

# RTSD01-II

## Fator II G20210A Q - PCR Alert Kit

### Instruções de Uso

#### USO PRETENDIDO

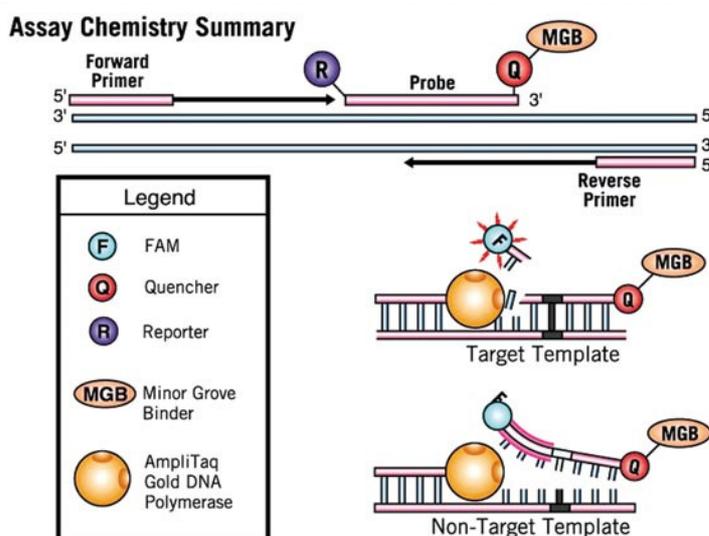
O produto **FATOR II Q-PCR Alert** é um kit para teste de amplificação quantitativa de ácidos nucleicos para a determinação alélica do locus de coagulação Factor II (FII) para o polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP) G20210A (3' UTR) em amostras de DNA extraído do sangue total coletado em EDTA.

O produto é usado, juntamente com os dados clínicos e outros exames de laboratório, na avaliação do risco de trombose venosa profunda.

#### PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

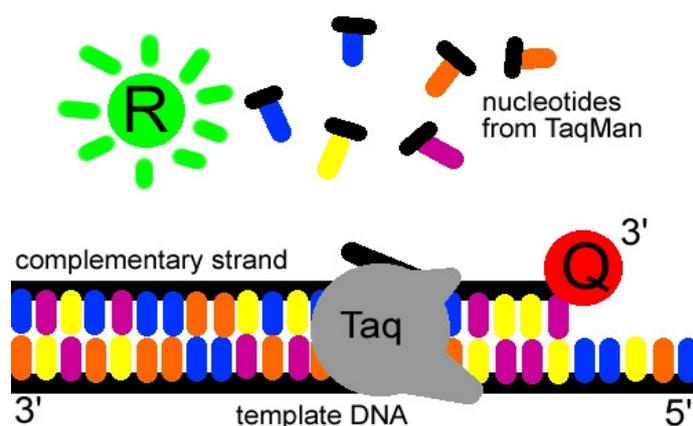
O teste envolve uma reação de amplificação em Tempo Real (Real Time) realizado em microplaca em um equipamento com termostato programável fornecido com sistema ótico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

Em cada poço se efetua uma reação de amplificação específica para a região do gene humano do Factor II afetada pelo SNP G20210A utilizando o DNA extraído das amostras em teste. Uma sonda específica para o alelo normal FII 20210G, marcada com o fluoróforo FAM, é ativada quando hibridiza com o produto "normal" da reação de amplificação. Outra sonda específica para o alelo mutante FII 20210A, marcada com o fluoróforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto "mutante" da reação de amplificação. A emissão da fluorescência aumenta conforme os produtos específicos da reação de amplificação aumentam, e é medida e registrada pelo equipamento. O processamento dos dados permite determinar a presença dos alelos no DNA extraído da amostra inicial.



A partir do momento que a probe TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers se

anelam ao DNA. A 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 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
Fator II Q-PCR Alert AmpliMIX - RTSD01-II-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Fator II Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTSD01-II-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 <sub>2</sub> , 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 nas descrições abaixo.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
Fator II Q-PCR Alert AmpliMIX	RTSD01-II-M	4 x 110 µL	-20°C
Fator II Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTSD01-II-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 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 autoclavado a 121°C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável, se 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 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 FATOR II Q-PCR Alert AmpliMIX, FATOR II Q-PCR Alert AmpliPROBE, FATOR II AmpliSTANDARD, Q-PCR AmpliMASTER, apresentam as seguintes advertências (S):  
**S 23-25.** Não respirar vapores/aerosol. 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 contenham o Controle Positivo devem ser congelados e descongelados por um máximo de doze vezes. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento poderiam causar uma perda de titulação.
- Os tubos que contêm o AmpliMASTER não podem ser congelados e descongelados 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 produto deve ser utilizado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: sangue total coletado em EDTA

As amostras de sangue total destinadas à extração do DNA devem ser colhidas em EDTA segundo as indicações do laboratório, transportadas a +2°C/ +8°C e conservadas a +2°C/+8°C por, no máximo, três dias. Caso contrário, devem ser congeladas e conservadas a -20°C por um máximo de trinta dias.

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

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

Aconselha-se introduzir na reação de amplificação uma quantidade de DNA extraído igual a cerca 175ng (correspondente de aproximadamente 25.000 células). Não introduzir na reação de amplificação uma quantidade de DNA extraído superior a 200 ng para evitar possíveis fenômenos de hibridação inespecífica ou a inibição da emissão da fluorescência.

### Substâncias interferentes

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

O DNA extraído da amostra inicial não deve conter hemoglobina para evitar fenômenos de inibição da amplificação e da emissão da fluorescência e a aparição de frequentes resultados não válidos.

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

### Descrição do Procedimento - Instruções de Uso:

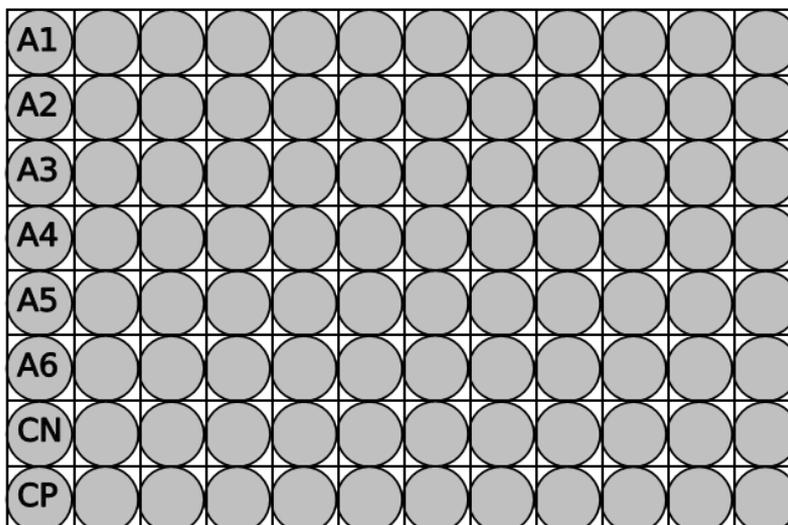
#### a) Preparo da etapa de amplificação real time - área de pós PCR:

Antes de iniciar, é necessário:

- consultando o manual do equipamento, ligar o termociclador real time, ligar o computador de controle, abrir a sessão "absolute quantification" no software específico;
- consultando o manual do equipamento, programar primeiramente o "detector" para a sonda para o alelo normal "nor FII 20210G " com o "reporter" = "FAM" e o "quencher" = "none" (NFQ é um quencher não fluorescente);
- consultando o manual do equipamento, programar em segundo lugar o "detector" para a sonda para o alelo mutante "mu FII 20210A" com o "reporter" = "VIC" e o "quencher" = "none" (NFQ é um quencher não fluorescente);
- consultando o manual do equipamento, para qualquer poço em uso 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 de amplificação, controle positivo de amplificação). Adicionar esta informação à planilha de trabalho anexa ao final deste documento, escrever estas

informações ou imprimir a montagem da microplaca feita diretamente em um computador. A planilha de trabalho deverá ser seguida com atenção durante a disposição nos poços da mistura de reação e das amostras.

Ilustra-se logo abaixo, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 6 amostras:



**Significado:** A1 - A6: Amostras para analisar; CN: Controle negativo de amplificação; CP: Controle positivo de amplificação.

- Consultando o manual do equipamento, programar o termociclador os parâmetros do ciclo térmico e um volume de reação de 25 µL. Para equipamento Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000 escolher a opção "9600 emulation".

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

**b) Preparação da amplificação:**

*Antes de iniciar, é necessário:*

(Para realizar na área de extração / preparação da reação de amplificação)

- retirar e descongelar os tubos com as amostras para analisar. Centrifugar os tubos para obter no fundo o conteúdo e mantê-lo em gelo;
- retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX necessários para a sessão lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo e mantê-lo em gelo;
- retirar e descongelar um número de tubos de AmpliPROBE iguais aos dos tubos de AmpliMIX. Centrifugar os tubos por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo e mantê-lo em gelo;
- retirar um número de tubos de AmpliMASTER iguais aos dos tubos de AmpliMIX. Escrever com tinta permanente o nome do teste "FATOR II" e a data na etiqueta dos

tubos. Centrifugar os tubos por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo e mantê-lo em gelo;

- retirar e descongelar o tubo de Controle positivo. Centrifugar o tubo por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo e mantê-lo em gelo;
- se necessário, cortar a Microplaca de amplificação para separar a parte utilizada na sessão prestando atenção em manipulá-la com luvas sem pó e de não causar danos aos pocinhos.

1. Transferir 100  $\mu$ L de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100  $\mu$ L na mix.
2. Transferir 100  $\mu$ L de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100  $\mu$ L na mix.
3. Misturar por 5 segundos com o vortex a baixa velocidade, evitando produzir espuma.
4. Centrifugar os tubos por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo.
5. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo, 20  $\mu$ L da mistura de reação assim obtida nos poços da Microplaca de amplificação como estabelecido anteriormente no Plano de trabalho.

**Nota:** Se não se utiliza toda a mistura de reação, conservar o volume restante em ambiente escuro a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um máximo de um mês no tubo "FATOR II". Congelar e descongelar a mistura de reação somente uma vez.

6. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo, 5  $\mu$ L de DNA extraído da primeira amostra no correspondente pocinho da Microplaca de amplificação como estabelecido anteriormente no Plano de trabalho, proceder igualmente com todos os outros DNA extraídos.
7. Transferir, depositando-os cuidadosamente na mistura de reação, 5  $\mu$ L de Água bidestilada estéril (não fornecida no kit) no pocinho da Microplaca de amplificação do controle negativo de amplificação como estabelecido anteriormente no Plano de trabalho.
8. Transferir, depositando-os cuidadosamente na mistura de reação, 5  $\mu$ L de Controle positivo no poço da Microplaca de amplificação do controle positivo de amplificação como estabelecido anteriormente no Plano de trabalho.
9. Fechar cuidadosamente a Microplaca de amplificação com a Lâmina adesiva de amplificação.
10. Transferir a Microplaca de amplificação para o temociclador para real time na área de amplificação/detecção dos produtos de amplificação e iniciar o ciclo térmico de amplificação.

## 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

### Interpretação dos resultados

Os valores de fluorescência FAM emitidos pela sonda específica para o alelo normal FII 20210G são identificados pelo detector "nor FII 20210G" (FAM). Os valores da fluorescência VIC emitidos pela sonda específica para o alelo mutante FII 20210A são identificados por detector "mu FII 20210A" (VIC). Estes valores de fluorescência das reações de amplificação devem ser analisados pelo software dos equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000.

Antes de iniciar a análise é necessário:

- consultando o manual do equipamento, programar manualmente o Limiar (Threshold) para o "detector" "nor FII 20210G" para 0,2;
- consultando o manual do equipamento, programar manualmente o Limiar (Threshold) para o "detector" "mu FII 20210A" para 0,2;
- consultando o manual do equipamento, programar manualmente variação do intervalo de cálculo do Nível de background de fluorescência (Baseline) do ciclo 6 ao ciclo 15;

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para o alelo normal FII 20210G e mutante FII 20210A nas reações de amplificação e o valor de Threshold de fluorescência são utilizados para determinar o Ciclo Threshold (cT), ou seja, o ciclo de amplificação no qual o valor de fluorescência emitido por cada sonda atinge o valor de Threshold.

Os valores dos cT para as sondas específicas para o alelo normal FII 20210G (FAM) e para o alelo mutante FII 20210A (VIC) na reação de amplificação do Controle Negativo são utilizados para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Amplificação Controle Negativo	Amplificação / Detecção
cT FAM = Indeterminado	CORRETO
cT VIC = Indeterminado	CORRETO

Onde cT FAM é o Ciclo Threshold do alelo normal e cT VIC é o Ciclo Threshold do alelo mutante.

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente do Indeterminado, a presença de DNA alvo na reação de amplificação foi detectada através da determinação do Ciclo Threshold. Problemas podem ter ocorrido durante a fase de amplificação (contaminação) as quais podem causar resultados incorrectos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores cT das sondas específicas para o alelo normal FII 20210G (FAM) e para o alelo mutante FII 20210A (VIC) na reação de amplificação do Controle Positivo são utilizados para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Amplificação Controle Positivo	Amplificação / Detecção
$20 \leq cT \text{ FAM} \leq 25$	CORRETO
$20 \leq cT \text{ VIC} \leq 25$	CORRETO
$0 \leq  cT \text{ FAM} - cT \text{ VIC}  \leq 1,5$	CORRETO

Onde  $|cT \text{ FAM} - cT \text{ VIC}|$  é o valor absoluto da diferença entre o Ciclo Threshold do alelo normal e o Ciclo Threshold do alelo mutante.

Se o resultado da reação de amplificação do Controle Positivo não está dentro dos limites, isso significa que problemas ocorreram durante a fase de amplificação e detecção (preparação incorreta mistura de reação, dispensação incorreta do controle positivo e das amostras, degradação da sonda, posicionamento incorreto do controle positivo, programação incorreta do termociclador) que podem causar resultados incorretos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores cT das sondas específicas para o alelo normal FII 20210G (FAM) e do alelo mutante FII 20210A (VIC) na reação de amplificação de cada amostra são utilizados para validar a amplificação e a detecção e para a determinação alélica do genótipo de cada amostra como descrito na tabela seguinte:

Amplificação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	Genótipo da amostra
cT FAM > 27,5 e cT VIC > 27,5		Inadequado	Inválido	-
cT FAM ≤ 27,5 ou cT VIC ≤ 27,5	cT FAM Indet. e cT VIC ≤ 27,5 ou  cT FAM - cT VIC  ≥ 2,5 com cT FAM > cT VIC	adequado	válido	HOMOZIGOTO MUTANTE
	cT FAM ≤ 27,5 e cT VIC Indet. ou  cT FAM - cT VIC  ≥ 2,5 com cT FAM < cT VIC	adequado	válido	HOMOZIGOTO NORMAL
	2,0 <  cT FAM - cT VIC  < 2,5	Inadequado	válido	INDETERMINADO
	0 ≤  cT FAM - cT VIC  ≤ 2,0	adequado	válido	HETEROZIGOTO

Onde  $|cT\text{ FAM} - cT\text{ VIC}|$  é o valor absoluto da diferença entre o Ciclo Threshold do alelo normal e o Ciclo Threshold do alelo mutante.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é: **cT FAM > 27,5 e cT VIC > 27,5**, isso significa que problemas ocorreram durante a fase de amplificação (amplificação ineficiente ou inválida) ou na fase de extração (ausência de DNA ou presença de inibidores ou amostras iniciais com um número de células insuficiente) que podem causar resultados incorretos. 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: **valor absoluto da diferença entre cT FAM e cT VIC compreendido entre 2,0 e 2,5**, isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação (amplificação não eficiente) ou na fase de extração (presença de inibidores ou amostras iniciais com um número excessivo de células) que não permitiram a determinação alélica do genótipo. A amostra não é adequada, o teste é indeterminado e deve ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

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

## LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Utilizar com este produto somente o DNA extraído das seguintes amostras humanas: sangue total coletado em EDTA.

Não utilizar com este produto uma quantidade de DNA extraído superior à recomendada: quantidades maiores de DNA extraído podem causar resultados incorretos ou indeterminados.

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

Não utilizar com este produto o DNA extraído contaminado com hemoglobina: a hemoglobina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados não válidos; a hemoglobina interfere na medição da fluorescência e pode causar resultados indeterminados ou incorretos.

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

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, dos controles positivos e dos mesmos produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados incorretos. A modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; mas estes fenômenos podem ser evitados somente seguindo o manual de as boas práticas do laboratório e executando a técnica de acordo com as instruções fornecidas neste manual.

Este produto requer pessoal instruído para a manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de preparações químicas classificadas como perigosas para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer roupas de trabalho e áreas de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas, que podem transmitir agentes infecciosos e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para o procedimento de biologia molecular, como a extração, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos.

Este produto requer uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados incorretos. (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 incorretos.

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 pequeno risco de obter resultados inválidos ou incorretos com este produto. Este risco não pode ser eliminado ou reduzido. Este risco, em situações particulares, pode contribuir a decisões incorretas com consequências potencialmente graves para o paciente.

## CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

### Controles de Qualidade

É aconselhável validar o procedimento completo de análise para cada extração e amplificação processando uma amostra normal, uma amostra homocigota mutante e uma amostra heterocigota já testadas anteriormente.

### Controles de Amplificação

É necessário validar 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) adicionada em um poço de reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controle positivo, utilizar o DNA obtido de uma amostra positiva heterocigota já testada ou o «CONTROLE POSITIVO - Factor II».

## 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:

Em termos de detecção limite, a sensibilidade analítica deste teste permite identificar a presença de aproximadamente 14.000 moléculas de DNA alvo (correspondentes aos genomas de 7.000 células ou a 50 ng de DNA genômico humano) nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

O limite de detecção foi testado utilizando um DNA genômico humano cuja concentração inicial foi determinada pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 260 nm. Uma diluição de DNA genômico humano na quantidade de 50 ng/reação foi usado em 50 repetições de um procedimento completo de análise, amplificação e detecção com os nossos produtos.

Todas as repetições foram validadas e determinados corretamente.

Amostra heterocigota	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
DNA genômico humano	50	50	0	0	0

### Sensibilidade analítica: capacidade de identificar o alelo mutante

Em termos de sua capacidade de identificar o alelo mutante, a sensibilidade analítica do teste é maior que 99%.

A capacidade de identificar o alelo mutante (nr. de resultados corretos de resultados válidos) foi verificada utilizando uma quantidade de amostra de sangue total com genotipagem conhecida heterocigota, uma quantidade de amostras de sangue total com genotipagem conhecida homocigota mutante e um número de amostras de DNA artificiais (um plasmídeo contendo a região de interesse) imitando uma genotipagem homocigota mutante. As amostras foram usadas para procedimento completo de análise, extração, amplificação e detecção com nossos produtos.

Das 224 determinações, 224 foram válidas (ao menos um dos cT menor ou igual a

27,5), 224 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum heterozigoto foi tomado com um homozigoto normal e nenhum homozigoto mutante foi tomado por um heterozigoto), nenhuma amostra deu um resultado indeterminado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Heterozigotas	112	112	0	0	0
Homozigotas mutantes (naturais)	36	36	0	0	0
Homozigotas mutantes (artificiais)	76	76	0	0	0

#### Especificidade analítica: incapacidade de identificar alelos mutantes como normal

Em termos de inabilidade para identificar alelos normais como mutante, a especificidade analítica deste ensaio é maior que 99%.

A capacidade de identificar corretamente o alelo normal (nr. de resultados corretos de resultados válidos) foi verificada utilizando uma certa quantidade de amostras de sangue total com genotipagem conhecida como homozigota normal e heterozigota. Estas amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção, como nossos produtos.

Em 224 determinações, 224 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5), 224 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum homozigoto normal foi tomado por um heterozigoto e nenhum heterozigoto foi tomado por um homozigoto mutante), nenhuma amostra deu um resultado indeterminado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Homozigotas normais	112	112	0	0	0
Heterozigotas	112	112	0	0	0

#### Resistência: valor limite do cT para validação

A resistência deste teste permite obter uma frequência de amostras válidas superior a 99% com um valor limite do cT para a validação igual a 27,5.

O valor limite do cT foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total de genotipagem conhecida de homozigoto normal, heterozigoto e homozigoto mutante. As amostras foram empregadas para realizar o procedimento completo de análises, extração, amplificação e detecção com nossos produtos.

Em 260 determinações, 260 amostras deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5) e nenhuma amostra deu um resultado inválido (ambos os cT maiores que 27,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Homozigotas normais	112	112	0	0	0
Heterozigotas	112	112	0	0	0
Homozigotas mutantes (naturais)	36	36	0	0	0

#### Resistência: diferença entre os valores cT dos homozigotos

A resistência deste teste permite determinar os homozigotos com uma frequência superior a 99% com um valor da diferença dos cT dos dois alelos maior ou igual a 2,5.

A diferença de cT entre os dois alelos para os homozigotos foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total com genotipagem conhecida de homozigoto normal,

algumas amostras de sangue total com genotipagem conhecida de homocigoto mutante e algumas amostras artificiais de DNA (um plasmídeo contendo a região de interesse) que imitam uma genotipagem homocigótica mutante. As amostras foram empregadas para realizar o procedimento completo de análises, extração, amplificação e detecção com nossos produtos.

Em 224 determinações, 224 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5), 224 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum homocigoto foi tomado por um heterocigoto), nenhuma amostra deu um resultado indeterminado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Homocigotas normais	112	112	0	0	0
Homocigotas mutantes (naturais)	36	36	0	0	0
Homocigotas mutantes (artificiais)	76	76	0	0	0

### Resistência: diferença de cT de heterocigotos

A resistência deste teste permite determinar os heterocigotos com uma frequência superior a 99% com um valor da diferença dos cT dos dois alelos compreendido entre 0 e 2,0.

O valor da diferença dos cT dos dois alelos para os heterocigotos foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total com genotipagem conhecida de heterocigoto. As amostras foram empregadas para realizar o procedimento completo de análises, extração, amplificação e detecção com nossos produtos.

Em 112 determinações, 112 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5), 112 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum heterocigoto foi tomado por um homocigoto), nenhuma amostra deu um resultado Indeterminado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Heterocigotas	112	112	0	0	0

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade deste teste, em termos de sua capacidade em obter os mesmos resultados das mesmas amostras em diferentes sessões, é superior a 95%.

A capacidade de obter os mesmos resultados de mesma amostra em diferentes sessões foi testado utilizando algumas amostras de sangue total com genotipagem conhecida de homocigoto normal e heterocigoto. As amostras foram empregadas para realizar o procedimento completo de análises, extração, amplificação e detecção com nossos produtos.

Das 3 sessões de determinação alélica realizadas em dias diferentes com as mesmas 23 amostras, 23 resultados foram concordantes.

Amostras	N	Sessões	Concordantes	Discordantes
Homocigotas normais	14	3	14	0
Heterocigotas	9	3	9	0

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

POORT, S. R. et al. (1996) *Blood* **88**: 3698 - 3703.

## 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](mailto:biometrix@biometrix.com.br)  
Website: [www.biometrix.com.br](http://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

RTDS01-II-M: 80298490121  
RTDS01-II-P: 80298490033

## RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira  
CRQ/PR: 09302336

**Aprovação:**

20/12/2013

X



---

Maurício Cichon  
Laboratório  
Assinado por: Maurício Cichon

# CTRD01-II

## Fator II - Controle Positivo

### Instruções de Uso

#### USO PRETENDIDO

O produto «Fator II - Controle Positivo» é destinado ao uso como um controle positivo em reações de amplificação seguidas de hibridização com probes fluorescentes para a determinação alélica para o polimorfismo em nucleotídeos únicos (SNP) G20210A (3' UTR) no locus do Fator II de coagulação com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», «Fator II Q - PCR Alert AmpliMIX» e «Fator II Q - PCR Alert AmpliPROBE» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

#### DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **Controle Positivo** fornece uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida, divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo teste contém 65µL de solução, suficiente para 12 sessões.

O procedimento envolve o uso do Controle Positivo na reação de amplificação específica para a região gênica Fator II incluindo o SNP de interesse. A detecção do produto específico da reação de amplificação confirma a habilidade do sistema de determinação alélica em identificar a presença apenas do tipo selvagem ou gene alelo mutado, bem como para identificar uma amostra heterozigota.

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

#### MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Fator II Controle Positivo	Solução de plasmídeo	2 x 65µL	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura

- Armazenar a -20°C ou inferior.

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Agitador Vórtex.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- 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.
- « Fator II Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTSD01-II-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « Fator II Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTSD01-II-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 à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

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

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

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

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo 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 uma redução do título.

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

S 24-25 Evitar contato com os olhos e pele.

#### **PROCEDIMENTO**

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

O **Controle Positivo Fator II** está pronto para o uso, portanto deve ser usado adicionando 5µL diretamente na mistura de reação.

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

**Nota:** Os **Controles Positivos** podem ser congelados e descongelados por, no máximo, 12 vezes.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

POORT, S. R. et al. (1996) Blood 88: 3698 - 3703.

## 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](mailto:biometrix@biometrix.com.br)  
Website: [www.biometrix.com.br](http://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

80298490050

## 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												