altona DIAGNOSTICS

Instruções de uso

RealStar®
Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

01/2017 PT

RealStar®

RealStar®

Parvovirus B19 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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CE

IVD

REF 101013

Σ 96

01 2017

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

MAN-101010-PT-S01

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 8

6.1 Instrumento de PCR em tempo real 10

6.2 Tipos de amostras 11

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 (qualitativo) 18

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo) 18

10.1.3 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (quantitativo) 19

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo) 19

10.2 Interpretação dos Resultados 20

10.2.1 Análise Qualitativa 20
10.2.2 Análise Quantitativa 20

11. Avaliação do Desempenho 22
11.1 Sensibilidade Analítica 22
11.2 Especificidade Analítica 23
11.3 Linear Range 24
11.4 Precisão 25
11.5 Avaliação Diagnóstica 26

12. Limitações 27

13. Controlo de Qualidade 28

14. Apoio Técnico 28

15. Bibliografia 28

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade 29

17. Explicação de Símbolos 30

1. Utilização Prevista

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do parvovírus B19.

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 RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 contém Padrões de Quantificação em quatro concentrações diferentes (veja o capítulo 6. Descrição do Produto)

Internal Control (IC) = Controle interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Parvovirus B19 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 (consulte o capítulo 8.1 Preparação de Amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador 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 *parvovírus humano B19*, (parvovírus B19) também denominado *Eritrovírus B19*, foi o primeiro vírus humano conhecido na família de *Parvovirinae* e do género *Erythrovirus*. Consiste num vírus icosaédrico sem invólucro que possui um genoma de ADN linear de cadeia simples.

O parvovírus B19 provoca uma erupção cutânea infantil denominada quinta doença ou eritema infecioso, que é comummente denominado "doença da face esbofetada". O parvovírus B19 é uma das principais causas de crise aplástica em pacientes com anemia hemolítica. Podem observar-se complicações fetais graves, especialmente após infeções maternas durante o segundo e o terceiro trimestres.

Foram identificados três genótipos distintos (genótipo I-III) de *parvovírus humano B19*, que variam entre eles até 15% na identidade nucleotídica. Com base na análise de sequências e nas propriedades biológicas, o International Committee on Taxonomy of Viruses classificou representantes dos três genótipos como espécies do *parvovírus humano B19*. Na Europa, os requisitos regulamentares especificam que os pools de plasma utilizados na produção de plasma e imunoglobulina anti-D tratados para a inativação do vírus são testados para níveis de ADN do parvovírus B19. Estes pools de plasma não podem exceder o limiar de 10 UI/µl de concentração de ADN de parvovírus B19, como definido pela WHO IS (2ª IS NIBSC, código 99/802).

6. Descrição do Produto

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do ADN específico do parvovírus B19.

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.

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 parvovírus B19 estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ADN específico do parvovírus B19 e 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 amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Quatro Padrões de Quantificação (QS1 - QS4)
- 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 a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ADN específico do parvovírus B19 assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

Os Padrões de Quantificação contêm concentrações padronizadas do ADN específico do parvovírus B19. Estes Padrões de Quantificação foram calibrados segundo a 2ª norma internacional da OMS para o Parvovirus B19 para as técnicas

baseadas na amplificação de ácido nucleico (NIBSC código: 99/802). Os Padrões de Quantificação podem ser utilizados individualmente como controlos positivos ou em conjunto para gerar uma **curva padrão**, a qual pode ser utilizada para a determinação da concentração do ADN específico do parvovírus B19 na amostra

Os Padrões de Quantificação possuem as seguintes concentrações:

Padrões de quantificação	Concentração [IU/µl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipos de amostras

Os seguintes tipos de amostras foram validados para utilização com o RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0:

- Plasma EDTA humano

Se um procedimento de extração de ácido nucleico for aplicado, podem ser utilizados tipos de amostras adicionais em conjunto com o RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico deve 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)
  - 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 infeciosos 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.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® Parvovirus B19 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 de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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	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

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 (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 é utilizado pelo menos um controlo positivo (QS) e um controlo negativo por processamento.
- ► Para fins de quantificação devem ser utilizados todos os Padrões de Quantificação (QS1 a QS4).
- ► 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® Parvovirus B19 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
Ramp Rate	Predefinição
Predefinição	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

► Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ADN específico do parvovírus B19	parvovírus B19	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 Repeti-ções	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	10:00
Amplification	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 RealStar® Parvovirus B19 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 processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é **válido**, se as seguintes condições de controlo estiverem presentes:

ID do Controlo	Canal de Deteção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo (QS)	+	+/-*
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.

10.1.3 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

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

10.1.4 Processamento de Teste de Diagnóstico Inválido (quantitativo)

Um **quantitativo** 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 **quantitativo 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 Deteção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ADN específico do parvovírus B19.
-	+	Não foi detetado o ADN específico do parvovírus B19. A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do parvovírus B19.
-	-	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 ADN do parvovírus B19 na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno

10.2.2 Análise Quantitativa

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 inclui quatro Padrões de Quantificação (QS). Para que seja gerada uma **curva padrão** para a análise quantitativa, estes padrões têm de ser definidos como **padrões** com concentrações adequadas (capítulo 6. Descrição do Produto). A utilização de **padrões** concentrações conhecidas permite a geração de uma curva padrão para a análise quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

C_t = Limiar Ciclo

m = Declive

N_0 = Concentração inicial

b = Impedir

A partir da curva padrão, pode-se quantificar amostras positivas de concentrações desconhecidas.

$$N_0 = 10^{(C_t - b)/m}$$

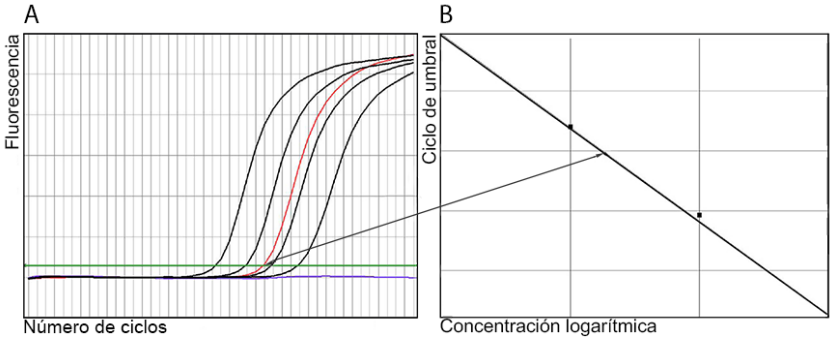


Figura 1: Padrões de Quantificação (preto), uma amostra positiva (vermelho) e outra negativa (azul) apresentados no Gráfico de Amplificação [**A**] e uma análise de Curva Padrão [**B**]

NOTA

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

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

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

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação de desempenho do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando o ADN do parvovírus B19 quantificado e calibrado, face a 2.ª norma internacional da OMS para o parvovírus B19 (NIBSC código: 99/802).

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (IU/µl de eluato) de moléculas de ADN específico do parvovírus B19 que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições seriadas de ADN quantificado do parvovírus B19.

Tabela 1: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do parvovírus B19

Concentração inserida [IU/µl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	16	16	100
3,162	16	16	100
1,000	16	16	100
0,316	16	15	94
0,210	8	5	63
0,140	8	4	50
0,090	8	4	50
0,060	8	3	38
0,030	16	0	0
0,010	16	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi determinada

por análise Probit:

- Para a deteção de ADN específico do parvovírus B19, a sensibilidade analítica é de 0,41 IU/µl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,27-0,90 IU/µl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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 parvovirus B19 serão detetados.

A especificidade analítica do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste a um painel de ADN/ARN genómico extraído de outros agentes patogénicos ou vírus transmitidos por via sanguínea significantes em doentes imunocomprometidos.

O RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

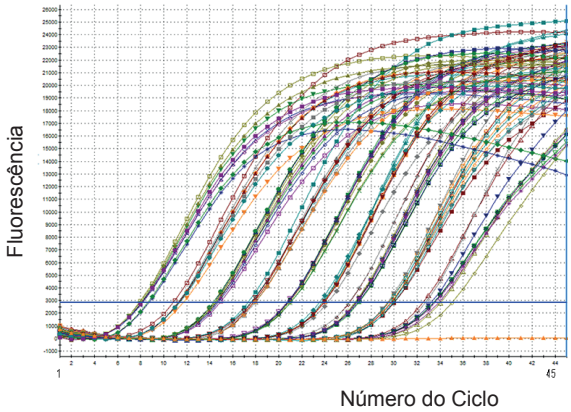
- Vírus BK
- Citomegalovírus
- Vírus Epstein-Barr
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Herpesvírus humano 6A
- Herpesvírus humano 6B
- Herpesvírus humano 7

- Herpesvírus humano 8
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Vírus JC
- Vírus Varicella-Zoster

11.3 Linear Range

O intervalo linear do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi avaliado através da análise de uma série de diluições logarítmicas de ADN específico do parvovírus B19 utilizando concentrações entre 1,00E+09 - 1,00E+00 IU/µl. Cada diluição foi analisada em oito réplicas.

A



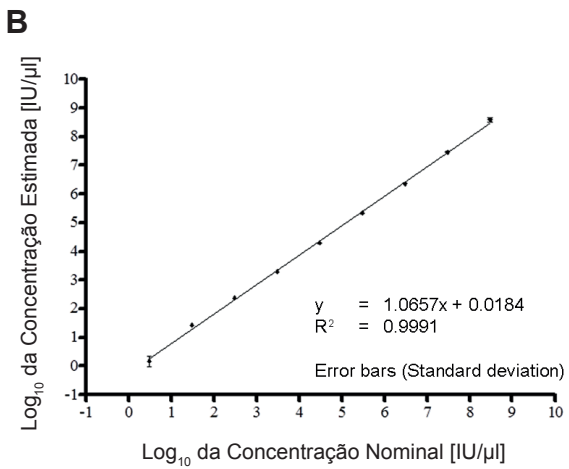


Figura 2: Curvas de amplificação [**A**] e regressão [**B**] de uma série de diluições analisadas de ADN específico do parvovírus B19

O intervalo linear do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 abrange um intervalo de pelo menos **oito** ordens de magnitude.

11.4 Precisão

A precisão do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade Intra-ensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade Inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade Inter-lote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação. Estes dados baseiam-se na análise quantitativa de concentrações definidas de ADN específico de parvovírus B19 e no valor do ciclo limiar (C_t) em termos de Controlo Interno. Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, Inter-ensaio e Inter-lote.

Tabela 2: Dados de precisão para a deteção de ADN específico do parvovírus B19

parvovírus B19	Concentração Média [IU/µl]	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	219,36	5,42	2,47
Variabilidade Inter-ensaio	215,66	8,67	4,02
Variabilidade Inter-lote	211,65	10,47	4,95
Variabilidade Total	211,75	10,07	4,75

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

Internal Control	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	24,90	0,09	0,36
Variabilidade Inter-ensaio	24,75	0,13	0,54
Variabilidade Inter-lote	24,86	0,11	0,46
Variabilidade Total	24,80	0,14	0,56

11.5 Avaliação Diagnóstica

A especificidade e a sensibilidade de diagnóstico do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 foram avaliadas através da análise de 115 espécimes. Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). As amostras foram analisadas utilizando um ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems) e um Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research).

Tabela 4: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0

		RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0	
		+	-
Pré-teste	+	93	3
	-	1	18

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 sub quantificação, falsos negativos ou resultados inválidos.

- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma parvovírus B19 abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em sub quantificação ou na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 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® Parvovirus B19 PCR Kit 1.0 é a CE-marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 98/79/EC.

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

Símbolo	Explicação
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
LOT	Código de lote
CAP	Cor cap
REF	Número do produto
CONT	Conteúdo
NUM	Número
COMP	Componente
GTIN	Número de identificação de comércio internacional
	Consult instructions for use
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

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