

RTS175

BKV Q-PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

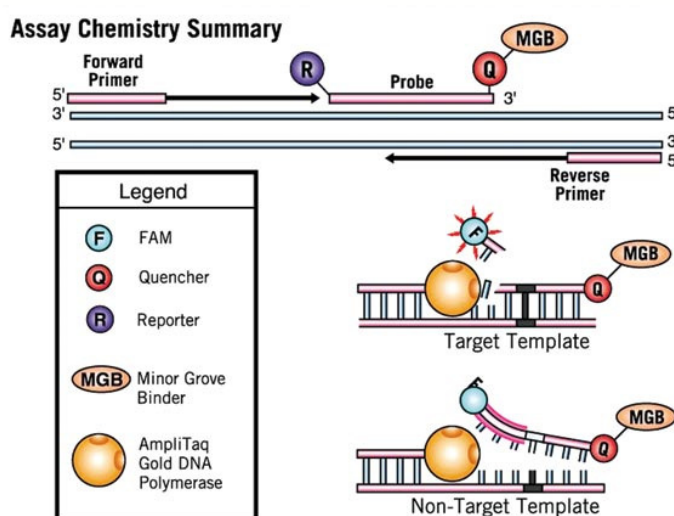
O kit **BKV Q-PCR Alert** é parte de um teste quantitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a detecção e dosagem do DNA do poliomavírus humano BK (BKV) em amostras de DNA extraído do plasma coletado em EDTA e urina coletada sem conservantes.

O produto deve ser usado em conjunto com outros dados clínicos e outros testes de laboratório, no diagnóstico e monitoramento da infecção por BKV.

PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

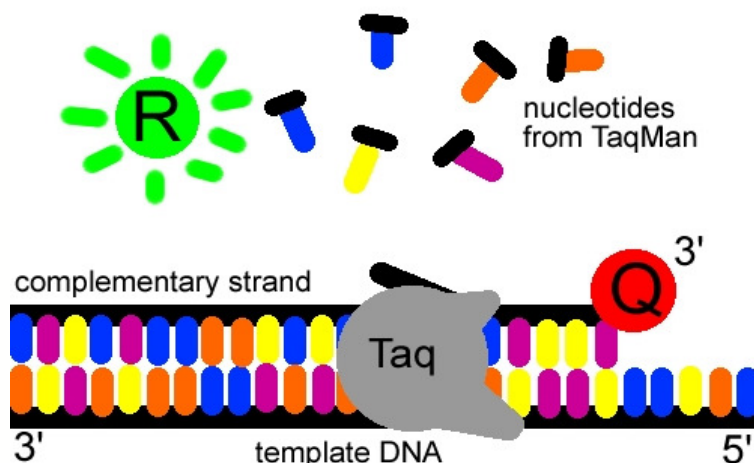
O procedimento envolve uma reação de amplificação em Tempo Real em microplaca em um equipamento com termostato programável fornecido com sistema ótico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

Em cada poço, uma reação de amplificação específica é executada para uma região gênica que codifica antígeno T grande de BKV e para uma região do gene da beta-globulina humana (com controle de interno da amostra) usando um DNA extraído das amostras que estão sendo testadas. Uma probe específica para BKV marcada com fluoróforo FAM se torna ativada quando hibridizada com produto específico da reação de amplificação do BKV. Outra probe específica para o gene da beta-globulina humana, marcada com fluoróforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto da reação de amplificação do gene da beta-globina humana. A emissão de fluorescência aumenta com o aumento da reação de amplificação do produto específico e é medido e registrado pelo equipamento. O processamento dos dados torna determina a presença e o título de DNA BKV na amostra inicial.



A partir do momento que a probe 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 Taq Polimerase então adiciona nucleotídeos e remove a probe 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.

A padronização do sistema foi realizada nos instrumentos da Applied Biosystems ABI PRISM série 7000.

COMPONENTES FORNECIDOS

O kit vem completo com os seguintes componentes:

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
BKV Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS175-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
BKV Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS175-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 (1.5mL a 2.0mL)

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
BKV Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS175-M	4 x 110 µL	-20° C
BKV Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS175-P	4 x 110 µL	-20° C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2° / +8° C
Microplaca para amplificação		3	RT
Lâmina adesiva para amplificação		3	RT

PRECAUÇÕES

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

Manuseio: ao manusear o kit e as amostras, utilizar EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra - material biológico humano. Tratar como potencialmente infeccioso, uma vez que a amostra teste tem sua origem em amostra sanguínea humana.

Não beber ou comer na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser ambiente limpo e com ventilação adequada. Trabalhar dentro de capela de exaustão / fluxo laminar.

Não manusear 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 de 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

- A BKV Q-PCR Alert AmpliMIX, BKV Q-PCR Alert AmpliPROBE, BKV 6 AmpliSTANDARD, Q-PCR Alert 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 na titulação.
- 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 kit deve ser utilizado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: plasma colhido em EDTA e urina colhida sem conservantes.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma destinadas à extração do DNA devem ser colhidas em EDTA segundo as indicações do laboratório, transportadas a +2° / +8°C e conservadas a +2° / +8°C por um máximo de quatro horas, em caso contrário devem ser congeladas e conservadas a (-20°C) por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por um maior tempo.

Para uma ótima conservação das amostras, aconselha-se subdividi-las em mais alíquotas (volume mínimo 300 µL) de maneira a não submetê-las a ciclos de congelamento/descongelamento repetidos.

Quando se utilizam amostras congeladas, proceder ao descongelamento imediato, antes do início da extração para evitar fenômenos de degradação dos ácidos nucleicos.

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 do produto «EXTRAGEN®».

Urina colhida sem conservantes

As amostras de urina destinadas à extração do DNA e do RNA devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as indicações do laboratório, transportadas a temperatura ambiente (+18/+25°C) e conservadas a temperatura ambiente (+18 a +25°C) por um máximo de quatro horas ou, caso contrário, devem ser congeladas e conservadas a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por um tempo maior. O congelamento das amostras de urina causam, frequentemente, a formação de precipitados que podem interferir nas fases sucessivas do método: para a extração utilizar apenas o sobrenadante.

Para uma ótima conservação das amostras, aconselha-se subdividi-las em mais alíquotas (volume mínimo 300 µL) de maneira a não submetê-las a ciclos de congelamento/descongelamento repetidos.

Quando se utilizam amostras congeladas, proceder com o descongelamento imediatamente antes do início da extração para evitar fenômenos de degradação dos ácidos nucleicos.

As instruções para o eventual pré-tratamento da amostra clínica e para a extração do DNA estão contidas nas instruções de uso do kit «EXTRAGEN®», quando for o caso.

Substâncias interferentes

O DNA extraído da amostra de partida não deve conter heparina ou hemoglobina para evitar fenômenos de inibição e a ocorrência de frequentes resultados inválidos.

Não há dados disponíveis com relação à inibição causada por drogas antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Descrição do Procedimento - Instruções de Uso:

a) *Preparo da etapa de amplificação Real Time - área de pós-PCR:*

Antes de iniciar, é necessário:

- conforme manual do equipamento, ligar o RT-PCR (termociclador em tempo real), seu computador, iniciar o software apropriado e abrir uma sessão “absolute quantitation”;
- conforme manual do equipamento, programar o “detector” para a sonda BKV com o “reporter” = “FAM” e o “quencher” = “none” (NFQ é um quencher não-fluorescente; extintor de fluorescência = dark quencher);
- conforme manual do equipamento, programar o “detector” para a sonda da beta-globina com o “reporter” = “VIC” e o “quencher” = “none” (NFQ é um é um quencher não-fluorescente; extintor de fluorescência = dark quencher);
- conforme manual do equipamento, para cada poço da microplaca, programar o "detector" (tipo de fluorescência que é para ser medida), o "passive reference" como "ROX" (normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controle negativo de amplificação, controle positivo de amplificação, padrão com quantidade conhecida). Adicionar esta informação à planilha anexada ao final desta Instrução de Uso ou imprimir uma folha como a placa foi organizada. A planilha precisa ser seguida criteriosamente durante a aplicação da amostra e seus reagentes.

OBS.: para determinar a quantidade 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.

[illegible]

Significado: A1 - A11: Amostras para analisar; CN: Controle negativo de amplificação; 10²: Padrão 10² cópias; 10³: Padrão 10³ cópias; 10⁴: Padrão 10⁴ cópias; 10⁵: Padrão 10⁵ cópias.

- Consultando o manual do equipamento, programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico e um volume de reação de 25 µL. 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, e mantê-lo 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, e 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 para o fundo do tubo. Mantê-los em gelo.
 - retirar tantos tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Escrever “BKV” 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 “BKV” 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, 5 µL de DNA extraído, conforme posição definida na planilha elaborada. Faça da mesma maneira para todas as demais amostras de DNA extraídas.
 7. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo do poço de controle negativo, 5 µL de água ultra pura.
 8. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 µL 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, 5 µL de AmpliSTANDARD com 10^3 , 10^4 , 10^5 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 BKV (fluorescência FAM) e da sonda específica para o controle interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação devem ser analisadas por software específico.

Antes de iniciar a análise é necessário:

- conforme manual do equipamento, 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 BKV, a fluorescência FAM da sonda específica para BKV 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.

- conforme manual do equipamento, programar manualmente o Limiar (Threshold) para a fluorescência FAM a 0,2;
- conforme manual do equipamento, programar manualmente o Limiar (Threshold) para a fluorescência VIC a 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas para BKV 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 probe específica BKV é usada para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

cT do Controle Positivo BKV (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 ser repetida desde o passo de

amplificação.

Quando este produto é usado para quantificação de BKV, utilizam-se as reações do BKV 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 probe específica para BKV é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela a seguir:

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

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado (Undetermined), a presença do DNA alvo foi detectado. Isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação (contaminação) que podem ter causado 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 probes específicas BKV são usados para detectar a presença do DNA alvo, enquanto os valores de cT das probes 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 moléculas de DNA por reação de amplificação.

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

Ciclo limiar da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	DNA de BKV
BKV (FAM)	Beta-globina (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 o DNA do gene que codifica a proteína do capsídeo do BKV e cT > 35 ou Indeterminado para a probe específica do Controle Interno, isso significa que não foi possível detectar de modo eficiente o DNA do controle positivo. Neste caso, se problemas ocorreram 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), podem ter causado 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 o DNA do gene que codifica a proteína do capsídeo do BKV e cT ≤ 35 para o Controle Interno, o DNA de BKV não foi detectado no DNA extraído da amostra mas não é possível descartar a presença do DNA de BKV 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 BKV 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 BKV. 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 positiva.

Os valores de cT para probes específicas BKV 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 BKV (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), o que pode ter causado 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 BKV 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 pode quantificar entre 1.000.000 a 10 cópias de DNA do gene que codifica a proteína do capsídeo do BKV por reação de amplificação, correspondentes aos genomas Equivalentes por reação, como descrito na tabela seguinte:

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

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

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{V_e \times \text{Quantity}}{V_c \times V_a \times E_e}$$

Onde:

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

Cálculo de medição dos limites

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

$$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ee}$$

$$\text{Limite superior (gEq/mL)} = \frac{Ve \times 1,000,000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ee}$$

Quando o kit Extragen é usado a fórmula fica:

$$\begin{aligned} \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 1,000,000 \text{ gEq} \end{aligned}$$

De 125 a 12,500,000 gEq / mL

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Utilizar com este produto somente o DNA extraído das seguintes amostras humanas: Plasma colhido em EDTA e urina coletada sem conservantes.

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 DNA extraído contaminado com hemoglobina. Esta

substância inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos podendo 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 a contaminação por parte das amostras clínicas positivas para o DNA de BKV, dos controles positivos e dos mesmos produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. A modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; mas estes fenômenos podem ser evitados somente com uma boa prática das técnicas de laboratório e seguindo atentamente as instruções fornecidas nestas Instruções de Uso.

Este produto requer pessoal instruído para as manipulações 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 à 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, como a extração, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos.

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.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho (EPI) e instrumentos destinados à extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o DNA de BKV não está detectado no DNA extraído da amostra mas não é possível descartar que o DNA de BKV esteja presente a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto, 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

Controle 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 uma amostra positiva para o BKV já testada.

Controles de amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reação de controlo negativo e uma reação de controlo 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 controlo positivo utilizar o DNA obtido de uma amostra positiva já testada ou o «Q - BKV 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 limite de detecção, a sensibilidade analítica do ensaio foi testada usando um DNA plasmídico contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida através de espectrofotômetro. O DNA plasmídico foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5 µL em DNA humano genômico a um título de 500 ng / 5 µL. Esta amostra foi usada 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 + 500 ng 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 adicionado à reação de amplificação.

Em termos de 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 por espectrofotômetro. Os pontos do painel para 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram usadas em 9 repetições para a amplificação com nossos produtos. A análise dos dados obtidos, realizada com a regressão linear, demonstrou que o ensaio possui uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

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

O limite superior da Faixa de medição Linear, foi fixado em 10^6 moléculas/5 µL, dentro de um logaritmo de concentração mais alto de padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10^5 moléculas / 5 µL).

O limite inferior da Faixa de Medição Linear, foi fixado em 10 moléculas/5 µL, dentro de um logaritmo de concentração mais baixo de padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10^2 moléculas/5 µL).

Sensibilidade analítica: Precisão

O estudo da precisão do teste, entendida como variabilidade dos resultados obtidos de diferentes repetições de uma amostra dentro de uma mesma sessão, permitiu determinar um Coeficiente de Variação percentual (CV %) médio de 13,4% dentro de uma faixa de medição linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade analítica: Exatidão

O estudo da exatidão do teste, como diferença entre a média dos resultados obtidos em uma mesma sessão com diferentes repetições de uma amostra e o valor teórico da concentração da amostra, permitiu determinar uma Inexatidão percentual média de 12,3% dentro de uma faixa de medição linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

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 diversos genótipos /subtipos, está avaliada por comparação de sequencias com banco de dados de nucleotídeos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização dos primers de oligonucleotídeos do AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados do gene que codifica o antígeno T grande de BKV demonstrou sua conservação e a ausência de mutações significativas.

Sensibilidade diagnóstica: amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas positivas, foi verificada analisando certo número de soro e amostras de urinas que eram positivas para o DNA de BKV e com resultado maior de 95%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada utilizando 11 amostras de soro e 9 amostras de urina positivas para o DNA de BKV (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
Soros positivos para o DNA de BKV	11	11	0
Urinas positivas para o DNA de BKV	9	9	0

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas negativas, foi verificada analisando um painel de plasma de doador normal e com resultado maior que 95%.

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 empregada para realizar um 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	20	0	20

Especificidade analítica: marcadores interferentes em potencial

A especificidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, foi avaliada comparando-se sequências de nucleotídeos do banco de dados.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização dos primers de oligonucleotídeos do AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponibilizadas no banco de dados dos diversos organismos da BKV, entre aqueles do genoma completo de JCV, o poliomavírus humano o qual é o mais similar ao BKV, mostrou a sua especificidade apesar da presença de certo número de homologias.

A especificidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, foi testada utilizando um plasmídeo contendo a região gênica que codifica o antígeno T grande do JCV, o qual apresenta um número de homologias com a região gênica que codifica o antígeno T grande do BKV. Esta amostra foi usada em diferentes concentrações e em repetições para a amplificação com nossos produtos.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Positivos	Negativos
Antígeno T grande do Plasmídeo JCV 10^6 cópias/reação	2	0	2
Antígeno T grande do Plasmídeo JCV 10^5 cópias/reação	2	0	2
Antígeno T grande do Plasmídeo JCV 10^4 cópias/reação	2	0	2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERRANTE, P. et al. (1995) *J Med Vir* 47: 219 - 225

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

80298490063

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X 

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

STD175

BKV Q - PCR Standard

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O «BKV 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 de poliomavírus humanos BK (BKV)** com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», «BKV Q - PCR Alert AmpliMIX» e «BKV 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, 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 o antígeno T do BKV. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação em tempo real confirma a habilidade de identificar a presença do DNA do BKV 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
BKV 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
BKV 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
BKV 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
BKV 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 (probes fluorescentes) não estão incluídos 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.

«BKV Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTS175-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.

«BKV Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTS175-P), probes 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 descarte. 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.

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 a 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 usar 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 de 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 «**BKV Q - PCR Standard**» deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», «**BKV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e «**BKV 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 ótico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso dos produtos «**BKV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e «**BKV Q - PCR Alert AmpliPROBE**», 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

FERRANTE, P. et al. (1995) *J Med. Vir* 47: 219 - 225

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

80298490044

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												