análise Qualitativa	21
10.2.2	Análise Quantitativa	22
11.	Avaliação do Desempenho.....	23
11.1	Sensibilidade Analítica	24
11.2	Especificidade Analítica	26
11.3	dIntervalo linear.....	26
11.4	Precisão	29
11.5	Avaliação de Diagnóstico.....	30
12.	Limitações	31
13.	Controlo de Qualidade.....	32
14.	Apoio Técnico	32
15.	Bibliografia	32
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	33
17.	Explicação de Símbolos.....	34

1. Utilização Prevista

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para deteção, diferenciação e quantificação de ADN específico do herpesvírus humano 6A (HHV-6A) e do herpesvírus humano 6B (HHV-6B).

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	QS1-4*	4	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

* O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 contém Padrões de Quantificação (QS) do HHV-6A e do HHV-6B em quatro concentrações diferentes (consulte o Capítulo 6. Descrição do Produto)

Internal Control = Controlo interno

Water (PCR grade) = Água adequada para PCR

3. Armazenamento

- O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (ver 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 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 nome *vírus herpes humano 6* (HHV-6) é utilizado como descrição geral para os dois subtipos intimamente relacionados: HHV-6A e HHV-6B. A infecção primária com HHV-6 ocorre tipicamente antes dos dois anos de idade e, após a mesma, o vírus permanece latente no corpo. Os sintomas variam entre diarreia, febre e exantema súbito infantil (mais conhecido como roséola). A primeira infecção pode, raramente, causar convulsões febris, encefalite ou convulsões intratáveis.

O HHV-6 latente pode ser reativado numa fase posterior da vida. A sua reativação tem sido associada a muitas manifestações clínicas que podem ocorrer em vários locais por todo o corpo, incluindo o cérebro, pulmões, coração, rins e trato gastrointestinal. Embora seja rara, a reativação do HHV-6 no cérebro pode causar disfunção cognitiva, deficiência permanente e morte.

Ao passo que o HHV-6B pode causar problemas em doentes imunocomprometidos e em crianças nos EUA, Japão e Europa, o HHV-6A é predominante nas crianças em África. O último é também mais frequente em doentes com doenças neurológicas crónicas, incluindo doenças neuroinflamatórias, tais como a esclerose múltipla (MS) e a romboencefalite.

6. Descrição do Produto

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para deteção, diferenciação e quantificação de ADN específico do herpesvírus humano 6A (HHV-6A) e do herpesvírus humano 6B (HHV-6B).

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

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo

específicas para a detecção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ADN de HHV-6A estão marcadas com o fluoróforo FAM™, enquanto as sondas específicas do ADN de HHV-6B estão marcadas com o fluoróforo Cy®5. A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do ADN específico do HHV-6A e HHV-6B, assim como a detecção do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de detecção 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 (Internal Control)
- Detecção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 consiste em:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4*
- Water (PCR grade)

* Padrões de Quantificação (QS) em quatro concentrações diferentes

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, sais de magnésio, primers e sondas) para permitir a amplificação mediada por PCR e para a detecção do ADN específico de HHV-6A, ADN específico de HHV-6A e HHV-6B e um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padrão do ADN específico

do HHV-6A e do HHV-6B. O Padrão de Quantificação para o ADN específico do HHV-6B foi calibrado segundo a 1.ª Norma Internacional da OMS para o ADN do vírus herpes humano 6B (HHV-6B) para os ensaios com base nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) (NIBSC, código: 15/266) [1].

Para calibrar o material positivo específico do HHV-6A do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0, foi utilizado um ensaio de detecção de ácido nucleico não diferenciador de HHV-6A e de HHV-6B (kit RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). A calibração foi realizada através da análise da linha paralela com o material positivo específico do HHV-6A e a 1.ª Norma Internacional da OMS para o ADN do vírus herpes humano 6B (HHV-6B) (NIBSC, código: 15/266). A calibração foi confirmada utilizando o kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0.

Os Padrões de Quantificação podem ser utilizados individualmente como controlos positivos ou em conjunto para gerar uma **curva padrão**, que pode ser utilizada para determinar a concentração do ADN específico do HHV-6A e/ou do ADN específico do HHV-6B na amostra.

- [1] Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report 217; WHO/BS/2017.2321.

As normas de quantificação têm as seguintes concentrações:

Padrão de Quantificação	Concentração [UI/μl]	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	1,00E+04	1,00E+04
QS2	1,00E+03	1,00E+03
QS3	1,00E+02	1,00E+02
QS4	1,00E+01	1,00E+01

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para que ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- 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)

6.2 Tipos de amostras

Os seguintes tipos de amostras foram validados com o kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0:

- Plasma EDTA humano
- Sangue total humano

Caso seja aplicado um procedimento apropriado de extração de ácido nucleico, podem ser utilizados tipos de amostras adicionais juntamente com o kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0. A adequabilidade do procedimento de extração de ácido nucleico tem de ser validada pelo utilizador.

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)
 - Etiquetagem 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 nocivos, 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.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o kit RealStar® HHV-6 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)

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico. A adequabilidade do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 tem de 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 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 kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, 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
Volume do Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ 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 (CI) **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de espécime/lise. O volume do IC 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 IC por amostra à mistura de tampão de espécime/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
Volume do Master Mix	20 µl	240 µl

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

- ▶ Pipete 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 (padrão de quantificação, controlo positivo ou negativo).

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

- ▶ Certifique-se de que cada Controlo Positivo (QS) e pelo menos um Controlo Negativo é utilizado por Master Mix e processamento.
- ▶ Para fins de quantificação, cada um (HHV-6A e HHV-6B) dos Padrões de Quantificação (QS1 a QS4) deve ser utilizado.
- ▶ 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ADN específico do HHV-6A	HHV-6A	FAM™	(Nenhum)
ADN específico do HHV-6B	HHV-6B	Cy®5	(Nenhum)
Internal Control (controlo interno)	IC	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	Retenção	1	-	95	10:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	01:00

10. Análise de Dados

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

Um teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controle	Canal de Detecção		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Controlo Positivo [HHV-6A e HHV-6B]	+	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	+

* 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.

10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo)

Um **quantitativo** de diagnóstico é **válido**, se existirem todas as condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **qualitativo válido** [consulte o capítulo 10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)]. Os resultados de **quantificação** são **válidos** se a **curva padrão** gerada atinge o valor do parâmetro seguinte:

Parâmetro de Controlo	Valor Válido
R quadrado (R ²)	≥ 0.98

NOTA**i**

Nem todos os instrumentos PCR em tempo real apresentam o valor quadrado de R (R^2). Para informações pormenorizadas, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

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

No caso de um teste 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™	Cy®5	JOE™	
+	+ ¹	+ [*]	Foi detetado ADN específico do HHV-6A e do HHV-6B.
+	- ¹	+ [*]	Foi detetado ADN específico do HHV-6A.
-	+	+ [*]	Foi detetado ADN específico do HHV-6B.
-	-	+	Não foi detetado ADN específico do HHV-6A nem do HHV-6B. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do HHV-6A ou do HHV-6B.

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
FAM™	Cy®5	JOE™	
-	-	-	Inibição da PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste 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™ nem no canal de deteção Cy®5. Uma carga elevada de ADN de HHV-6A e/ou de HHV-6B na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno (Internal Control).
- ¹ Devido a novos dados de sequência, não é possível excluir a reatividade cruzada do sistema de deteção específico do HHV-6B com algumas estirpes de HHV-6A. Estas estirpes irão provocar um sinal fraco no canal de deteção (Cy®5) do HHV-6B, para além do sinal no canal de deteção (FAM™) do HHV-6A.

10.2.2 Análise Quantitativa

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para poder gerar uma **curva padrão** para análise quantitativa, estes têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (ver capítulo 6. Descrição do Produto). Usando **padrões** de concentrações conhecidas, é possível gerar uma curva padrão para análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \text{registro } (N_0) + b$$

C_t = Ciclo Limiar
 m = Inclinação
 N_0 = Concentração inicial
 b = Intersecção

Obtidas a partir da curva padrão, é possível quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.

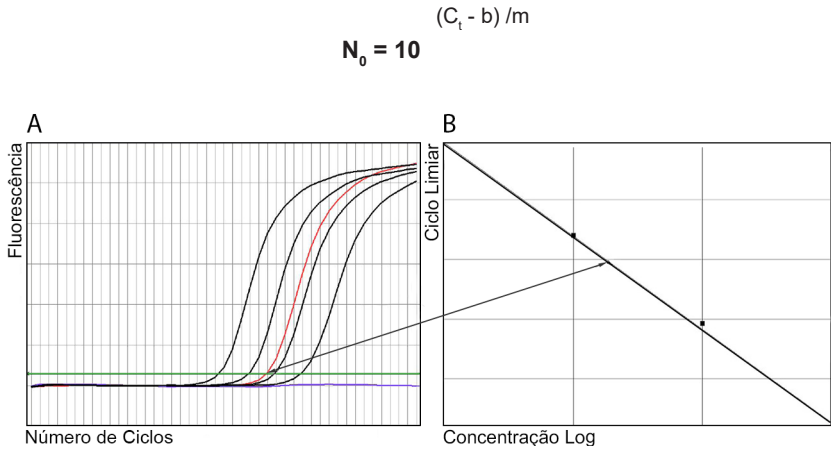


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelha) e uma amostra negativa (azul) apresentadas no Gráfico de Amplificação [A] e na análise de Curva Padrão [B]

NOTA



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

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

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando ADN específico do HHV-6A (estirpe GS) e ADN específico do HHV-6B (estirpe Z-29) quantificados.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 é definida como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ADN específico do HHV-6A ou do HHV-6B que podem ser detetadas com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada por análise de séries de diluições de ADN do HHV-6A e de ADN do HHV-6B ADN quantificados.

Tabela 1: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do HHV-6A

Conc. de Entrada [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	30	30	100
3,162	30	30	100
1,5	30	30	100
1,000	30	28	93
0,5	30	23	77
0,316	30	17	57
0,100	30	13	43
0,032	30	4	13
0,010	30	2	7
0,003	30	0	0
0,001	30	0	0

Tabela 2: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do HHV-6B

Conc. de Entrada [cópias/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,5	24	23	95
1,000	28	26	93
0,5	24	21	88
0,316	24	13	54
0,100	24	8	33
0,032	24	4	17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0
0,001	24	0	0

A sensibilidade analítica do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção de ADN específico do HHV-6A, a sensibilidade analítica é de 1,49 cópias/μl eluato [intervalo de confiança (IC) de 95%: 0,98 – 2,63 cópias/μl]
- Para a deteção de ADN específico do HHV-6B, a sensibilidade analítica é de 1,35 cópias/μl eluato [intervalo de confiança (IC) de 95%: 0,89 – 2,47 cópias/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados por análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos de HHV-6A e HHV-6B relevantes serão detetados.

O kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogênicos:

- Vírus BK
- Citomegalovírus
- Vírus Epstein-Barr
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Vírus herpes humano 7
- Vírus herpes humano 8
- Parvovírus humano B19
- Vírus JC
- Vírus Varicella-Zoster

11.3 Intervalo linear

O intervalo linear do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 foi avaliado analisando uma série de diluições logarítmicas do ADN específico do HHV-6A e do HHV-6B utilizando concentrações entre 1E+08 e 1E+00 cópias/μl. Foram analisadas pelo menos seis réplicas por diluição

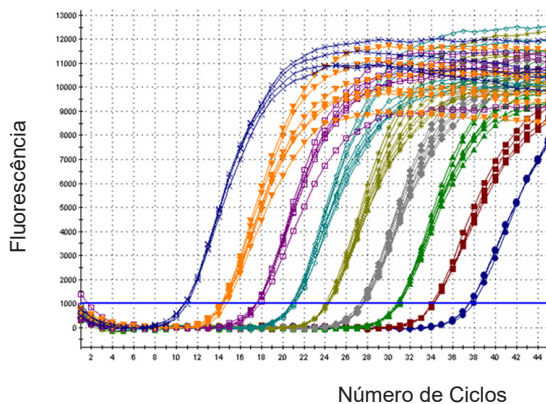
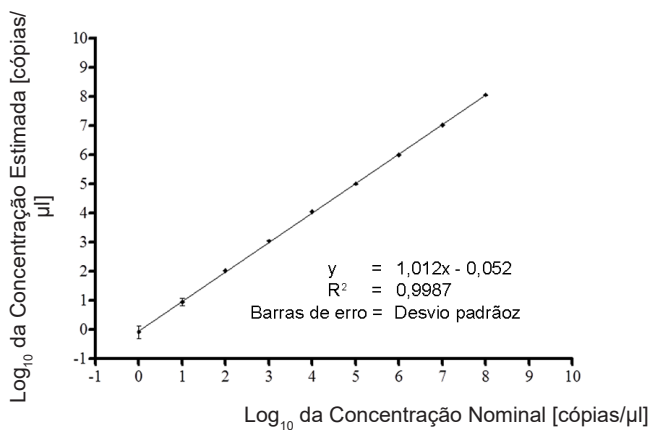
A**B**

Figura 2: Curvas de amplificação [A] e regressão linear de [B] uma série de diluições analisada de ADN específico do HHV-6A.

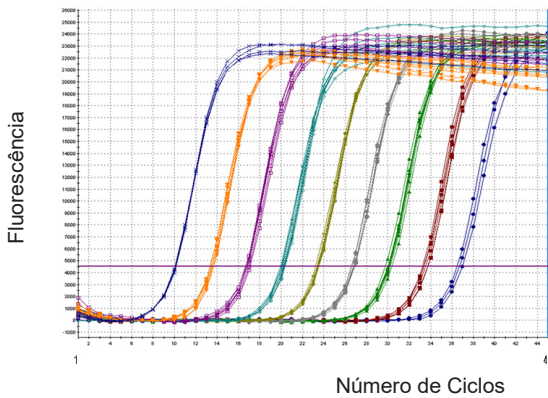
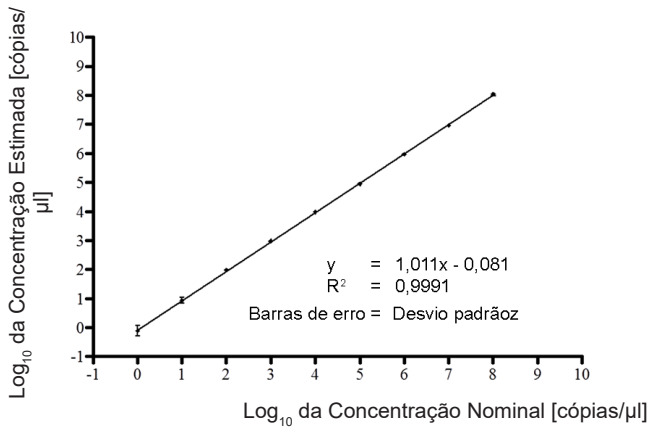
A**B**

Figura 3: Curvas de amplificação **[A]** e regressão linear **[B]** de uma série de diluições analisada de ADN específico do HHV-6B.

O intervalo linear do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 para o ADN específico de HHV-6A e HHV-6B estende ambos por um intervalo de pelo menos **oito** ordens de grandeza.

11.4 Precisão

A precisão do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (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. Os dados baseiam-se na análise de quantificação de concentrações definidas do ADN específico do HHV-6A e do HHV-6B e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos do Internal Control (controlo interno). Foram analisadas pelo menos seis réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

Tabela 3: Dados de precisão para a deteção de ADN específico do HHV-6A e do HHV-6B

HHV-6A e HHV-6B		Conc. Média [cópias/ μ l]	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	HHV-6A	133,00	9,70	5,21
	HHV-6B	160,88	10,34	4,19
Variabilidade Interensaio	HHV-6A	137,00	9,68	7,05
	HHV-6B	160,63	8,42	5,24
Variabilidade Entre Lotes	HHV-6A	136,00	9,61	7,06
	HHV-6B	158,36	10,04	6,34
Variabilidade Total	HHV-6A	138,00	9,22	6,67
	HHV-6B	159,03	8,96	5,64

Tabela 4: Dados de precisão para a detecção do Internal Control (controle interno)

Internal Control (controle interno)	Ciclo Limiar Médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intraensaio	27,80	0,05	0,10
Variabilidade Interensaio	27,40	0,22	0,81
Variabilidade Entre Lotes	27,50	0,34	1,25
Variabilidade Total	27,50	0,28	1,02

11.5 Avaliação de Diagnóstico

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 é avaliada regularmente analisando amostras de referência e de diagnóstico previamente analisadas com métodos de referência.

Tabela 5: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do kit RealStar®HHV-6 PCR Kit 1.0

		RealStar®HHV-6 PCR Kit 1.0		
		HHV-6A (+)	HHV-6B (+)	-
Método de Referência	HHV-6A (+)	8	0	0
	HHV-6B (+)	0	19	0
	-	0	0	3

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 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 subquantificação, resultados inválidos ou falsos negativos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do HHV-6A e do HHV-6B abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na subquantificação e/ou na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- À semelhança de qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- Devido a novos dados de sequência, não é possível excluir a reatividade cruzada do sistema de deteção específico do HHV-6B com algumas estirpes de HHV-6A. Estas estirpes irão provocar um sinal fraco no canal de deteção (Cy[®]5) do HHV-6B, para além do sinal no canal de deteção (FAM[™]) do HHV-6A.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade alta Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de kit RealStar® HHV-6 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

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 kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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.

© 2018 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 cap
	Número de catálogo
	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

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

