

RTS076

Enterovírus Q-PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O kit pronto para uso **ENTEROVIRUS Q-PCR Alert Kit - Tempo Real** é um teste quantitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a pesquisa e a dosagem do cDNA dos Enterovirus no produto da reação de transcrição reversa obtido do RNA extraído das amostras de plasma colhido em EDTA.

O teste está em grau de identificar e dosar o cDNA dos Enterovirus humanos pertencentes aos sorotipos: Poliovírus 1 - 3, Coxsackievírus A1 - A22 e A24, Coxsackievírus B1 - B6, Echovírus 1 - 9, 11 - 21, 24 - 27 e 29 - 33, Enterovirus 68 - 71. O teste não está em grau de identificar e dosar o cDNA dos Parechovírus humanos, precedentemente denominados Echovírus 22 e 23.

O produto deve ser empregado em conjunto com dados clínicos e a outros exames de laboratório, nos diagnósticos e na monitorização da infecção para Enterovirus.

PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

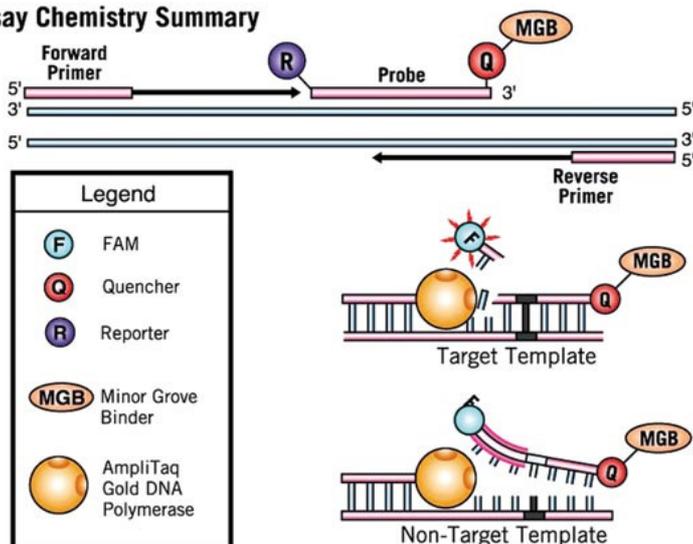
O procedimento envolve uma reação de amplificação em Tempo Real em microplaca em um equipamento com termostato programável fornecido com sistema ótico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

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

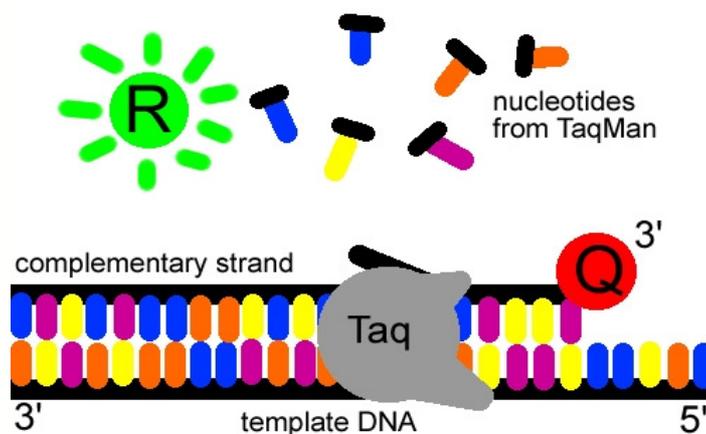
Em cada poço, uma reação de amplificação específica é executada para uma região 5' UTR dos Enterovirus e para uma região do RNA genômico do fago MS2 (controle interno de adequação da amostra) utilizando o cDNA produto da reação de retro transcrição das amostras testadas. Uma sonda específica para Enterovirus, marcada com o fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para Enterovirus, outra sonda específica para o fago MS2, marcada com o fluoróforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto da reação de amplificação para o fago MS2. A emissão da fluorescência aumenta com o aumento do produto específico da reação de amplificação e é medida e registrada pelo aparelho.

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

Assay Chemistry Summary



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

COMPONENTES FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Enterovírus Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS076-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Enterovírus Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS076-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 Vortex.
- 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 a seguir.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
Enterovirus Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS076-M	4 x 110 µL	-20° C
Enterovirus Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS076-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. Tratar como potencialmente infeccioso.

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 AmpliMIX, AmpliPROBE, AmpliSTANDARD, CPE-RNA®, AmpliMASTER , apresentam as seguintes advertências (S):

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

Observações importantes:

- Os tubos que contêm o AmpliMIX e o AmpliPROBE são descartáveis e, portanto, devem ser utilizados uma única vez na preparação da mistura de reação.
- Os tubos que contêm o AmpliSTANDARD® não podem ser congelados e descongelados por mais de 8 vezes. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar perda no título.
- Os tubos que contêm o CPE-RNA® não podem ser congelados e descongelados por mais de 10 vezes. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar perda no título.
- Os tubos que contêm o AmpliMASTER não podem ser congelados e descongelados por mais de 1 vez. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar uma perda na eficiência da amplificação.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Amostras

O material usado com este kit deve ser constituído pelo produto da reação de transcrição reversa (cDNA) obtido do RNA extraído das amostras biológicas.

O sistema de transcrição reversa do RNA deve utilizar primers separados ao acaso para disparar a reação de polimerização.

O sistema de extração do RNA da amostra inicial deve fornecer RNA adequado ao uso

em reações de transcrição reversa e amplificação.

As amostras biológicas destinadas à extração do RNA devem ser colhidas e conservadas como descrito a seguir:

- plasma colhido em EDTA, que deve ser conservado a $+2^{\circ}\text{C}/+8^{\circ}\text{C}$ por um máximo de quatro horas ou conservado congelado a -20°C por um máximo de trinta dias ou, ainda, a -70°C por tempos mais longos;

É aconselhado dividir as amostras congeladas em alíquotas de modo a não submetê-las a repetidos ciclos de congelamento/descongelamento.

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®», quando se tratar de seu uso.

Substâncias interferentes

O cDNA produto da transcrição reversa do RNA extraído da amostra inicial não deve conter heparina ou hemoglobina para evitar fenômenos de inibição e a aparição de frequentes resultados não válidos.

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

Descrição do Procedimento - Instruções de Uso:

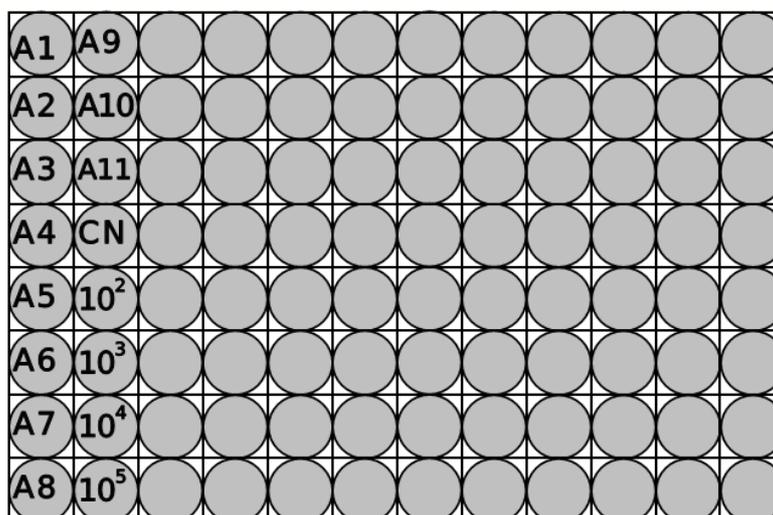
a) Preparo da etapa de amplificação real time - área de pós PCR:

Antes de iniciar, é necessário:

- consultando o manual do equipamento, verificar se o termociclador Real Time está em condições de excitar os fluoróforos FAM e VIC das sondas empregadas e medir a emissão;
- consultando o manual do equipamento, programar a posição na microplaca das reações, o tipo de fluorescência a ser medida e o tipo de reação (amostra, controle negativo de amplificação, padrão com quantidade conhecida). Adicionar esta informação à planilha anexada ao final destas Instruções de Uso. A planilha deverá ser seguida com atenção durante a transferência nos pocinhos da mistura de reação e das amostras.

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

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



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 o volume de reação para 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-los em gelo;
 - retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX necessários para o processo lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que os reagentes que estejam na parede desçam para o fundo do tubo após o descongelamento, 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 "ENTEROVIRUS" e a data no tubo com caneta com tinta permanente. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes desçam para o fundo do tubo depois de descongelados. Mantê-los em gelo.
 - retirar e descongelar os tubos de AmpliSTANDARD necessários. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes desçam para o fundo do tubo depois de descongelados. 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 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 utilizada toda a mistura de reagentes elaborada, este tubo identificado como “ENTEROVIRUS” poderá ser armazenado no escuro a -20°C por no máximo um mês, contanto que esta mistura seja congelada e descongelada somente uma vez.

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 ultra pura, conforme posição definida na planilha elaborada.
8. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 μL AmpliSTANDARD 10^2 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 Enterovirus (fluorescência FAM) e pela sonda específica para o controle interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação devem ser analisadas por software específico.

Antes de iniciar a análise é necessário:

- consultando o 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 DNA do Enterovirus, a fluorescência FAM da sonda específica para Enterovirus 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 Enterovirus 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 para Enterovirus é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

cT do Controle Positivo Enterovirus (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 do DNA do Enterovirus, utilizam-se as reações dos 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 Enterovirus é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela a seguir:

cT do Controle Negativo Enterovirus (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 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 Enterovirus são usados para detectar a presença do cDNA alvo, enquanto os valores de cT das sondas específicas do controle interno são usados para validar a amplificação, detecção e extração.

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

Este produto está apto a detectar uma quantidade mínima 10 cópias do cDNA do Enterovirus por reação de amplificação, equivalente a um mínimo de 10 cópias por reação.

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

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	cDNA de Enterovirus
Enterovirus (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	DETECTADO
	cT ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETECTADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para a probe específica do Enterovirus e $cT > 35$ ou Indeterminado para a probe específica do controle interno, isso significa que não foi possível detectar de modo eficiente o cDNA do controle interno. Neste caso, ocorreram problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou nula) ou na fase de transcrição reversa (ineficiente ou inválida) 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 a probe específica do Enterovirus e $cT \leq 35$ para a probe específica do controle interno, o cDNA do Enterovirus não foi detectado no cDNA extraído da amostra, mas não é possível descartar a presença do DNA de Enterovirus 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 cDNA de Enterovirus 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 Enterovirus. 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 sondas específicas Enterovirus 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 Enterovirus (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 probe específica para Enterovirus nas reações de amplificação de cada amostra e a Curva Padrão da sessão de amplificação são utilizados para calcular a Quantidade (Quantity) de cDNA alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este kit está em condições de dosar cDNA do Enterovirus (região 5' UTR) na reação de amplificação, equivalendo cada reação entre 10 e 1.000.000 de cópias, como mostrado na tabela abaixo:

Resultado da amostra Enterovirus (FAM)	Genoma Equivalente de Enterovirus por reação
Quantity > 1 x 10 ⁶	SUPERIOR A 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantity ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantity
Quantity < 1 x 10 ¹	INFERIOR A 10

Quando este produto é usado para quantificar o Enterovirus, os resultados (Quantity) das reações de amplificação das amostras são usados para calcular o número de genoma Equivalentes de Enterovirus presente na amostra inicial (Nc) de acordo com a fórmula:

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

Onde:

- **Vc:** é a quantidade de amostra usada na extração; por exemplo, usando Extragen o parâmetro é 0,3 mL
- **Ee:** é a eficiência da extração; por exemplo, usando Extragen o parâmetro é 0,8 (80%)
- **Ve:** é o volume total do produto da extração; por exemplo, usando Extragen o parâmetro é 15 µL
- **Vt:** é o volume do produto da transcrição reversa; por exemplo, usando RT - Kit Plus o parâmetro é 10 µL
- **Et:** é a eficiência da reação da transcrição reversa; por exemplo, usando RT - Kit Plus o parâmetro é 0,5 (mínimo de 50% de eficiência)
- **Vp:** é o volume total da reação de transcrição reversa; por exemplo, usando RT - Kit Plus o parâmetro é 25 µL
- **Va:** é o volume do produto da reação de transcrição reversa usado na reação de amplificação; com este produto o parâmetro é 5 µL
- **Quantity:** é o resultado da reação de amplificação da amostra, expresso em gEq por reação

Quando o kit de extração EXTRAgen e o RT - Kit Plus são utilizados, a fórmula fica:

Produtos	Fórmula Simplificada
EXTRAGEN® RT - Kit plus	Nc (gEq / mL) = 62,5/mL x Quantity

Cálculo de medição dos limites

Quando método particular de extração é usado, os limites de medição devem ser calculados de acordo com as fórmulas:

$$\text{Limite inferior (gEq/extração)} = \frac{Ve \times Vp \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Vt \times Va \times Ee \times Et}$$

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

Quando o kit de extração EXTRAgen e o RT - Kit Plus são utilizados, a fórmula fica:

Produtos	Limite de detecção
EXTRAgen® RT - Kit plus	De 625 a 62.500.000 gEq/mL

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

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

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

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

Com este produto, usar somente o cDNA produzido pela transcrição reversa do RNA extraído das seguintes amostras humanas: plasma coletado em EDTA.

Não utilizar com este produto o cDNA produzido pela transcrição reversa de RNA contaminado com hemoglobina: A hemoglobina inibe a transcrição reversa e reação de amplificação dos ácidos nucleicos, causando resultados inválidos.

Não utilizar com este produto o cDNA produzido pela transcrição reversa de RNA extraído de amostras heparinizadas: A heparina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

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

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

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

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

Este produto requer roupa de trabalho (EPI) e área de trabalho adequadas 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, tais como extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos (FP ou FN).

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

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

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

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

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controle de Qualidade

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

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

Como amostra positiva, utilizar uma amostra positiva para Enterovirus preparado do material de referência calibrado.

Controle de Amplificação

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de controle positivo e uma reação de controle negativo.

Para o Controle Negativo, use água estéril bidestilada (não fornecida com o kit) adicionada à reação no lugar do cDNA obtido da amostra.

Para o Controle Positivo, use o cDNA obtido de uma amostra positiva já testada, ou <<Q-Enterovirus 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 cDNA alvo nos 5 µL de produto obtido da transcrição reversa de RNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

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

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Negativos	Positivos
10 cópias DNA plasmídico + cDNA fago MS2	50	0	50

Sensibilidade analítica: Faixa de Medição Linear

Em termos de faixa de Medição Linear, a sensibilidade analítica deste teste permite determinar uma titulação de 1.000.000 a 10 moléculas de RNA alvo nos 5 µL de cDNA produzidos na reação de transcrição reversa adicionados 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 espectrofotometricamente. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reações de 10¹ moléculas por reação foram usadas em 9 repetições para a amplificação com os nossos produtos. A análise dos dados obtidos, realizada via regressão linear, demonstrou que o teste apresenta uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear) maior que 0,99.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Faixa de Medição Linear		
	cópias cDNA / reação	gEq / mL
Limite superior	1.000.000	62.500.000
Limite inferior	10	625

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

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

Sensibilidade analítica: Precisão

O estudo da precisão do teste, entendida como variabilidade dos resultados obtidos em diferentes repetições de uma amostra com a mesma concentração analisadas em uma única sessão, permitiu determinar um Coeficiente de Variação (CV %) de 12,5% na Faixa de Medição Linear de 10⁶ moléculas/5 µL a 10 moléculas/5 µL.

Sensibilidade analítica: Exatidão

O estudo da exatidão do teste, entendida como a diferença entre os resultados médios

obtidos em uma única sessão com diferentes repetições de uma amostra à mesma concentração e o valor teórico da concentração das amostras, permitiu determinar uma inexatidão percentual média de 9,0% na faixa linear 10^6 moléculas/5 μ L de 10 moléculas/5 μ L.

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção nos diferentes genótipos/subtipos

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

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do oligonucleotídeo no primer AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados da região 5' UTR do Enterovirus humano demonstrou sua conservação e a ausência de mutações significativas.

A sensibilidade diagnóstica do teste, que é a eficiência de detecção nos diversos genótipos/subtipos, foi testada utilizando amostras positivas para Coxsackievírus A9, Coxsackievírus B5 e Echovírus 11.

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas negativas, foi testada analisando um painel de amostras de plasma de doadores normais e mostrou ser maior que 92%.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando um painel de 12 amostras de plasma de doadores normais (Painel Normal Humano Plasma, VQC, the Netherlands). Cada painel de amostra foi usada em duas repetições para realizar o procedimento completo de análises, extração e amplificação, com os nossos produtos.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	Negativos	Positivos
Painel de plasmas normais de doadores	12	12	0

Especificidade analítica: marcadores potencialmente interferentes

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

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do nucleotídeo no primer AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponibilizadas no banco de dados dos diversos organismos humanos diferentes do Enterovirus humano, incluindo Parechovírus e Rhinovírus, os vírus humanos mais similares aos Enterovirus, mostrou a ocorrência de homologias significativas somente com alguns sorotipos de Rhinovírus humanos, em particular o Rhinovírus 87.

A especificidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi testada utilizando uma amostra positiva para Parechovírus 1d e para uma amostra positiva para Rhinovírus tipo 16, o vírus humano mais similar ao Enterovirus.

Os resultados estão demonstrados na tabela a seguir:

Amostra	Sorotipo	TCID50/mL	Diluição	Prova 1 gEq / mL	Prova 2 gEq / mL	Resultado esperado
EV03-01	RHINO 16	3,2	1:10 ³	não detectado	não detectado	-
EV03-02	N/A (Negativo)	N/A	N/A	não detectado	não detectado	-
EV03-03	N/A (Negativo)	N/A	N/A	não detectado	não detectado	-
EV03-04	COX A9	0,03	1:10 ⁸	< 625 (108)	não detectado	+/-
EV03-05	COX A9	0,3	1:10 ⁷	936	1.659	+
EV03-06	ECHO 11	250	1:10 ⁵	< 625 (231)	< 625 (62)	+
EV03-07	COX A9	30	1:10 ⁵	90.044	89.215	+
EV03-08	COX B5	32	1:10 ⁶	< 625 (289)	< 625 (208)	+
EV03-09	PARECHO 1d	32000	1:10 ²	não detectado	não detectado	-
EV03-10	COX A9	3	1:10 ⁶	5.657	5.569	+
EV03-11	ECHO 11	25	1:10 ⁶	não válido*	não válido*	+
EV03-12	COX B5	320	1:10 ⁵	1.025	1.003	+

Testes com material de referência: painel 2003 QCMD Enterovirus Proficiency Programme

A sensibilidade diagnóstica e a especificidade analítica do teste foram testadas utilizando como material de referência um painel Enterovirus (QCMD 2003 Enterovirus Proficiency Programme).

As amostras do painel foram empregadas em duas repetições para realizar o procedimento completo de análises, extração e amplificação com nossos produtos.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostra	Sorotipo	TCID50/mL	Diluição	Prova 1 gEq / mL	Prova 2 gEq / mL	Resultado esperado
EV03-01	RHINO 16	3,2	1:10 ³	não detectado	não detectado	-
EV03-02	N/A (Negativo)	N/A	N/A	não detectado	não detectado	-
EV03-03	N/A (Negativo)	N/A	N/A	não detectado	não detectado	-
EV03-04	COX A9	0,03	1:10 ⁸	< 625 (108)	não detectado	+/-
EV03-05	COX A9	0,3	1:10 ⁷	936	1.659	+
EV03-06	ECHO 11	250	1:10 ⁵	< 625 (231)	< 625 (62)	+
EV03-07	COX A9	30	1:10 ⁵	90.044	89.215	+
EV03-08	COX B5	32	1:10 ⁶	< 625 (289)	< 625 (208)	+
EV03-09	PARECHO 1d	32000	1:10 ²	não detectado	não detectado	-
EV03-10	COX A9	3	1:10 ⁶	5.657	5.569	+
EV03-11	ECHO 11	25	1:10 ⁶	não válido*	não válido*	+
EV03-12	COX B5	320	1:10 ⁵	1.025	1.003	+

* A amostra EV03-011, uma diluição 1:10⁶ de Echovírus 11, resultou na inibição da amplificação em ambas as provas efectuadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VERSTREPEN W. A., et al. (2001) J Clin Microbiology 39: 4093 - 4096

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

RTS020-M: 80298490101
RTS020-P: 80298490039

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
20/12/2013

X



Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

STD076

Enterovírus Q - PCR Standard

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «Enterovírus 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 **dosagem do cDNA do Enterovírus** com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX» e « Enterovírus 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.

O procedimento envolve o uso do **Q - PCR Standard** na reação de amplificação em tempo real específica para o 5'UTR do Enterovírus.

A detecção do produto específico durante a reação de amplificação em tempo real confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA do Enterovírus 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
Enterovírus 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
Enterovírus 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
Enterovírus 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
Enterovírus 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 (sondas fluorescentes) não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «Q - PCR Alert AmpliMASTER» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- «Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTS076-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTS076-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 96 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

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

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do 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 transferir 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 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 « **Enterovírus Q - PCR Standard** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos « **Q - PCR Alert AmpliMASTER** », « **Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX** » e « **Enterovírus 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 « **Enterovírus 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

VERSTREPEN W. A., et al. (2001) J Clin Microbiology 39: 4093 - 4096

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

80298490053

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
20/12/2013

X



Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

CTR076

Enterovírus - Controle Positivo

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «Enterovírus - Controle Positivo » é destinado ao uso como um controle positivo em ensaios qualitativos de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção do cDNA do Enterovírus humano com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX» e « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliPROBE» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **Controle Positivo** fornece o uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida, divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 130 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm a parte da região 5'UTR do **Enterovírus humano**. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA **Enterovírus**.

O kit possibilita a execução de 25 reações de amplificação usando 5 µL por reação.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Enterovírus Controle Positivo	Solução de plasmídeo	2 x 130µL	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.
- 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).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo, com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes para amplificação e detecção do DNA não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «Q - PCR Alert AmpliMASTER» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTS076-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « Enterovírus Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTS076-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « Enterovírus Q - PCR Standard» (STD076), quantidade conhecida de DNA plasmídeo para obtenção de uma curva padrão, total de 16 sessões.

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 à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

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

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

biologia molecular. Nunca transferir 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 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 **Controle Positivo** podem ser congelados e descongelados por, no máximo, 12 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar redução do título.

O **Controle Positivo** apresenta as seguintes advertências (S):

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

PROCEDIMENTO

O produto « **Enterovírus - Controle Positivo** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **Enterovírus Q - PCR Alert AmpliPROBE**».

O **Controle Positivo** 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 com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto « **Enterovírus Q - PCR Alert AmpliMIX**», bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

Nota: O **Controle Positivo** pode ser congelado e descongelado por no máximo 12 vezes.

REFERÊNCIAS

KUAN M. M., (1997) J. Clin. Microbiol. 35: 2598 - 2601

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

80298490066

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												