

RTS032

HSV2 Q - PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O kit HSV2 Q-PCR Alert kit - Tempo Real - pronto para uso - é um teste quantitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a pesquisa e a dosagem do DNA do Herpes vírus humano de Simplex do tipo 2 (HSV2) em amostras de DNA extraído dos tampões de lesões mucocutâneas e do plasma colhido em EDTA.

O produto é empregado, juntamente aos dados clínicos e a outros exames de laboratório, nos diagnósticos e na monitorização da infecção do HSV2.

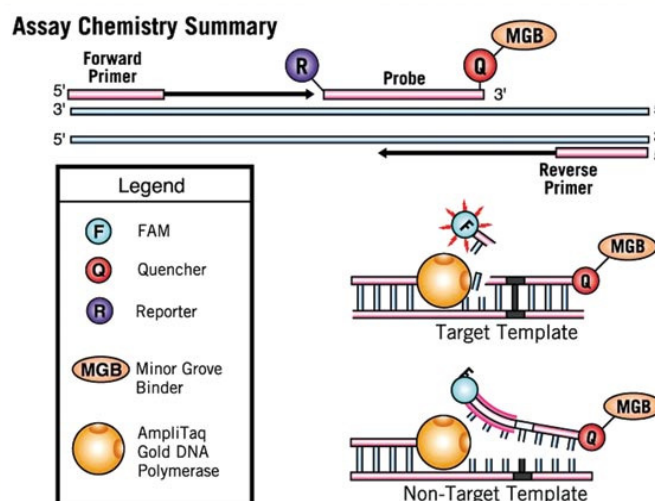
PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

O procedimento consiste de uma reação de amplificação em Tempo Real em microplaca com termostato programável fornecido com sistema óptico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

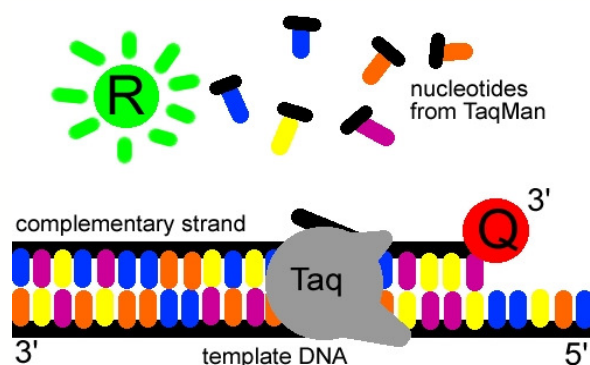
A padronização do sistema foi executada no instrumento da Applied Biosystems ABI PRISM™ série 7000.

Em cada poço, uma reação de amplificação específica é executada para uma região que codifica glicoproteína D (gpG) do HSV2 e para uma região do gene humano que codifica beta-globina (controle interno de adequação da amostra) utilizando o DNA produto da reação de retro transcrição das amostras testadas. Uma sonda específica para HSV2 marcada com o fluoróforo FAM é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para HSV2. Outra sonda específica para o gene humano da beta-globina marcada com o fluoróforo VIC é ativada quando hibridizada com o produto da reação de amplificação para o gene humano da beta-globina. A emissão da fluorescência aumenta com o aumento do produto específico da reação de amplificação e é medida e registrada pelo aparelho.

O processamento dos dados determina a presença e o título do DNA de HSV2 na amostra inicial.



A partir do momento que a sonda TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA, depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers se anelam ao DNA. A TaqPolimerase então adiciona nucleotídeos e remove a sonda TaqMan® do DNA gabarito. Isso separa o quencher do repórter e permite ao repórter emitir sua energia. Isso é, então, quantificado usando um computador. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, mais oportunidades a TaqMan® terá de se ligar, e em contra partida, mais luz emitida será detectada.



O corante do repórter é liberado da dupla fita de DNA criada pela Taq Polimerase. Longe do corante quencher, a luz emitida do corante repórter dye em estado excitado pode, agora, ser observada.

COMPONENTES FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
HSV2 Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS032-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
HSV2 Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS032-P	Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM / MGB-NFQ e com VIC / MGB-NFQ	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Q-PCR Alert AmpliMASTER - RTS000	Mistura de reagentes otimizados	4 x 340 µL	TRIS (base e cloridrato), Glicerol, MgCl ₂ , Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase, Taq DNA polimerase hot start
	Microplaca com 96 pocinhos de 0,2 mL	3	Plástico PP
	Lâmina adesiva vedante	3	Plástico e cola

MATERIAIS, NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamentos:

- Capela de fluxo laminar
- Agitador tipo Vórtex
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM)
- Micropipetas simples, volume variável
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com microcomputador

Material de Consumo:

- EPI
- Ponteiras com filtro
- Água ultrapura
- Tubos de microcentrifugação (1,5 mL a 2,0 mL)

Amostras:

- DNA extraído por metodologia definida pelo usuário, seguindo as normas e padrões de amostras exigidos na descrição abaixo.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
HSV2 Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS032-M	4 x 110 µL	-20 °C
HSV2 Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS032-P	4 x 110 µL	-20 °C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2° / +8 °C
Microplaca para amplificação		3	Temp. Ambiente
Lâmina adesiva para amplificação		3	Temp. Ambiente

PRECAUÇÕES

Este kit é reservado para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro*.

Manuseio: é necessário, ao manusear o kit e as amostras com EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra - material biológico humano. Tratar como potencialmente infeccioso.

Não beba ou coma na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser ambiente limpo e com ventilação adequada. Deve se trabalhar dentro de capela de exaustão / fluxo Laminar.

Não manuseie o kit sem luvas.

Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais usados como se fossem agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas. Evitar a formação de aerossol durante o procedimento - evitar respingar material ao redor da área de trabalho ou fora dela. O material que está em contato com as amostras biológicas deve ser tratado com Hipoclorito de sódio a 3% pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121 °C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável

combustível deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contêm ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Não pipetar nenhuma solução com a boca.

Lavar bem as mãos depois de haver manipulado as amostras e os reagentes.

Eliminar reagentes e resíduos conforme as normas vigentes.

Ler todas as instruções fornecidas no kit antes de realizar o teste.

Respeitar as instruções fornecidas no kit durante a execução do teste.

Respeitar a data de validade do kit.

Utilizar somente os reagentes presentes no kit e aqueles aconselhados pelo fabricante.

Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

Advertências e precauções para a biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para evitar o risco de resultados incorretos, em particular por causa da degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou da contaminação das amostras por parte de produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular.

As amostras devem ser destinadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente para aquela área de trabalho. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções específicas para os componentes

Os produtos AmpliMIX, AmpliPROBE, AmpliSTANDARD, AmpliMASTER, apresentam as seguintes advertências (S):

S 23-25. Não respirar vapores/aerossol. Evitar o contato com os olhos.

Observações importantes:

- Os tubos que contêm o AmpliMIX e o AmpliPROBE são descartáveis e, portanto, devem ser utilizados uma única vez na preparação da mistura de reação.

- Os tubos que contêm o AmpliSTANDARD® não podem ser congelados e descongelados por mais de 8 vezes. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar perda no título.
- Os tubos que contêm o AmpliMASTER não podem ser congelados e descongelados por mais de 1 vez. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar uma perda na eficiência da amplificação.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

Amostras

Este produto deve ser utilizado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: tampões de lesões mucocutâneas e do plasma colhido em EDTA.

Tampões de lesões mucocutâneas

Os tampões de lesões mucocutâneas para a extração do DNA devem ser colhidos segundo as indicações do laboratório, colocadas em meio de transporte para culturas celulares ou Solução fisiológica estéril ou PBS estéril, transportadas a +2°C/+8°C e conservadas a +2°C/+8°C por um máximo de quatro horas ou conservadas congeladas a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por um maior tempo.

Aconselha-se subdividir em mais alíquotas as amostras para conservar congeladas de modo a não submetê-las a ciclos de congelamento / descongelamento repetidos.

As instruções para o eventual pré-tratamento da amostra clínica e para a extração do DNA estão contidas no Manual de instruções para o uso de «EXTRAgen®».

Plasma colhido em EDTA

O plasma colhido em EDTA deve ser colhido segundo as indicações do laboratório, transportado a +2°/+8°C e conservado a +2°/+8°C por um máximo de quatro horas ou conservado congelado a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por um maior tempo.

Aconselha-se subdividir em mais alíquotas as amostras para conservar congeladas de modo a não submetê-las a ciclos de congelamento / descongelamento repetidos.

As instruções para o eventual pré-tratamento da amostra clínica e para a extração do DNA estão contidas no Manual de instruções para o uso de EXTRAgen®.

Substâncias interferentes

O DNA extraído da amostra inicial não deve conter heparina ou hemoglobina para evitar fenômenos de inibição e a possibilidade de frequentes resultados não válidos.

Não há dados disponíveis com relação à inibição causada por medicamentos antivirais.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

a) Preparo da etapa de amplificação real time - área de pós-PCR:

Antes de iniciar, consultar o manual do equipamento e:

- ligar o termociclador e seu computador, iniciar o software apropriado e abrir uma sessão “absolute quantitation”;

- programar o “detector” para a sonda HSV2 com o “repórter” = “FAM” e o “quencher” = “none” (NFQ é um extintor de fluorescência = dark quencher);
- programar o “detector” para a sonda da beta-globina com o “repórter” = “VIC” e o “quencher” = “none” (NFQ é um extintor de fluorescência = dark quencher);
- para qualquer poço da microplaca, programar o “detector” (tipo de fluorescência para medir), o “passive reference” = “ROX” (normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controle de amplificação negativo ou padrão com quantidade relativa reconhecida). Completar a planilha que se encontra no final desta Instrução de Uso escrevendo estas informações, ou imprimir a montagem da placa com as respectivas disposições dos controles e localizações das amostras. A planilha deve ser seguida criteriosamente durante a aplicação da amostra e seus reagentes.

OBS.: para a determinação do título de DNA alvo na amostra inicial, será necessário preparar uma série de reações usando DNA padrões com quantidades conhecidas (cópias nas quantidades 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) para que se possa obter a Curva Padrão.

Ilustra-se logo abaixo, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 11 amostras.

A1	A9										
A2	A10										
A3	A11										
A4	CN										
A5	10^2										
A6	10^3										
A7	10^4										
A8	10^5										

Significado: A1 - A11: Amostras para analisar; CN: Controle negativo de amplificação; 10^2 : Padrão 10^2 cópias; 10^3 : Padrão 10^3 cópias; 10^4 : Padrão 10^4 cópias; 10^5 : Padrão 10^5 cópias.

- Programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico e o volume de reação p/ 25 μ L. Para equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000 escolher a opção “9600 emulation”.

Ciclo térmico para amplificação		
Fase	Temperaturas	Tempos
Descontaminação	50° C	2 min.
Desnaturação inicial	95° C	10 min.
45 ciclos	95° C	15 seg.
	60° C	1 min.

b) Preparação da amplificação:

Antes de iniciar, é necessário:

- retirar e descongelar os tubos com as amostras para analisar. Centrifugar os tubos

para que o material desça para o fundo do tubo após descongelamento. Mantê-los em gelo;

- retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX necessários para o processo lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que os reagentes que estejam na parede desçam para o fundo do tubo após o descongelamento. Mantê-los em gelo.

- retirar e descongelar um número de tubos de AmpliPROBE iguais aos dos tubos de AmpliMIX. Repetir o pulso nesses tubos para que seu conteúdo desça todo para o fundo do tubo. Mantê-lo em gelo.

- retirar tantos tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Escreva “HSV2” e a data no tubo com caneta com tinta permanente. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes, depois de descongelados, desçam para o fundo do tubo. Mantê-los em gelo.

- retirar e descongelar os tubos de AmpliSTANDARD necessários. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes, depois de descongelados, desçam para o fundo do tubo. Mantê-los em gelo.

- se necessário, cortar a placa de amplificação para separar a parte que será utilizada no ensaio tomando o devido cuidado de manipulá-la com luvas sem pó e de não causar danos aos poços durante o corte/separação.

1. Transferir 100 µL de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mistura.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mistura.
3. Misturar em Vórtex a baixa velocidade por 5 segundos, evitando produção de espuma.
4. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que todo líquido escorra para o fundo do tubo.
5. Transferir 20 µL da mistura de reação obtida para o fundo de cada poço na placa de reação de amplificação, conforme pré-elaborado na planilha.

OBS.: Caso não seja utilizado toda a mistura de reagentes elaborado, este tubo identificado como “HSV2” poderá ser armazenado no escuro a -20°C por no máximo um mês, contanto que esta mistura seja somente uma vez congelada e descongelada.

6. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5µL de DNA extraído, conforme posição definida na planilha elaborada.
7. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo do poço de controle negativo, 5µL de água ultrapura.
8. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5µL AmpliSTANDARD 10² cópias, conforme posição definida na planilha elaborada na mistura de reação. Proceder de igual modo, tomando-se o cuidado de dispensar cada qual em seu poço, 5µL de AmpliSTANDARD com 10³, 10⁴, 10⁵ cópias.
9. Fechar a Microplaca de amplificação com a Lâmina adesiva de amplificação, precavendo-se de que a placa fique bem selada, fazendo uso de acessório adequado para tal procedimento.
10. Transferir a placa de amplificação para o termociclador Real Time, que deve estar em área específica e destinada para produtos amplificados (pós-PCR).

CALIBRAÇÃO DO PROCESSO

Para este tipo de ensaio e metodologia não existe procedimento de calibração para o processo de medição.

CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registrados da fluorescência emitidos pela sonda específica para HSV2 (fluorescência FAM) e pela sonda específica para o Controle Interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação devem ser analisadas por software específico.

Antes de iniciar a análise, consultar o manual do equipamento e:

- programar manualmente o “baseline” (nível de background fluorescente) do ciclo 6 ao ciclo 15*;

***Nota:** No caso de uma amostra positiva com alto título de HSV2, a fluorescência FAM da sonda específica para HSV2 pode começar a aumentar antes do 15º ciclo. Neste caso o intervalo de cálculo da "baseline" deve ser adaptado do ciclo 6 ao ciclo em que a fluorescência FAM começar a aumentar, por exemplo o ciclo 10.

- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência FAM a 0,2;
- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência VIC a 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas para HSV2 na reação de amplificação e o valor Threshold permite determinar o cT (ciclo Threshold), o ciclo em que a fluorescência atinge o valor Threshold.

Na reação de amplificação do Controle Positivo o valor de cT para a sonda específica HSV2 é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

cT do Controle Positivo HSV2 (FAM)	Resultado do teste	Amplificação
cT ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do Controle Positivo é cT>25 ou indeterminado, a presença do DNA alvo não foi corretamente detectada. Isto significa que problemas podem ter ocorrido durante amplificação ou detecção, que podem ter levado a resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa se repetida desde o passo de amplificação.

Quando este produto é usado para quantificação de HSV2, utilizam-se as reações do HSV2 Standard ao invés do Controle Positivo. Neste caso a validação da reação é feita pelo Standard.

Na reação de amplificação do controle negativo, o valor de cT da sonda específica para HSV2 é usada para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela a seguir:

cT do Controle Negativo HSV2 (FAM)	Resultado do teste	Amplificação
Indeterminado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado, a presença do DNA alvo foi detectada. Isso significa que problemas ocorreram

na fase de amplificação (contaminação) que podem ter levado a resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Na reação de amplificação de cada amostra, os valores de cT das sondas específicas HSV2 são usados para detectar a presença do DNA alvo, enquanto os valores de cT das sondas específicas do controle interno são usados para validar a amplificação, detecção e extração.

Verificar no software do instrumento que o cT foi determinado por um rápido e regular crescimento dos valores de fluorescência e não por picos ou incremento de sinal background.

Este produto está apto a detectar uma quantidade mínima de 10 cópias de DNA do gene gpG do HSV2 por reação de amplificação.

Os resultados dos cTs são usados utilizados conforme descrito na tabela seguinte:

cT da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	DNA de HSV2
HSV2 (FAM)	Controle Interno (VIC)			
Indeterminado	cT > 35 ou Indeterminado	Inadequado	Inválido	-
	cT ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETECTADO
Determinado	cT > 35 ou Indeterminado	adequado *	válido, positivo	PRESENTE
	cT ≤ 35	adequado	válido, positivo	PRESENTE

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para a sonda específica do HSV2 ou cT > 35 ou Indeterminado para a sonda específica do Controle Interno, isso significa que não foi possível detectar de modo eficiente o DNA do controle interno. Neste caso, problemas podem ter ocorrido na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou nula) ou na fase de extração (ausência de DNA, presença de inibidores ou amostras iniciais com um número de células insuficiente) que podem ter levado a resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o teste não é válido e deve ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para a sonda específica do HSV2 e cT ≤ 35 para a sonda específica do Controle Interno, o DNA de HSV2 não foi detectado no DNA extraído da amostra, mas não é possível descartar a presença do DNA de HSV2 a um título inferior ao limite de detecção do produto (verificar dados a seguir em Características de Desempenho). Neste caso o resultado seria um falso negativo.

Os resultados obtidos com este teste devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Quando o HSV2 é detectado em uma amostra, o controle interno pode resultar em um cT >35 ou Indeterminado. De fato, a baixa eficiência na reação de amplificação para o Controle Interno pode ser deslocada pela competição com a alta eficiência da reação para o HSV2. Neste caso a amostra é, contudo, adequada e o resultado positivo do teste é válido.

Análise quantitativa dos resultados

Depois de realizar o procedimento para análise qualitativa dos resultados, é possível realizar a análise quantitativa dos resultados de amostras positivas.

Os valores de cT para sondas específicas HSV2 para os quatro Standards são usados para calcular a curva padrão para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a detecção como descrito a seguir:

Curva Padrão HSV2 (FAM)	Faixa Aceitável	Amplificação / Detecção
Coeficiente de Correlação (R2)	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	CORRETO

Se o valor do Coeficiente de correlação (R2) não está dentro dos limites, isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação ou de detecção (volumes de mistura de reação incorretos, degradação da sonda, degradação dos padrões, dispensação incorreta dos padrões, posicionamento incorreto dos padrões, programação incorreta do ciclo térmico) que podem ter levado a resultados incorretos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para HSV2 nas reações de amplificação de cada amostra e a Curva Padrão da sessão de amplificação são utilizados para calcular a Quantidade (Quantity) de DNA alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este kit está apto a dosar entre 10 a 1.000.000 cópias do DNA do gene que codifica a proteína gpG do HSV2 por reação de amplificação, correspondentes aos genomas Equivalentes por reação, como descrito na tabela seguinte:

Resultado da amostra HSV2 (FAM)	Genomas Equivalentes de HSV2 por reação
Quantity > 1×10^6	SUPERIOR A 1.000.000
$1 \times 10^1 \leq \text{Quantity} \leq 1 \times 10^6$	= Quantidade
Quantity < 1×10^1	INFERIOR A 10

Os resultados (Quantity) de cada amostras são usados para calcular o genoma Equivalente (gEq) do HSV2 presente na amostra extraída (Nc) de acordo com a fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Quantity}}{Vc \times Va \times Ee}$$

Onde:

- **Vc:** é a quantidade de amostra usada na extração em relação à unidade de medida requisitada
- **Ee:** é a eficiência da extração, expressa em décimos
- **Ve:** é o volume total do produto da extração, expresso em μL
- **Va:** é o volume do produto da extração usado na reação de amplificação, expresso em μL
- **Quantity:** é o resultado da reação de amplificação da amostra, expresso em gEq por reação.

Quando o kit Extragen é usado, e o resultado é requerido em gEq / mL, a fórmula fica:

$Vc = 0,3 \text{ mL}$ $Ee = 0,8$ (significa eficiência de 80%) $Ve = 15 \mu\text{L}$ $Va = 5 \mu\text{L}$ $Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{15 \times \text{Quantity}}{0,3 \times 5 \times 0,8}$
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12,5 \times \text{Quantity}$

Cálculo de medição dos limites

Quando um método particular de extração é usado, os limites de medição em gEq/mL da amostra devem ser calculados a partir do limite de medição linear da reação de amplificação, de acordo com as fórmulas:

$$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_e}$$

$$\text{Limite superior (gEq/mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_e}$$

Quando o kit Extragen é usado, a fórmula fica:

$$\begin{aligned} \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 1.000.000 \text{ gEq} \end{aligned}$$

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A RT-PCR é um processo dinâmico que requer altas condições de controle para garantir amplificação discriminatória. O procedimento (Instruções de Uso) deve ser seguido rigorosamente.

A amostra de DNA extraída fornece um molde para um processo de amplificação específico, e desta forma a concentração e a pureza devem estar dentro dos valores especificados no produto.

Todos os instrumentos (máquina RT-PCR, pipetas, centrífuga) devem ser calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Utilizar precisamente com este produto o DNA extraído das seguintes amostras humanas: swabs de lesões mucocutâneas e plasma coletado em EDTA.

Não utilizar com este produto o DNA extraído das amostras heparinizadas: A heparina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não utilizar com este produto o DNA extraído contaminado com hemoglobulina: A hemoglobulina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados inválidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenômenos de inibição por parte dos medicamentos antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem da correta coleta, transporte, conservação e preparação das amostras; para evitar resultados incorretos, é necessário, portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extração dos ácidos nucleicos.

O método de amplificação Real Time dos ácidos nucleicos utilizados neste produto, por causa da sua elevada sensibilidade analítica, está sujeito à contaminação por parte das amostras clínicas positivas para o DNA de HSV2, dos controles positivos e dos mesmos produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. O produto foi designado de modo a reduzir contaminação; a modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; contudo estes fenômenos podem somente ser

evitados seguindo as boas práticas de laboratório e seguindo atentamente as instruções fornecidas nestas Instruções de Uso.

Este produto requer pessoal instruído no manuseio de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de reagentes classificados como perigosos para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer roupa de trabalho (EPI) e área de trabalho adequadas para a manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos, e de reagentes classificados como perigosos, para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para o procedimento de biologia molecular, tais como extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos (FP ou FN).

Este produto requer uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos- áreas de pré e pós-PCR.

Um resultado falso negativo obtido com este produto indica que o DNA de HSV2 não está detectado no DNA extraído da amostra, mas ele pode ainda conter DNA HSV2 a um título menor que o limite de detecção para o produto (Verificar parágrafo que trata de Características de Desempenho), neste caso o resultado será um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou reduzido posteriormente. Este risco residual em situações particulares, como os diagnósticos de urgência, pode contribuir a decisões incorretas com consequências graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controles de Qualidade

É aconselhável confirmar o procedimento completo de análises de cada sessão, extração e amplificação, utilizando uma amostra negativa e uma amostra positiva.

Como amostra negativa, utilizar uma amostra negativa já testada ou ainda da água bidestilada estéril.

Como amostra positiva, utilizar do material de referência calibrado de aproximadamente 150 gEq/mL de HSV2 (por ex. a amostra a 25 NDU/mL do PeliCheck HSV-1/2-DNA-2002, AcroMetrix Europe B.V., the Netherlands).

Controles de amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reação de controle negativo e uma reação de controle positivo.

Para o controlo negativo utilizar água bidestilada estéril (não incluída no kit) para acrescentar à reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controle positivo utilizar o DNA extraído de uma amostra positiva já testada ou o Q - HSV2 AmpliSTANDARD.

VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade Analítica: Limite de Detecção

A sensibilidade analítica deste teste permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos de detecção, a sensibilidade analítica do teste foi testada utilizando um DNA plasmídico contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida espectrofotometricamente. O DNA plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/5 µL em DNA genômico humano a uma titulação de 500ng/5 µL. Esta amostra foi empregada em 50 repetições para realizar a amplificação com nossos produtos.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
10 cópias DNA plasmídico + 500ng de DNA genômico humano	50	50	0

Sensibilidade analítica: Faixa de Medição Linear

Em termos de Faixa de Medição Linear, a sensibilidade analítica deste teste, permite determinar um título de 1.000.000 a 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos da Faixa de Medição Linear, a sensibilidade analítica do teste foi determinada utilizando um painel de diluições (1 log₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de DNA plasmídico contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida espectrofotometricamente. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reações a 10¹ moléculas por reação foram usados em 9 repetições para realizar a amplificação com nossos produtos.

A análise dos dados obtidos, realizada com a regressão linear, demonstrou que o teste apresenta uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

O limite superior da Faixa de Medição Linear foi fixado a 10⁶ moléculas/5µL, dentro do logaritmo do valor de concentração mais alto do padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10⁵ moléculas/5µL).

O limite inferior da Faixa de Medição Linear foi fixado a 10 moléculas/5µL, dentro do logaritmo do valor de concentração mais baixo do padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10² moléculas/5µL).

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Faixa de Medição Linear		
	cópias DNA / reação	gEq / mL
Limite superior	1.000.000	12.500.000
Limite inferior	10	125

Sensibilidade analítica: Precisão

O estudo da precisão do teste, entendida como variabilidade dos resultados obtidos em diferentes repetições de uma amostra com a mesma concentração analisadas em uma única

sessão, permitiu determinar um Coeficiente de Variação (CV %) de 12,5% na Faixa de Medição Linear de 10^6 moléculas/5 μ L a 10 moléculas/5 μ L.

Sensibilidade analítica: Exatidão

O estudo da exatidão do teste, entendida como a diferença entre os resultados médios obtidos em uma única sessão com diferentes repetições de uma amostra à mesma concentração e o valor teórico da concentração das amostras, permitiu determinar uma inexatidão percentual média de 5,5% na faixa linear 10^6 moléculas/5 μ L de 10 moléculas/5 μ L.

Sensibilidade analítica: reprodutibilidade com painel para teste de proficiência

Em termos de reprodutibilidade dos resultados comparados com os resultados obtidos usando outros ensaios em diferentes laboratórios, a sensibilidade analítica do ensaio foi checado via um painel de plasma para teste proficiência.

Os testes foram realizados utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições ($1 \log_{10}$ entre uma diluição e a seguinte) de HSV2 em plasma entre a concentração limite (PeliCheck HSV-1/2-DNA-02, AcroMetrix Europe B.V., the Netherlands). Cada amostra do painel foi usada em 3 repetições para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação, com os nossos produtos.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Testes com material de referência calibrado					
Valor teórico NDU/mL	Valor teórico NDU/extração	Valor teórico NDU/reação	Repetições	Positivos	Média dos resultados gEq/reação
2,5	0,75	0,2	3	3	1,09
25,0	7,50	2,0	3	3	11,30
250,0	75,0	20,0	3	3	179,01
2500,0	750,0	200,0	3	3	1576,34
25.000,0	7.500,0	2000,0	3	3	14978,40

Neste teste uma NDU (NAT Detection Unit) da AcroMetrix Europe B.V. demonstra-se equivalente a aproximadamente 7 gEq calculados com produtos Nanogen.

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção e quantificação nos diferentes genótipos / subtipos

A sensibilidade diagnóstica do teste, que é a eficiência de detecção e quantificação nos diferentes genótipos / subtipos, foi avaliada pela comparação de sequências com banco de dados de nucleotídicos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do oligonucleotídeo no primer AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados do gene codificador da glicoproteína D (gpG) do HSV2 demonstrou sua conservação e a ausência de mutações significativas.

Sensibilidade diagnóstica: amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica do teste, como confirmação das amostras clínicas positivas, foi verificada utilizando como material de referência alguns swabs mucocutâneos positivos para o DNA de HSV2 como material de referência e os resultados foram melhores que 95,4%.

A sensibilidade diagnóstica foi verificada utilizando 22 swabs mucocutâneos positivos para o DNA de HSV2 (testados com um método de amplificação nested). Cada amostra foi

empregada para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação com nossos produtos.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
Swabs para amostras genitais positivos para o DNA de HSV2	22	22	0

Especificidade analítica: marcadores interferentes em potencial

A sensibilidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes, foi avaliada pela comparação de sequência com bancos de dados nucleotídicos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação do oligonucleotídeo no primer AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponibilizadas no banco de dados de diferentes organismos do HSV2, incluindo o genoma completo de HSV2, o Herpes vírus humano mais similar ao HSV2, demonstrou a sua especificidade e a ausência de homologias significativas.

Em termos de ausência de reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, a sensibilidade analítica do ensaio foi testado usando como material de referência algumas amostras de swabs genitais positivos para o DNA de HSV2.

A especificidade analítica do teste foi verificada utilizando 5 swabs mucocutâneos e 3 alíquotas de líquido cefalorraquidiano positivos para o DNA de HSV2 (testados com um método de amplificação nested). Cada amostra foi empregada para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação com nossos produtos.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
Amostras positivas para o DNA de HSV2	8	0	8

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, como confirmação das amostras clínicas negativas, foi avaliada interpretando a análise de um painel de plasmas de doadores normais e de algumas amostras de swabs genitais negativos para o DNA de HSV2 e resultou igual a 97,6%.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando um painel de amostras de plasma de doadores normais (Painel Normal Humano Plasma, AcroMetrix Europe B.V., the Netherlands). Cada amostra do painel foi usada para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação com nossos produtos.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
Painel de plasmas de doadores normais	21	0	21

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando 21 swabs genitais negativos para o DNA de HSV2 (testados com um método de Amplificação Nested). Cada painel de amostra foi usado para realizar o procedimento completo de análises, extração e amplificação com nossos produtos.

Os resultados são mostrados na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
Swabs genitais negativos para o DNA de HSV2	21	0	21

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURELIUS E. et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba - PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

RTS032-M: 80298490099
RTS032-P: 80298490045

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X 

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

STD032

HSV2 Q - PCR Standard

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «HSV2 Q - PCR Standard» é destinado ao uso como um controle positivo e como padrão de quantidade conhecida de DNA para obter uma curva padrão em ensaios de amplificação quantitativa de ácidos nucleicos para a **detecção e dosagem do DNA do vírus humano Herpes Simplex tipo 2 (HSV2)** com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», «HSV2 Q - PCR Alert AmpliMIX» e « HSV2 Q - PCR Alert AmpliPROBE» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto Q - PCR Standard inclui quatro soluções de plasmídeos estabilizadas com titulação conhecida contendo a sequência requerida estão divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo teste contém 50 µL de solução, suficiente para oito sessões.

O plasmídeo contém uma região gênica que codifica a glicoproteína G do HSV2. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação em tempo real confirma a habilidade de identificar a presença do DNA HSV2 e permite o cálculo da curva padrão.

O kit possibilita a execução de 16 sessões de análise separadas.

* A concentração inicial do padrão foi determinada por espectrofotômetro, pela medição da absorção da preparação inicial de DNA de plasmídeo.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁵	Solução de plasmídeo em tubo com tampa vermelha	2 x 50 µL	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
HSV2 V Q - PCR Standard 10 ⁴	Solução de plasmídeo em tubo com tampa azul	2 x 50 µL	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
HSV2 Q - PCR Standard 10 ³	Solução de plasmídeo em tubo com tampa verde	2 x 50 µL	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
HSV2 Q - PCR Standard 10 ²	Solução de plasmídeo em tubo com tampa amarela	2 x 50 µL	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura

- Armazenar a -20°C ou inferior.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Agitador vórtex.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes otimizados para amplificação, os primers (oligonucleotídeos) e os reagentes de detecção (sondas fluorescentes) não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «Q - PCR Alert AmpliMASTER» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- « HSV2 Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTS032-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « HSV2 Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTS032-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 96 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manusear e descartar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evitar o contato direto com amostras biológicas. Evitar respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121 °C por uma hora antes de serem descartados.

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descartar. Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipetar soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descartar as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas de segurança. Ler as instruções de uso antes de utilizar o produto. Seguir as instruções.

Não usar produtos após o prazo de validade estabelecido.

Somente usar os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misturar reagentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes de outros fabricantes.

Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transfira materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou serem usadas com ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Q - PCR Standard** podem ser congelados e descongelados por no máximo 8 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

Q - PCR Standard apresenta as seguintes advertências (S):

S 23-25 Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

PROCEDIMENTO

O produto « **HSV2 Q - PCR Standard** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos « **Q - PCR Alert Amplimaster** », « **HSV2 Q - PCR Alert AmpliMIX** » e « **HSV2 Q - PCR Alert AmpliPROBE** ».

Q - PCR Standard está pronto para o uso, portanto deve ser usado adicionando 5 µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação em tempo real em uma microplaca com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto « **HSV2 Q - PCR Alert AmpliMIX** », bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

Nota: Q - PCR Standard pode ser congelado e descongelado por no máximo 8 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURELIUS E. et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba - PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490051

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X 

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

WORKSHEET

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												