

RTSD01-V

Fator V G1691A Q - PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto **FATOR V (G1691A) Q-PCR Alert Kit Tempo Real**, pronto para uso, é parte de um teste quantitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a determinação alélica do lócus do Factor V da coagulação (FV), para o polimorfismo em nucleotídeos únicos (SNP) G1691A (R506Q, Leiden) em amostras de DNA extraído do sangue total colhido em EDTA.

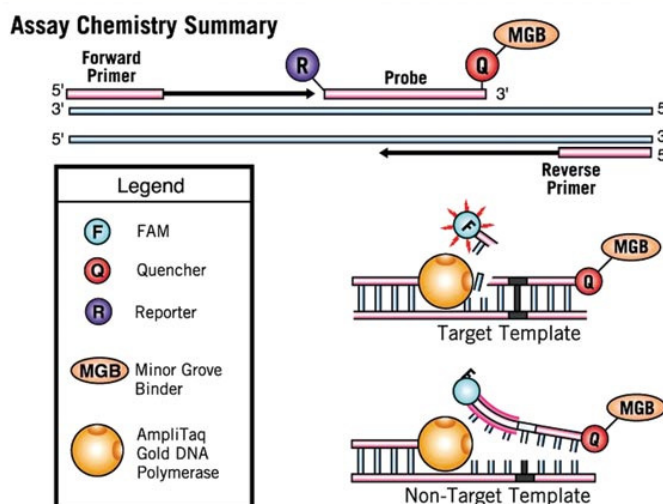
O produto é usado, juntamente com os dados clínicos e outros exames de laboratório, na avaliação do risco de trombose venosa profunda.

PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

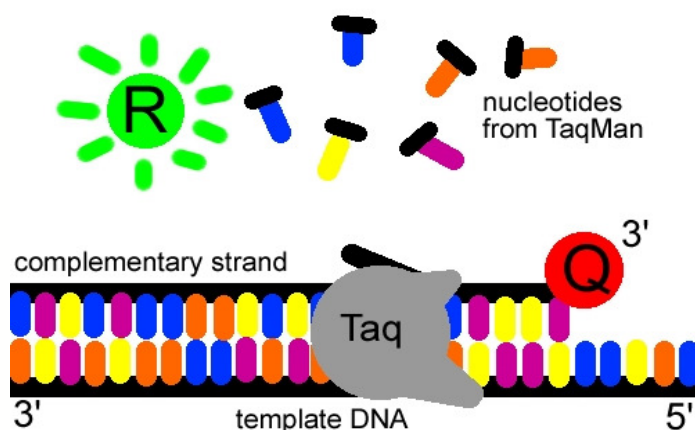
O procedimento consiste na reação de amplificação em tempo real em microplaca com uma variação e controle de temperatura programável e sistema óptico de detecção fluorescente simultânea à reação (Termociclador em Tempo Real).

O teste prevê a execução de uma reação de amplificação real time em microplaca com um termostato programável com sistema óptico de detecção da fluorescência (Termociclador para real time).

Em cada poço se efetua uma reação de amplificação específica para a região do gene humano do Factor V detectada pelo SNP G1691A utilizando o DNA extraído das amostras em exame. Uma sonda específica para o alelo normal FV 1691G (R506), marcada com o fluoróforo FAM, é ativada quando hibridiza com o produto "normal" da reação de amplificação. Outra sonda específica para o alelo mutado FV 1691A (Q506, Leiden), marcada com o fluoróforo VIC, é ativada quando hibridiza com o produto "mutado" da reação de amplificação. A emissão da fluorescência aumenta com o aumentar dos produtos específicos da reação de amplificação e é medida e registrada pelo equipamento. A elaboração dos dados permite determinar a presença dos alelos no DNA extraído da amostra de partida.



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



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

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

COMPONENTES FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Fator V G1691A Q-PCR Alert AmpliMIX - RTSD01-V-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	4 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Fator V G1691A Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTSD01-V-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 Lâmina adesiva vedante	3 3	Plástico PP Plástico e cola

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamentos:

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

Material de Consumo:

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

Amostras:

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

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
Fator V G1691A Q-PCR Alert AmpliMIX	RTSD01-V-M	4 x 110 µL	-20 °C
Fator V G1691A Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTSD01-V-P	4 x 110 µL	-20 °C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2° / +8 °C
Microplaca para amplificação		3	Temp. Ambiente
Lâmina adesiva para amplificação		3	Temp. Ambiente

PRECAUÇÕES

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

Manuseio: ao manusear o kit e as amostras, utilizar EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra - material biológico humano. Não beber ou comer na área de trabalho.

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

Não manusear o kit sem luvas.

Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais usados como se fossem agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas. Evitar a formação de aerossol durante o procedimento - evitar respingar material ao redor da área de trabalho ou fora dela. O material que está em contato com as amostras biológicas deve ser

tratado com Hipoclorito de sódio a 3 % pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121 °C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável combustível deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contêm ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Não pipetar nenhuma solução com a boca .

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

Eliminar reagentes e resíduos conforme as normas vigentes.

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

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

Respeitar a data de validade do kit.

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

Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

Advertências e precauções para a biologia molecular

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

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

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

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

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

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

Advertências e precauções específicas para os componentes

- Os produtos FATOR V Q-PCR Alert AmpliMIX, FATOR V Q-PCR Alert AmpliPROBE, FATOR V AmpliSTANDARD, Q-PCR AmpliMASTER, apresentam as seguintes advertências (S):
S 23-25. Não respirar vapores/aerossol. Evitar o contato com os olhos.

Observações importantes:

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

- Os tubos que 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 por mais de 1 vez. Ciclos sucessivos de congelamento / descongelamento podem causar uma perda na eficiência da amplificação.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

Amostras

Este produto deve ser utilizado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: sangue total colhido 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 um máximo de três dias, em 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 à 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 de partida não deve conter heparina para evitar fenômenos de inibição da amplificação e a aparição de frequentes resultados não válidos.

O DNA extraído da amostra de partida 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.

Controles de amplificação

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

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

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

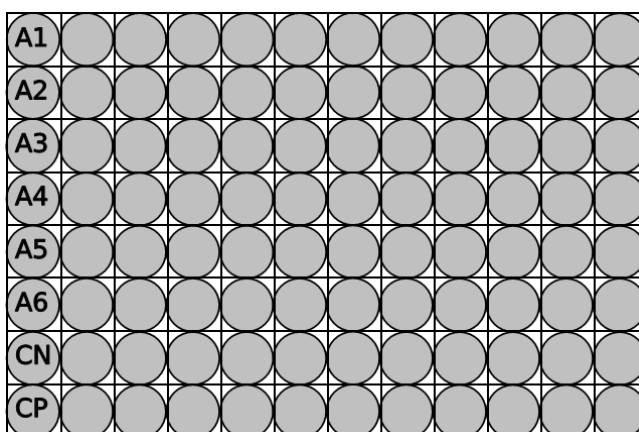
PROCESSO DE MEDIÇÃO

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

Antes de iniciar, é necessário consultar o manual do equipamento e:

- ligar o termociclador e o computador, iniciar o software específico e abrir uma sessão "absolute quantification";
- programar primeiramente o "detector" para a sonda para o alelo normal "nor FV 1691G" com o "reporter" = "FAM" e o "quencher" = "none" (NFQ é um quencher não fluorescente);
- programar em segundo lugar o "detector" para a sonda para o alelo mutado "mu FV 1691A" com o "reporter" = "VIC" e o "quencher" = "none" (NFQ é um quencher não fluorescente);
- para qualquer poço em uso da microplaca, programar o "detector" (tipo de fluorescência para medir), o "passive reference" = "ROX" (normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controle negativo de amplificação, do controle positivo de amplificação). Compilar a planilha anexada ao final destas instruções de uso, transcrevendo estas informações, ou imprimir a organização da microplaca. A planilha deverá ser seguida com atenção durante a transferência nos pocinhos da mistura de reação e das amostras.

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



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

- Programar no 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 todo o conteúdo. 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 todo o conteúdo. 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 todo o conteúdo. Mantê-lo em gelo;
- retirar um número de tubos de AmpliMASTER iguais aos dos tubos de AmpliMIX. Escrever com tinta indelével o nome do teste "FATOR V" e a data na etiqueta dos tubos. Centrifugar os tubos por 5 segundos para obter no fundo todo o conteúdo. Mantê-lo em gelo;
- retirar e descongelar o tubo de Controle positivo. Centrifugar o tubo por 5 segundos para obter no fundo todo o conteúdo. 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 µL de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mi.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem pipetando por três vezes o volume de 100 µL na mix.
3. Misturar por 5 segundos com o vórtex 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 µL 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° por um máximo de um mês no tubo "FATOR V". Congelar e descongelar a mistura de reação somente uma vez.

6. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo, 5 µL 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 µL 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 µL 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 no thermal - cycler 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 registados da fluorescência FAM emitidos pela sonda específica para o alelo normal FV 1691G são identificados por "detector" "nor FV 1691G" (FAM). Os valores registados da fluorescência VIC emitidos pela sonda específica para o alelo mutado FV 1691A são identificados por "detector" "mu FV 1691A" (VIC). Estes valores de fluorescência das reações de amplificação devem ser analisados através de software específico.

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

- programar manualmente o Limiar (Threshold) para o "detector" "nor FV 1691G" a 0,2;
- programar manualmente o Limiar (Threshold) para o "detector" "mu FV 1691A" a 0,2;
- programar manualmente o intervalo de cálculo do Nível de fluorescência de fundo (Baseline) do ciclo 6 ao ciclo 15;

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para os alelos normal FV 1691G e mutado FV 1691A nas reações de amplificação e o valor Limiar (Threshold) de fluorescência são utilizados para determinar o Ciclo limiar / Threshold (cT), ou seja, o ciclo de amplificação no qual o valor de fluorescência emitido por cada sonda atingiu o valor Limiar de fluorescência.

Os valores dos cT relativos às sondas específicas para os alelos normais FV 1691G (FAM) e mutado FV 1691A (VIC) na reação de amplificação do Controle negativo são utilizados para confirmar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Reação Controle negativo	Amplificação / Detecção
cT FAM = Indeterminado	CORRETO
cT VIC = Indeterminado	CORRETO

Onde cT FAM é o Ciclo limiar do alelo normal e cT VIC é o Ciclo limiar do alelo mutado.

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado (Undetermined), foi detectada a presença de DNA branco na reação de amplificação. Problemas ocorreram na fase de amplificação (contaminação) que podem ter levado a resultados incorretos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores dos cT relativos às sondas específicas para os alelos normais FV 1691G (FAM) e mutado FV 1691A (VIC) na reação de amplificação do Controle Positivo são utilizados para confirmar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

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

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

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 ou detecção (preparação incorreta da 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 ter levado a resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores dos cT relativos às sondas específicas para os alelos normais FV 1691G (FAM) e mutado FV 1691A (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
$cT\text{ FAM} > 27,5$ e $cT\text{ VIC} > 27,5$		Inadequado	Inválido	-
$cT\text{ FAM} \leq 27,5$ ou $cT\text{ VIC} \leq 27,5$	$cT\text{ FAM Indet. e } cT\text{ VIC} \leq 27,5$ ou $ cT\text{ FAM} - cT\text{ VIC} \geq 2,5$ com $cT\text{ FAM} > cT\text{ VIC}$	adequado	válido	HOMOZIGOTO MUTANTE
	$cT\text{ FAM} \leq 27,5$ e $cT\text{ VIC Indet.}$ ou $ cT\text{ FAM} - cT\text{ VIC} \geq 2,5$ com $cT\text{ FAM} < cT\text{ VIC}$	adequado	válido	HOMOZIGOTO NORMAL
	$2,0 < cT\text{ FAM} - cT\text{ VIC} < 2,5$	Inadequado	válido	INDETERMINADO
	$\text{zero} \leq cT\text{ FAM} - cT\text{ VIC} \leq 2,0$	adequado	válido	HETEROZIGOTO

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

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é: $cT\text{ FAM} > 27,5$ e $cT\text{ VIC} > 27,5$, 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 ter levado a 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 durante a fase de amplificação (amplificação ineficiente) ou na fase de extração (presença de inibidores ou amostras iniciais com um número de células muito elevado) que não permitem 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 precisamente com este produto o DNA extraído das seguintes amostras humanas: sangue total colhido 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 com uma boa prática das técnicas de laboratório e seguindo atentamente 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.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho 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 risco latente de obter resultados não válidos ou incorretos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou reduzido posteriormente. Este risco residual em situações particulares, pode contribuir a decisões incorretas com consequências potencialmente graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

É aconselhável confirmar o completo procedimento de análise de cada sessão, extração e amplificação, utilizando uma amostra normal, uma amostra homocigota mutada e uma amostra heterocigota já testadas.

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, como limite de detecção, permite identificar a presença de aproximadamente 14.000 moléculas de DNA branco (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 verificado utilizando um DNA genômico humano cuja concentração foi determinada por leitura no espectrofotômetro de absorvância a 260 nm. O DNA genômico humano foi empregado em uma quantidade de 50 ng por reação em 50 repetições para realizar o completo procedimento de análise, amplificação e detecção com os produtos Nanogen.

Todos as réplicas são resultados válidos 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 mutado

A sensibilidade analítica deste teste, como capacidade de identificar o alelo mutado, é superior a 99%.

A capacidade de identificar o alelo mutado (resultados corretos sobre resultados válidos) foi verificada utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente heterocigoto, algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homocigoto mutado e algumas amostras artificiais de DNA (um plasmídeo contendo a região de interesse) que mimetizam o genótipo homocigoto mutado. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 222 determinações, 220 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5). Em 220 determinações válidas, 220 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum heterocigoto foi tomado com um homocigoto normal e nenhum homocigoto mutado 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
Heterozigotas	110	108	0	2	0
Homozigotas mutadas (naturais)	53	53	0	0	0
Homozigotas mutadas (artificiais)	59	59	0	0	0

Especificidade analítica: capacidade de não identificar como mutado o alelo normal

A especificidade analítica deste teste, como capacidade de não identificar como mutado o alelo normal, é superior a 99%.

A capacidade de identificar corretamente o alelo normal (resultados corretos sobre resultados válidos) foi verificada utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homocigoto normal e heterocigoto. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 222 determinações, 218 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5). Em 218 determinações válidas, 218 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum homocigoto normal foi tomado por um heterocigoto e nenhum heterocigoto foi tomado por um homocigoto mutado), 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	110	0	2	0
Heterozigotas	110	108	0	2	0

Resistência: valor limite do cT para a confirmação

A resistência deste teste permite obter uma frequência de amostras válidas igual a 98,5% com um valor limite do cT para a confirmação igual a 27,5.

O valor limite do cT foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homocigoto normal, heterocigoto e homocigoto mutado. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 275 determinações, 271 amostras deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5) e 4 amostras deram um resultado não válido (ambos os cT maiores que 27,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Homozigotas normais	112	110	0	2	0
Heterozigotas	110	108	0	2	0
Homozigotas mutadas (naturais)	53	53	0	0	0

Resistência: valor da diferença dos cT dos homocigotos

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

O valor da diferença dos cT dos dois alelos para os homocigotos foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homocigoto normal, algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homocigoto mutado e algumas amostras artificiais de DNA (um plasmídeo contendo a região de interesse) que mimetizam um genótipo homocigoto mutado. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 224 determinações, 222 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou

igual a 27,5). Em 222 determinações válidas, 222 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum homozigoto foi tomado por um heterozigoto), nenhuma amostra deu um resultado não determinado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Homozigotas normais	112	110	0	2	0
Homozigotas mutadas (naturais)	53	53	0	0	0
Homozigotas mutadas (artificiais)	59	59	0	0	0

Resistência: valor da diferença dos cT dos heterozigotos

A resistência deste teste permite determinar os heterozigotos 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 heterozigotos foi estabelecido utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente heterozigoto. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 110 determinações, 108 deram um resultado válido (ao menos um dos cT menor ou igual a 27,5). Em 108 determinações válidas, 108 amostras deram um resultado correto, nenhuma amostra deu um resultado incorreto (nenhum heterozigoto foi tomado por um homozigoto), nenhuma amostra deu um resultado Indeterminado (diferença entre os cT compreendida entre 2,0 e 2,5).

Amostras	N	Corretas	Incorretas	Inválidas	Indeterminadas
Heterozigotas	110	108	0	2	0

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade deste teste, como capacidade de obter em sessões diversas os mesmos resultados a partir das mesmas amostras, é superior a 95%.

A capacidade de obter em sessões diversas os mesmos resultados a partir das mesmas amostras foi verificada utilizando algumas amostras de sangue total de genótipo sabidamente homozigoto normal e heterozigoto. As amostras foram empregadas para realizar o completo procedimento de análises, extração, amplificação e detecção.

Em 3 sessões de determinação alélica realizadas em dias diferentes com as mesmas 21 amostras, 21 deram um resultado concordante.

Amostras	N	Sessões	Concordantes	Discordantes
Homozigotas normais	14	3	14	0
Heterozigotas	6	3	6	0
Homozigotos mutados	1	3	1	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VOORBERG, J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 - 1536.
 BAKER, R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162.

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

RTDS01-V-M: 80298490096
RTDS01-V-P: 80298490041

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X 

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

CTRD01-V

Fator V - Controle Positivo

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «Fator V - 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) G1691A (R506Q, Leiden) no locus do Fator V de coagulação com os produtos «Q - PCR Alert AmpliMASTER», « Fator V Q - PCR Alert AmpliMIX» e « Fator V Q - PCR Alert AmpliPROBE» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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

O procedimento envolve o uso do Controle Positivo na reação de amplificação específica para a região gênica **Fator V** 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 5µL por reação.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Fator V 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 V Q - PCR Alert AmpliMIX» (RTSD01-V-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- «Fator V Q - PCR Alert AmpliPROBE» (RTSD01-V-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 descartar.

Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

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

O **Controle Positivo Fator V** 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 « **Fator V 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

VOORBERG, J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 - 1536.

BAKER, R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162.

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

80298490062

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												

ATTACHMENT