

Simplexa™ BKV Padrões de quantificação

REF MOL2310
Rev. B



Os padrões de quantificação Simplexa™ BKV foram criados para definir uma curva padrão para o ensaio Simplexa™ BKV no ciclador 3M Integrated Cycler.

Para uso diagnóstico *in vitro*

APLICAÇÃO

A Focus Diagnostics criou os padrões de quantificação Simplexa™ BKV para definir uma curva padrão para o ensaio Simplexa™ BKV no ciclador 3M Integrated Cycler.

MATERIAIS FORNECIDOS

O kit de padrões de quantificação Simplexa™ BKV da Focus Diagnostics contém quantidade suficiente de materiais para duas reações.

Descrição do kit de padrão de quantificação (QS)

Focus Diagnostics Padrões de quantificação Simplexa™ BKV (REF MOL2310)					
Componente do Kit	REF	Nº. de tubos por kit	Reações por frasco	Volume (µl) por frasco	Descrição do componente
Simplexa™ BKV Quantitation Standard 1 (QS-1)	MOL2311	1	2	400 µl	Amplicon de BKV em matriz de base humana
Simplexa™ BKV Quantitation Standard 2 (QS-2)	MOL2312	1	2	400 µl	Amplicon de BKV em matriz de base humana
Simplexa™ BKV Quantitation Standard 3 (QS-3)	MOL2313	1	2	400 µl	Amplicon de BKV em matriz de base humana
Simplexa™ BKV Quantitation Standard 4 (QS-4)	MOL2314	1	2	400 µl	Amplicon de BKV em matriz de base humana
Simplexa™ BKV Quantitation Standard 5 (QS-5)	MOL2315	1	2	400 µl	Amplicon de BKV em matriz de base humana

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Simplexa™ BKV (REF MOL2300)
- 3M Integrated Cycler com Integrated Cycler Studio Software versão 3.0 ou superior
- Universal Discs (Discos Universais) para uso com o ciclador integrado
- Fita de cobertura de disco universal
- ^a Sistema Roche MagNA Pure LC e material de consumo associado.
- ^a Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Cat. No 3038505001)
- ^b Equipamento bioMérieux NucliSENS® easyMAG™ e material de consumo e reagentes associados
- ^b Pipeta multicanal Biohit/bioMérieux
- ^b Placa em tira para ELISA
- Micropipeta(s) individual(is) do tipo multicanal e/ou de repetição com exatidões entre 1-10 µl, 10-100 µl e 100-1.000 µl
- Freezer (degelo manual) a temperaturas entre -10 e -30°C (para o armazenamento dos componentes congelados do kit)
- Refrigerador a temperaturas entre 2 e 8 °C (para padrões e componentes descongelados do kit)
- Capela de biossegurança (fluxo laminar) para processamento de amostras
- Microcentrífuga
- Misturador de vórtex
- Ponteiras para micropipetadores, estéreis, descartáveis, que não contenham RNase/DNase, com proteção contra aerossóis.
- Suportes e tubos de polipropileno de 1,5 ml para microcentrífuga (tubos sem RNase/Dnase são recomendados mas não obrigatórios)
- Luvas descartáveis sem talco
- Água sem nuclease (para extração e como Controle sem molde (NTC, No Template Control))
- Suportes de resfriamento para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml

- ^a Para uso com o método de extração Roche MagNA Pure LC
^b Para uso com o método de extração bioMérieux easyMAG

VALIDADE E MANUSEIO

1. Armazene os padrões a temperaturas entre -10 e -30 °C (não utilize congeladores do tipo frost-free).
2. Após o primeiro uso, armazene os padrões descongelados a temperaturas entre 2 e 8 °C durante um período máximo de 5 dias.
3. Não utilize padrões com data de validade vencida.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*
2. Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos. Os materiais-fonte utilizados neste produto foram testados usando métodos aprovados pelo FDA para antígeno de superfície de hepatite B, anticorpo contra hepatite C e HIV-1/2 (AIDS). Embora esses testes tenham sido negativos, nenhum método é 100% eficaz em descartar a possibilidade de transmissão desses ou de outros agentes infecciosos por produtos derivados de sangue humano. Portanto, todos os controles, amostras de soro e equipamentos que entrarem em contato com as amostras devem ser considerados potencialmente infectantes e descontaminados ou descartados de acordo com procedimentos adequados para risco biológico. O CDC e os National Institutes of Health recomendam que os agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados sob condições de biossegurança de nível 2^{1, 2}.
3. Ao lidar com os reagentes do kit use equipamentos de proteção pessoal, tais como (mas não limitados a) luvas e aventais de laboratório. Ao terminar os testes, lave cuidadosamente as mãos.
4. Não pipete com a boca.
5. Não fume, não beba, não coma, não manipule lentes de contato nem se maquile em áreas em que são usados os reagentes do kit e/ou amostras de seres humanos.
6. Descarte os padrões não utilizados de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais.
7. A contaminação de amostras de pacientes ou de reagentes pode originar resultados errados. Empregue técnicas assépticas.
8. Pipete e manuseie cuidadosamente os padrões para evitar misturá-los entre cavidades adjacentes.
9. Empregue técnicas de pipetagem apropriadas e mantenha sempre o mesmo padrão de pipetagem ao longo de todo o procedimento para garantir valores exatos e reprodutíveis.
10. Não substitua ou misture padrões de kits de lotes diferentes ou de outros fabricantes.
11. Não troque as tampas dos tubos, ou pode haver contaminação e falsificação dos resultados do teste. Isso pode causar contaminação e comprometer os resultados do teste.
12. Não reutilize os Universal Discs que já foram expostos a reagentes ou a amostras de pacientes.
13. Descarte o disco usado sem destacar nem remover a fita de cobertura.

INSTRUÇÕES DE USO

A. ÁREA DE EXTRAÇÃO DOS PADRÕES DE QUANTIFICAÇÃO

O DNA deve ser extraído em uma área separada. O padrão de quantificação deve ser preparado para extração em uma capela de biossegurança.

Extração pelo método Roche MagNA Pure LC

1. Os padrões de quantificação devem ser extraídos com o kit Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Kit usando o extrator Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor. Para obter informações sobre como utilizar o kit, consulte as instruções fornecidas pelo fabricante.
2. No menu suspenso “Protocol”, do MagNA Pure LC System, selecione “Total NA” e depois “Total NA Variable_elution_volume.blk” na lista. As configurações apropriadas para a sequência serão carregadas.
3. O protocolo de amostra deve ser “Total NA Variable_elution_volume”.
4. O volume da amostra (Sample Volume) deve ser de 200 µl e o volume de eluição deve ser de 50 µl.
5. O volume de diluição deve ser zero para todas as amostras.
6. Verifique se o Post Elution Protocol está em “None”.
7. Verifique se os padrões de quantificação estão posicionados corretamente no Cartucho de amostra
8. Agite os padrões e NTC em vórtex 2 a 4 segundos e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
9. Pipete 200 µl de cada padrão e NTC na posição correspondente no cartucho de amostra.
10. Inspeção visualmente o nível do padrão e NTC no cartucho de amostra para verificar se a(s) amostra(s) foram adicionadas.
11. Agite brevemente o DNA de controle para extração e quantificação (IC) no vórtex duas vezes e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
12. Para cada conjunto de padrões, pipete 100 µl da IC em 6 ml de tampão de lise em um tubo cônico, Agite brevemente em vórtex para misturar. Coloque-o na bandeja apropriada do equipamento de extração MagNA Pure.
13. Coloque o cartucho de amostra no extrator MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid e inicie a sequência de extração.
14. Ao final da extração de ácidos nucleicos, o cartucho com os padrões extraídos podem ser retirados do MagNA Pure e selados. Armazene o DNA extraído entre 2°C e 8°C antes de usá-lo. Recomenda-se não armazenar os padrões a esta

temperatura por períodos prolongados. Mantenha as amostras de DNA extraído em um bloco de refrigeração enquanto carregar o disco.

Extração pelo método bioMérieux NucliSENS® easyMAG™

1. O Manual de Instruções NucliSENS® easyMAG™ contém instruções sobre como usar o equipamento e o software.
2. Selecione o template Generic no software NucliSENS® easyMAG™ com as seguintes configurações:
 - Default Request [Solicitação padrão]:** Generic 2.0.1 (ou equivalente)
 - Run Name Prefix [Prefixo do nome da sequência]:** (conforme apropriado)
 - Sample ID prefix [Prefixo da ID da sequência]:** (conforme apropriado)
 - Sample Type [Tipo de amostra]:** Primária
 - Workflow Defaults:** On-board lysis Incubation [Incubação de lise on-board]
 - [Padrões da sequência]** On-board Silica Incubation [Incubação de sílica on-board]
 - Sample Addition Guidance Off [Instrução para Adição de Amostra Desligado]
- Reagent Tracking**
- [Rastreamento de reagentes]:** Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled [Rastreamento de reagente de lise, sílica, controle interno desabilitado]
3. Digite as seguintes informações sobre amostras individuais na tela Extraction Request.
 - Sample ID [ID da amostra]:** (Digitar nome da amostra.)
 - Request [Solicitação]:** Generic 2.0.1 (ou equivalente)
 - Volume (ml):** 0,200
 - Eluate [Eluído] (µl):** 50
 - Type [Tipo]:** Primary [Primária]
 - Priority [Prioridade]:** Normal
 - Matrix [Matriz]:** Other [Outros]
4. Crie a sequência de extração no NucliSENS® easyMAG™ conforme descrito no Manual do Usuário.
5. Agite os padrões em vórtex 2 a 4 segundos e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
6. Pipete 200µl do padrão e do NTC em cada recipiente de amostra.
7. Agite a IC no vórtex brevemente duas vezes e centrifugue rapidamente para depositar o conteúdo na parte inferior do tubo.
8. Pipete 5µl de IC nas cavidades com padrões e nas cavidades de controle usando uma ponteira separada para cada amostra.
9. Coloque o(s) recipiente(s) com amostra(s), o material descartável usado para aspiração e os reagentes no easyMAG™ de acordo com as instruções no Manual do Usuário.
10. Inicie a lise no equipamento e incube as amostras lisadas por dez minutos antes de adicionar a mistura com sílica magnética.
11. Durante o período de incubação e lise, prepare e mistura de sílica magnética. Misture a sílica e dilua em água sem nuclease misturando 1 parte de sílica magnética para cada 3 partes de água sem nuclease (p.ex. 270 µl de sílica magnética+ 810µl de água sem nuclease). Prepare pelo menos 135 µl de mistura de sílica magnética por amostra.
12. Para transferir a mistura de sílica para as cavidades na tira de ELISA, misture a sílica magnética utilizando uma ponteira no modo de operação P2 da pipeta Biohit. Pressione **Start [Iniciar]** para aspirar 1050 µl da mistura de sílica magnética e **Start [Iniciar]** novamente para dispensar a primeira parte de volta no tubo de mistura de sílica. Pressione **Start [Iniciar]** para dispensar 125 µl da mistura de sílica magnética em 8 cavidades individuais da tira de ELISA. Repita conforme necessário para novas placas ELISA.
13. Após incubação de lise por 10 minutos, use a pipeta Biohit com 8 ponteiras (para uma tira de ELISA) e no modo de operação P3 para transferir 100 µl da mistura de sílica magnética a cada amostra do recipiente de amostras. Coloque as ponteiras nas cavidades da tira de ELISA e pressione **Start [Iniciar]** para misturar e aspirar a mistura de sílica magnética.
14. Coloque a mistura de sílica magnética nos recipientes apropriados e posicione a(s) ponta(s) da(s) pipeta(s) nas amostras abaixo do nível do líquido. Pressione **Start [Iniciar]** para aspirar, dispensar e misturar (3 vezes) a sílica magnética e as amostras. Mantenha as pontas das pipetas abaixo do nível do líquido para garantir a mistura correta.
15. Repita as etapas 13 e 14 para os outros recipientes com amostras.
16. Após adicionar sílica magnética a todos os recipientes com amostra, inicie a sequência de extração.
17. Ao final da sequência, retire os recipientes com amostra do instrumento. Se não for usar imediatamente as amostras, coloque-as em tubos separados para reduzir as chances de a sílica magnética cair de volta na amostra. Armazene o DNA extraído entre 2°C e 8°C antes de usar. Recomenda-se não armazenar amostras a esta temperatura por períodos prolongados. Mantenha o DNA extraído em um bloco de refrigeração ao carregar o disco.

B. CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

1. O Manual do Operador do Integrated Cyclor contém instruções sobre como configurar o aplicativo Integrated Cyclor Studio e incluir definições de ensaios, programar e analisar curvas de calibração (Calibration Run) e analisar sequências no equipamento.
 - Nota: Somente padrões de calibração e NTC podem ser colocados na sequência de calibração. As amostras de pacientes e controles positivos podem ser testadas após uma sequência de calibragem válida.

Exemplo de Disposição do Disco

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

C. ÁREA DE PREPARO DOS REAGENTES

Área dedicada ao preparo da mistura reativa do ensaio Simplexa™ BKV.

- Descongele a mistura de primers e a mistura de reagentes em temperatura ambiente (entre 18 e 25 °C, aproximadamente). Cada frasco de componente do kit contém quantidade suficiente de reagentes para 50 reações. Antes de cada uso, misture suavemente, por meio de 6 a 8 inversões, os componentes da mistura de primers e da mistura de reagentes e centrifugue rapidamente para precipitar os conteúdos no fundo do tubo.
- Pipete o volume de cada componente, conforme indicado na tabela a seguir, para preparar o volume necessário da mistura reativa em um tubo de microcentrifugação de polipropileno e de tamanho adequado.

Volumes da mistura reativa

Reagente	Volumes de mistura reativa para 1 reação	Volumes de mistura reativa para 24 reações
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	96 µl
Simplexa™ BKV Primer Mix	1,0 µl	24 µl
Volume Total	5,0 µl	120 µl

- Misture suavemente a mistura reativa por inversões ou por 8 a 10 pipetagens.
- Centrifugue brevemente para decantar o conteúdo na parte inferior do tubo.
- Configure a PCR.
- Após o preparo da mistura reativa, use-a em até uma hora. Armazene a mistura reativa entre 2 e 8 °C se o PCR não for preparado imediatamente após a preparação da mistura reativa.

D. ÁREA DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Prepare o disco universal de 96 cavidades para o ensaio Simplexa™ BKV em uma área separada.

Consulte o exemplo de disposição do disco na Seção B ao executar a seguinte configuração:

- Adicione 5,0 µl da mistura reativa em cada cavidade.
- Adicione 5,0 µl do padrão de quantificação extraído ao orifício "QS (quantitation standard)" apropriado.
- Adicione 5,0 µl do No-Template Control à cavidade "NTC".
- Cubra o disco com a Universal Disc Cover Tape (Fita de Cobertura de Universal Disc).
- Abra a tampa do Integrated Cycler.
- Coloque o Universal Disc selado sobre a plataforma.
- Feche a tampa com cuidado.
- Clique em **Run [Efetuar corrida]**.
- Clique em **Start [Iniciar]**.

E. ANÁLISE DA CURVA PADRÃO (SEQUÊNCIA DE CALIBRAÇÃO)

- O Integrated Cycler Studio determina automaticamente se a curva de calibração é válida.
 - Se a curva for válida, a calibração é salva automaticamente para ser usada.
 - Se a curva não for válida, a calibração é descartada e será preciso executar uma nova sequência antes de se testar amostras de pacientes.

LIMITAÇÕES

- Para utilização apenas com o kit Simplexa™ BKV.
- Os analistas devem ser treinados e ficarem familiarizados com os procedimentos do teste e a interpretação dos resultados antes de executarem o teste.
- O aplicativo Integrated Cycler Studio armazena a última sequência de calibração válida usada para quantificar amostras de pacientes. Os padrões de quantificação e as amostras de pacientes devem ser extraídas usando-se a mesma metodologia de extração, ou o ensaio produzirão resultados incorretos.

REFERÊNCIAS

1. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed.
2. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

REPRESENTANTE AUTORIZADO

mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Alemanha

INFORMAÇÕES SOBRE PEDIDOS

Telefone: (800) 838-4548 (EUA) (562) 240-6500 (Internacional)
Fax: (562) 240-6510

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Telefone: (800) 838-4548 (EUA) (562) 240-6500 (Internacional)
Fax: (562) 240-6526

Visite nossa página na web: www.focusdx.com



PI.MOL2310.OUS.PT

Rev. B

Data da edição:
20 de abril de 2012



Cypress, Califórnia 90630 EUA