

RTS036

HHV6 Q - PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

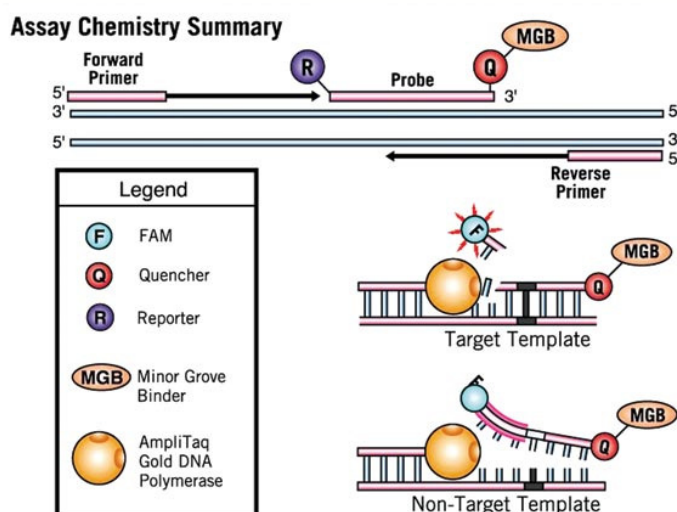
O produto **HHV6 Q-PCR Alert** é um kit para teste quantitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a identificação e a dosagem do DNA do Vírus Herpes Humano 6 (HHV6) em amostras de DNA extraído do plasma colhido em EDTA, sangue total colhido em EDTA, suspensões de leucócitos, suspensões de linfomonócitos.

O produto é empregado, juntamente aos dados clínicos e a outros exames de laboratório, nos diagnósticos e na monitorização da infecção da HHV6.

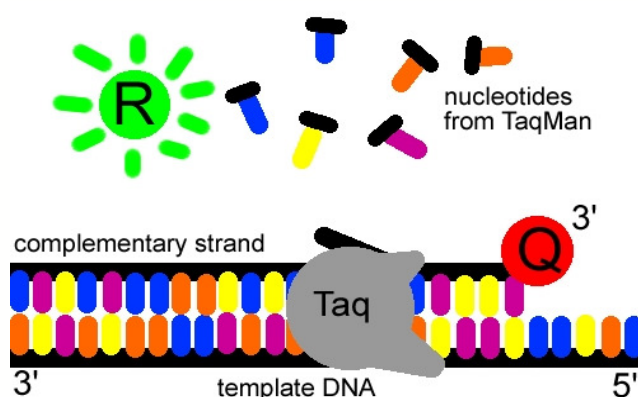
PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

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 é realizada específica para uma região do gene ORF 13R do HHV6 e para uma região do gene da beta-globina humana (como controle de interno de adequação da amostra) usando DNA extraído das amostras a serem testadas. Uma probe específica para HHV6, marcada com fluoróforo FAM, se torna ativada a partir do momento que é hibridizada com um produto específico da reação de amplificação do HHV6. Outra probe marcada pelo fluoróforo VIC, específica para o gene da beta-globulina humana, é ativada a partir do momento que é hibridizado com o produto da reação de amplificação do gene da beta-globulina humana. A emissão de fluorescência aumenta com o aumento da reação de amplificação do produto específico e é medido e registrado pelo equipamento. A análise de dados torna possível determinar a presença e o título de DNA HHV6 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 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 reporter 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

| Componente | Descrição | Quantidade | Composição |
|--|--|------------|---|
| HHV6 Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS036-M | Mistura de primers de oligonucleotídeos | 4 x 110 µL | Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100 |
| HHV6 Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS036-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 |
|----------------------------------|-------------------|------------|----------------|
| HHV6 Q-PCR Alert AmpliMIX | RTS036-M | 4 x 110 µL | -20°C |
| HHV6 Q-PCR Alert AmpliPROBE | RTS036-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: 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.

Não beber ou comer na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser um 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 contém 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:

Os produtos HHV6 Q-PCR Alert AmpliMIX, HHV6 Q-PCR Alert AmpliPROBE, HHV6 AmpliSTANDARD, Q-PCR 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.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Amostras

Este kit deve ser utilizado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: plasma coletado em EDTA, sangue total coletado em EDTA, suspensões de leucócitos, suspensões de linfomonócitos.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma destinadas à extração do DNA devem ser coletadas em EDTA segundo as indicações do laboratório, transportadas a +2°C/+8°C e conservadas a +2°C/+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.

É subdividir em mais alíquotas as amostras para conservar congeladas de modo 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 de «EXTRAGEN®».

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total destinadas à extração do DNA devem ser coletadas em EDTA segundo as indicações do laboratório, transportadas a +2°C/+8°C e conservadas a +2°C/+8°C por um máximo de três dias.

Não congelar as amostras de sangue total para evitar a lise celular e a perda da titulação viral.

As instruções para o eventual pré-tratamento da amostra clínica e para a extração do DNA estão contidas nas Instruções de Uso do kit «EXTRACell®».

Suspensões de leucócitos e as suspensões de linfomonócitos

As suspensões de leucócitos e as suspensões de linfomonócitos destinadas à extração do DNA devem ser preparadas segundo as indicações do laboratório, suspendidas em Solução fisiológica estéril ou PBS estéril, contadas e conservadas a + 2° / + 8° C por um máximo de quatro horas.

Não congelar as suspensões de leucócitos e as suspensões de linfomonócitos para evitar a lise celular e a perda da titulação viral.

As instruções para o eventual pré-tratamento da amostra clínica e para a extração do DNA estão contidas nas Instruções de Uso do kit «EXTRACell®».

Substâncias interferentes

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

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

Descrição do Procedimento - Instruções de Uso:

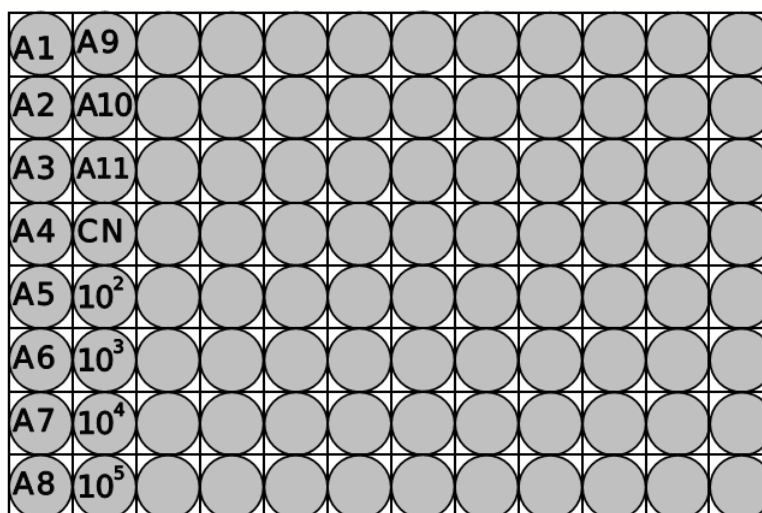
a) Preparo da etapa de amplificação real time - área de pós-PCR:

Antes de iniciar, é necessário:

- conforme manual do equipamento, ligar o termociclador Real Time e seu computador, iniciar o software apropriado e abrir uma sessão “absolute quantitation”;
- conforme manual do equipamento, programar o “detector” para a sonda HHV6 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 humana com o “reporter” = “VIC” e o “quencher” = “none” (NFQ 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 a ser medida), o “passive reference” = “ROX” (normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controle negativo, controle positivo ou padrão de amplificação com a quantidade relativa). Complete a planilha que se encontra no final desta Instrução de Uso escrevendo manualmente estas informações, ou imprimir a montagem da placa com as respectivas posições dos controles e localizações das amostras. A planilha deve ser seguida criteriosamente durante a aplicação da amostra e seus reagentes.

OBS.: para a determinação da 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 a seguir, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 11 amostras.



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.

- consultando o Manual do equipamento, programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico e um volume de reação de 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, após descongelamento, desça para o fundo do tubo, 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, após o descongelamento, que estejam na parede, desçam para o fundo do tubo, e mantê-lo 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 "HHV6" e a data no tubo com caneta com tinta permanente. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes após 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, após descongelados, desçam para o fundo do tubo. Mantê-lo 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 μ L de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem, pipetando por três vezes, o volume de 100 μ L na mistura.
2. Transferir 100 μ L de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem, pipetando por três vezes, o volume de 100 μ L na mistura.

3. Misturar em Vortex 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 “HHV6” 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.
7. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo do poço de controle negativo, 5 µL de água ultrapura.
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 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 de fluorescência emitidos pela sonda específica para HHV6 (fluorescência FAM) e pela sonda específica para o Controle Interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação devem ser analisados por software específico.

Antes de iniciar a análise é necessário:

- consultando o manual do equipamento, programar manualmente o “baseline” (nível de fundo de fluorescência) do ciclo 6 ao ciclo 15*;

***Nota:** No caso de uma amostra positiva com alto título de DNA HHV6, a fluorescência FAM da sonda específica para HHV6 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.

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

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas para HHV6 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 HHV6 é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

| cT do Controle Positivo HHV6 (FAM) | Resultado do teste | Amplificação |
|---|---------------------------|---------------------|
| cT ≤ 25 | POSITIVO | CORRETO |

Se o resultado da reação de amplificação do Controle Positivo for 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 HHV6, utilizam-se as reações do HHV6 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 HHV6 é usada para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela a seguir:

| cT do Controle Negativo HHV6 (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 ocorreram problemas 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 sondas específicas HHV6 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 de fundo.

Este produto está apto a detectar uma quantidade mínima de 10 cópias do DNA da região ORF 13R do HHV6 por reação de amplificação, correspondente a genomas Equivalentes por reação.

Os resultados dos cT's de cada amostra são usados utilizados conforme descrito na tabela seguinte:

| cT da amostra | | Adequação da amostra | Resultado do teste | DNA de HHV6 |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------|
| HHV6 (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 for cT Indeterminado para o DNA do HHV6 e cT > 35 ou Indeterminado para o DNA do Controle Interno, isso significa que não foi possível detectar de modo eficiente o DNA do controle interno. Neste caso, ocorreram problemas 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 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 HHV6 e cT ≤ 35 para o controle interno, o DNA de HHV6 não foi detectado no DNA extraído da amostra, mas não é possível descartar a presença do DNA de HHV6 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 HHV6 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 HHV6. 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 HHV6 nas reações de amplificação 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 HHV6 (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 ocorreram problemas 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 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 HHV6 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 em apto para quantificar entre 10 e 1.000.000 de cópias de DNA do gene que codifica a proteína do capsídio do HHV6 por reação de amplificação, correspondentes aos Equivalentes genoma por reação, como descrito na tabela seguinte:

| Resultado da amostra HHV6 (FAM) | Genomas Equivalentes de HHV6 por reação |
|---|---|
| Quantity > 1×10^6 | SUPERIOR A 1.000.000 |
| $1 \times 10^1 \leq \text{Quantity} \leq 1 \times 10^6$ | = Quantity |
| Quantity < 1×10^1 | INFERIOR A 10 |

Os resultados (Quantity) de cada amostra são usados para calcular o Equivalente genoma (gEq) do HHV6 presente na amostra extraída (Nc) de acordo com a fórmula:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{Vc \times \text{Quantity}}{Vc \times Va \times Ee}$$

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 Extracell é usado, o DNA extraído de 500.000 células de acordo com as instruções de uso e resultado é requerido em gEq / 100.000 células, a fórmula fica:

| |
|--|
| <p>Vc= 5 (500.000 células são equivalentes a 5 unidades de medição de 100.000 células) Ee= 1,0 (significa eficiência de 100%) Ve= 100 µL Va= 5 µL Nc (gEq / 100.000 células) = $\frac{100 \times \text{Quantity}}{5 \times 5 \times 1,0}$</p> |
| Nc (gEq / 100.000 células) = 4 x Quantity |

Quando o kit Extracell é usado, e o resultado é requerido em gEq/extração, omitindo o termo Vc, a fórmula fica:

| |
|---|
| <p>Vc= omitido Ee= 1,0 (significa eficiência de 100%) Ve= 100 µL Va= 5 µL Nc (gEq /extração) = $\frac{100 \times \text{Quantity}}{5 \times 1,0}$</p> |
| Nc (gEq /extração) = 20 x 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:

| |
|--|
| <p>Limite inferior (gEq/extração) = $\frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ee}$</p> |
|--|

| |
|---|
| <p>Limite superior (gEq/extração) = $\frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ee}$</p> |
|---|

Quando o kit Extracell é usado a fórmula fica:

| |
|--|
| <p>Limite inferior (gEq/mL) = 4 x 10 gEq Limite superior (gEq/mL) = 4 x 1.000.000 gEq</p> |
| De 40 a 4.000.000 gEq / 100.000 células |

Quando o kit Extragen é usado a fórmula fica:

| |
|--|
| <p>Limite inferior (gEq/mL) = 12,5 x 10 gEq Limite superior (gEq/mL) = 12,5 x 1.000.000 gEq</p> |
| De 125 a 12.500.000 gEq / mL |

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Utilizar com este produto somente DNA extraído das seguintes amostras humanas: plasma colhido em EDTA, sangue total periférico colhido em EDTA, suspensões de leucócitos e suspensões de granulócitos.

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 imunossuppressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem da correta coleta, transporte, conservação e preparação das amostras; para evitar resultados incorrectos, 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 HHV6, 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 incorrectos.

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 HHV6 não está detectado no DNA extraído da amostra mas não é possível descartar que o DNA de HHV6 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 incorrectas com consequências graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controle de Qualidade

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

Como amostra negativa, utilizar uma amostra negativa para o DNA de HHV6 já testada ou da

água bidestilada estéril.

Como amostra positiva, utilizar uma amostra positiva para o DNA de HHV6 já testada.

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 controle 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 obtido de uma amostra positiva já testada ou o « HHV6 Q - PCR Alert 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 desta prova 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 determinada utilizando um DNA de plasmídeo contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida por espectrofotometro. O DNA de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/5 µL em DNA genômico humano a um título de 500 ng/5 µL. Esta amostra foi usada em 50 repetições para realizar a amplificação.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|--|----|-----------|-----------|
| 10 cópias DNA de plasmídeo + 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 ensaio 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 de Faixa de Medição Linear, a sensibilidade analítica da prova foi determinada utilizando um painel de diluições (1 log₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de DNA de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida por espectrofotometro. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reações a 10¹ moléculas por reação foram empregadas em 9 repetições para realizar a amplificação. A análise dos dados obtidos, realizada com a regressão linear, demonstrou que o ensaio apresenta 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 | | | |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|------------|
| | pares DNA / reação | gEq / 100.000 células | gEq / mL |
| Limite superior | 1.000.000 | 4.000.000 | 12.500.000 |
| Limite inferior | 10 | 40 | 125 |

O limite superior da Faixa de Medição Linear, foi fixado em 10⁶ moléculas/5 µL, dentro de um logaritmo de maior concentração do padrão de amplificação AmpliSTANDARD (10⁵ moléculas/5 µL).

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

Sensibilidade analítica: Precisão

O estudo da precisão do ensaio, entendida como variação dos resultados obtidos com diferentes repetições de uma amostra analisada em uma mesma sessão, permitiu determinar o Coeficiente de Variação (CV %) médio de 12,4% dentro da faixa de medição linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade analítica: Exatidão

O estudo da exatidão do ensaio, que é a diferença entre os resultados médios obtidos em uma única sessão em diferentes repetições de uma amostra e o valor teórico da concentração da amostra, permitiu determinar uma Inexactidão média de 9,0% dentro de uma faixa de medição linear de 10^6 moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção em diferentes genótipos / subtipos

A sensibilidade diagnóstica do ensaio, que é a eficiência de detecção em diferentes genótipos/subtipos, está avaliada pela comparação de sequências com banco de dados de nucleotídicos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização dos primers de oligonucleotídeos da AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponibilizadas no banco de dados da região ORF 13R de HHV6 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 as amostras de sangue total e de plasma positivos para o DNA de HHV6 e resultou maior que 94,1%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada utilizando 9 amostras de sangue total coletadas em EDTA e 8 amostras de plasma coletadas em EDTA que eram positivas para o DNA de HHV6. Cada amostra foi empregada para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|-----------|-----------|
| Leucócitos positivos para o DNA de HHV6 | 9 | 9 | 0 |
| Plasmas positivos para o DNA de HHV6 | 8 | 8 | 0 |

Especificidade analítica: marcadores interferentes em potencial

A sensibilidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, foi avaliada comparando-se as sequências do 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 de organismos diferentes do HHV6, incluindo o genoma completo de HHV7 e CMV, o vírus de Herpes humano mais similar ao HHV6, mostrou sua especificidade e ausência de homologies significativas.

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, como confirmação das amostras clínicas negativas, foi testada analisando algumas amostras de sangue total e de plasma que eram negativas para o DNA de HHV6 e resultou maior que 96,3%.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando uma série de 3 amostras de sangue total coletado em EDTA e vinte e quatro amostras de plasma coletado em EDTA que eram negativos para o DNA de HHV6. Cada amostra do painel foi empregada para realizar o procedimento completo de análises, extração e amplificação.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

| Amostras | N | Negativos | Positivos |
|---|----|-----------|-----------|
| Leucócitos negativos para o DNA de HHV6 | 3 | 3 | 0 |
| Plasmas negativos para o DNA de HHV6 | 24 | 24 | 0 |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WAKEFIELD A. J., et al. (1992) *J. Med. Virology* **38**: 183-190

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

RTS036-M: 80298490107
RTS036-P: 80298490036

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X



Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

STD036

HHV6 Q - PCR Standard

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «HHV6 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 HHV6** com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», « HHV6 Q - PCR Alert AmpliMIX» e « HHV6 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 parte da região ORF 13R do **HHV6**. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação em tempo real confirma a habilidade de identificar a presença do DNA **HHV6** 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 |
|---------------------------------------|---|------------|--|
| HHV6 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 |
| HHV6 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 |
| HHV6 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 |
| HHV6 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 ponteiros 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 incluídas 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.
- « HHV6 Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTS036-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « HHV6 Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTS036-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.

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 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 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 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 « **HHV6 Q - PCR Standard** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos « **Q - PCR Alert AmpliMASTER** », « **HHV6 Q - PCR Alert AmpliMIX** » e « **HHV6 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 dos produtos « **HHV6 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

WAKEFIELD A. J., et al. (1992) *J. Med. Virology* 38: 183-190

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

80298490052

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X 

Mauricio Cichon
Laboratório
Assinado por: Mauricio Cichon

WORKSHEET

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