

HPV Screening

Real Time PCR Kit

Kit para detecção de 14 genótipos de HPV de alto risco por PCR em tempo real

REF Ref. MAD-003949M-W

 100 determinações

Uso apenas para diagnósticos *in vitro*
Diretiva 98/79/EC

ÍNDICE

1	UTILIZAÇÃO DO KIT	3
2	PRINCÍPIO DO MÉTODO	3
3	COMPONENTES.....	4
4	MATERIAL ADICIONAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO	5
4.1	Reagentes e materiais.....	5
4.2	Equipamento	5
5	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE.....	5
6	AVISOS E PRECAUÇÕES	6
7	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA CLÍNICA PARA ANÁLISE.....	7
7.1	Coleta de amostras	7
8	PROTOCOLO PCR	8
8.1	Preparação da mistura de reação.....	8
8.2	Configuração do instrumento para PCR em tempo real	8
9	INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS.....	9
10	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	11
10.1	Sensibilidade analítica.....	11
10.2	Especificidade analítica	16
10.3	Repetibilidade	17
10.4	Reprodutibilidade	17
10.5	Faixa de medição	18
10.6	Sensibilidade e especificidade clínica	18
11	LIMITAÇÕES DO TESTE	19
12	BIBLIOGRAFIA	20
13	SÍMBOLOS DA ETIQUETA E DA CAIXA.....	20
14	MUDANÇAS.....	20



1 UTILIZAÇÃO DO KIT

O kit **HPV Screening Real Time PCR** é um kit de diagnóstico *in vitro* para detecção qualitativa de DNA de 14 genótipos do papilomavírus humano (HPV) considerados de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) a partir de DNA purificado de amostras clínicas humanas de diferentes origens, como citologia líquida, *swabs* vaginais e retais.

Baseia-se na técnica de PCR em tempo real multiplex e utiliza iniciadores e sondas fluorescentes para a região conservada do gene alvo L1 dos genomas do HPV. O teste permite a identificação específica dos genótipos HPV 16 e 18 e a detecção simultânea dos genótipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 em níveis de infecção clinicamente relevantes.

Primers específicos e sonda fluorescente estão incluídos para a detecção simultânea do gene da Beta globina humana como controle de qualidade interno do material de partida e amplificação. Os canais de detecção dos diferentes alvos são:

Alvo	Fluoróforo
HPV 16	ROX
HPV 18	Cy5
Alto risco (AR)	FAM
Beta globina	HEX/JOE/VIC

Tabela 1. Canais de detecção para os diferentes alvos do kit de rastreio de HPV.

Este teste deve ser realizado em nível hospitalar, em laboratórios de microbiologia clínica para aqueles pacientes que apresentam sintomas compatíveis com a infecção pelo HPV. O uso final pretendido é auxiliar no diagnóstico desta infecção em combinação com risco clínico e fatores epidemiológicos

Estado microbiológico: Produto não estéril.

2 PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit **HPV Screening** é um ensaio multiplex baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real. O Master mix contém um conjunto de *primers* e sondas que permitem a detecção de DNA nos genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 do papilomavírus humano. Também inclui um conjunto de iniciadores e sondas para a detecção do gene beta globina humana em espécimes clínicos ou de controle. Os oligonucleotídeos usados como iniciadores e sondas foram selecionados em regiões evolutivamente conservadas do genoma viral.

Na presença de qualquer um desses genótipos de HPV em amostras clínicas, o DNA viral é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção dos amplicons obtidos é baseada na tecnologia da sonda TaqMan. Essas sondas são oligonucleotídeos de DNA de fita simples modificados que possuem um fluoróforo (repórter) ligado covalentemente à extremidade 5', e um inibidor (quencher) ligado à extremidade 3'. Se os ácidos nucleicos alvo estiverem presentes, estes são amplificados e, durante o processo de PCR, as sondas se ligarão

Rev.: 22/07/2021



especificamente nas regiões complementares localizadas entre os iniciadores *forward* e *reverse*.

Enquanto ocorre a fase de extensão da PCR, a atividade 5' da nuclease da DNA polimerase degrada as sondas ligadas especificamente aos seus alvos, causando a divisão entre o repórter e o supressor, e um sinal fluorescente será gerado. As sondas específicas para HPV 16, HPV 18, os demais genótipos de alto risco e o controle interno são marcados com diferentes fluoróforos, de modo que em cada caso será gerado um sinal fluorescente em diferentes comprimentos de onda, permitindo que a plataforma de PCR em tempo real detecte e diferencie simultaneamente os diferentes sinais em uma única reação. A cada ciclo de desnaturação-extensão ocorre a divisão de novas moléculas de repórter e, consequentemente, a intensidade do sinal fluorescente aumenta.

A detecção de DNA viral é de grande utilidade no diagnóstico e acompanhamento de infecções causadas por esses microrganismos.

3 COMPONENTES

O kit **HPV Screening** é comercializado como Master Mix pronto pra uso que inclui todos os reagentes necessários para realizar a PCR em tempo real.

Além disso, para evitar a contaminação com produtos de PCR anteriores, o Mix contém a enzima Uracil-DNA Glicosilase (Cod-UNG), que degrada produtos de PCR contendo dUTP.

Um controle positivo (CP) e água tratada com DEPC livre de DNase/RNase para incluir nos controles negativos (CN) são fornecidos juntamente com o PCR-Mix em tempo real.

Componentes do kit para 100 testes:

Referência (descrição)		Conteúdo	Quantidade
MAD-003949M-100-W (Screening HPV MMIX)	MAD-003949-MIX-W (Screening HPV MMIX)	Polymerase Hot Start (125 U/mL), Uracil-DNA glicosilase (50 U/mL), iniciadores (0,1 - 04 µM), sondas fluorescentes (0,1 - 04 µM), tampão de reação 2x, 1mM dUTP, 1,3 mM dNTPs (A; G; C; T)	2 frascos com 50 testes / frasco
	MAD-DDW-DEPC (Água livre de DNase/ RNase)	---	1 frasco (200 µl)
MAD-HPV (Controle Positivo)		DNA sintético não infeccioso contendo parte do genoma de HPV 16, HPV 18, HPV 45 (12500 cópias/ µl) e DNA humano (0,625 ng/ µl)	1 frasco (100 µl)

Tabela 2. Reagentes fornecidos no kit de screening de HPV PCR em tempo real no formato líquido.

4 MATERIAL ADICIONAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

4.1 Reagentes e materiais

- Luvas descartáveis.
- Ponteiras livres DNase/RNase com filtro.
- Kit de extração de DNA.
- Tiras de tubos/placas/filmes adesivos ópticos específicos para cada equipamento de PCR em Tempo Real

4.2 Equipamento

- Cabine de fluxo laminar
- Microcentrífuga para tubos de 1,5ml.
- Microcentrífugas de tiras de tubos de PCR ou placas de 96 poços.
- *Vórtex*.
- Micropipetas P1000, P200, P20 e P2.
- Equipamento de PCR em tempo real.

5 CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O kit **HPV Screening** deve ser transportado e armazenado a -20°C. No entanto, também é possível transportá-lo à temperatura de refrigeração (2-8°C), desde que o período de trânsito não exceda 10 dias. Em qualquer caso, o kit deve ser armazenado em -20°C após o recebimento.

O HPV Mmix é sensível a mudanças de estado físico e suporta até cinco ciclos de congelamento-descongelamento. Por isso, se o teste for realizado com um número baixo de amostras, recomenda-se a alíquota do reagente com antecedência.

O MMix é estável por 29 dias a temperatura ambiente. Se a equação de Arrhenius for aplicada usando um Q10 igual a 2,2 para estimar a vida útil do produto, equivale a uma estabilidade de tempo de 4 meses armazenado a 4 °C e de pelo menos 2 anos armazenado a -20 °C.

Os testes de estabilidade temporal do produto estão em andamento. Portanto, o MMix é armazenado a -20 °C e sua estabilidade é determinada após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses.

O mix contém moléculas fluorescentes e deve ser mantida longe da luz direta.

O Controle Positivo (CP) é sensível a mudanças de estado físico e ciclos de congelamento/descongelamento devem ser evitados. É aconselhável manusear o frasco de CP separadamente das amostras clínicas para evitar possíveis contaminações que possam gerar falsos positivos.

Se armazenados na temperatura recomendada, os reagentes de PCR são estáveis até a data de validade indicada no rótulo do produto. Os reagentes de PCR devem ser armazenados em áreas livres de contaminação por DNA ou produtos de PCR.

* Um indicador de temperatura está incluído no pacote para controlar as condições durante o envio. Caso a

Rev.: 22/07/2021



Vitro SA

Calle Luis Fuentes Bejarano nº 60. Ed. Nudo Norte Local 3. 41020 Sevilha (Espanha).
Telefone: +34 954 933 200. vitro@vitro.bio ; www.vitro.bio



cadeia fria seja interrompida, recomenda-se entrar em contato com o fabricante antes de utilizar os reagentes.

6 ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Leia as instruções de uso antes de usar este produto.
- O kit deve ser manuseado por profissionais habilitados em técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico.
- Não use nenhum componente do kit após a data de validade.
- O Master Mix deve ser descongelado antes do uso e manuseado em gelo ou placa fria e ao abrigo da luz. Homogeneizar as soluções invertendo os tubos várias vezes sem agitar em vórtex. Centrifugar brevemente.
- O controle positivo deve ser descongelado à temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado brevemente antes do uso.
- As precauções de segurança e eliminação estão descritas na ficha de dados de segurança deste produto. Este produto destina-se apenas a fins laboratoriais profissionais e não se destina a uso farmacológico, doméstico ou qualquer outro tipo de uso. A versão atual da ficha de dados de segurança deste produto pode ser baixada na página da web www.vitro.bio
- O kit de Screening de HPV por PCR em Tempo Real utiliza ácidos nucleicos previamente extraídos e purificados como material de partida. É de responsabilidade do cliente incluir os controles necessários para verificar se o sistema de extração do material genético utilizado funciona adequadamente.

6.1 Considerações gerais para evitar a contaminação com o produto de PCR

A fonte de contaminação mais importante é geralmente o mesmo produto de PCR amplificado. Portanto, recomenda-se realizar a amplificação e manuseio dos produtos amplificados em uma área diferente daquela onde são realizadas a extração de DNA e a preparação de PCR. Recomenda-se trabalhar em diferentes áreas pré e pós-PCR, onde são realizados o manuseio do RNA teste e preparação dos tubos de PCR (pré-PCR), e a amplificação e manuseio dos produtos amplificados (pós-PCR). Essas áreas devem ser separadas fisicamente e devem ser utilizados diferentes materiais de laboratório (jalecos, pipetas, ponteyras, etc.) para evitar a contaminação das amostras com o DNA amplificado, o que poderia levar a diagnósticos falsos positivos.

O fluxo de trabalho deve seguir sempre em uma única direção, da área pré-PCR para a área pós-PCR e nunca no sentido contrário. O fluxo de material e pessoal da área pós-PCR para a área pré-PCR deve ser evitado. Além disso, para evitar a contaminação com produtos de PCR anteriores, a enzima Uracil-DNA Glicosilase (Cod-UNG), que degrada os produtos de PCR contendo dUTP, está incluído no kit.

Recomenda-se incluir controles de amplificação negativos substituindo a amostra de DNA por água livre de DNase/ RNase, a fim de detectar e controlar qualquer possível contaminação dos reagentes com amostras de teste ou produtos amplificados.

- **Descarte de lixo**

O manuseio dos resíduos gerados pelo uso dos produtos comercializados pela Vitro SA deve ser realizado de acordo com a legislação aplicável no país em que esses produtos estão sendo utilizados. Como referência, a

Rev.: 22/07/2021

tabela a seguir indica a classificação dos resíduos gerados por este kit de acordo com a Lei Europeia, especificamente de acordo com a Decisão da Comissão Europeia de 18 de dezembro de 2014 que altera a decisão 2000/532/EC sobre a lista de resíduos conforme a Diretiva 2008/ 98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho:

Resíduos potenciais gerados após uso do produto	Código ELW*	Tipo de resíduo de acordo com ELW*
1. Descarte de resíduos líquidos	161001	“Resíduos líquidos aquosos contendo substâncias perigosas” após adição de 10% do volume total de um agente desinfetante. Caso a desinfecção não seja efetuada, estes resíduos devem ser considerados como “resíduos cujo armazenamento e eliminação estão sujeitos a requisitos especiais de forma a prevenir a infecção”
2. Material perecível (tubos, pontas, etc.) 3. Qualquer elemento que tenha estado em contato com o material genético inicial	180103	“Resíduos cuja recolha e eliminação estão sujeitas a requisitos especiais para prevenir a infecção”
4. Recipiente para reagentes usados classificados como perigosos (de acordo com a Ficha de Segurança)	150110	“Recipientes contendo resíduos ou contaminados por substâncias perigosas”

Tabela 3. Classificação dos resíduos gerados por este kit de acordo com a Legislação Europeia. *ELW: *Legislação Europeia de Desperdício*.

* Nota: Esta classificação consta como diretriz geral de atuação, ficando sob responsabilidade final do usuário o cumprimento de todas as normas locais, regionais e nacionais sobre o descarte deste tipo de materiais.

7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA CLÍNICA PARA ANÁLISE

4.1 Coleta de amostras

O kit **HPV Screening** foi validado para uso a partir de material genético purificado de diferentes tipos de amostras clínicas, como citologia líquida e *swabs* vaginais e retais.

Este kit foi validado com material genético inicial obtido dos seguintes kits de purificação de DNA/RNA e kits de extração*, começando com 200 µl de amostra clínica e eluindo em 100 µl de tampão de eluição (para purificação com Opentrons, comece com 92 µl de amostra clínica e elua em 60 µl de solução de eluição):

Kits de extração	Equipamento de extração
Kit de purificação de tecido LEV DNA Maxwell® 16 FFPE (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)
NX48S - Kit de DNA de Urina/Swab (Genolution)	Nexttractor NX-48S (Genolution)

Kit de extração de patógenos de RNA/DNA (RobotOpentrons OT2) (Vitro, ref. MAD-003955M)	Opentrons OT-2
--	----------------

Tabela 4. Kits e instrumentos de extração utilizados para purificação de DNA/RNA de amostras clínicas.

* Nota: O kit não foi validado com outros sistemas de extração de DNA/RNA. Portanto, se qualquer outro sistema de purificação for usado, isso deve ser verificado previamente.

8 PROTOCOLO PCR

8.1 Preparação da mistura de reação

A reação de PCR em tempo real é realizada em um volume final de 20 µl. Prepare o Master Mix conforme indicado abaixo:

- 1 Descongele e homogeneize o Mmix (não use *vórtex*). Depois de descongelado, centrifugue brevemente.
- 2 Misture em cada tubo de PCR os seguintes volumes para cada amostra:

Reagente	V / teste
MMix	12 µl
Amostra	8 µl

- 3 Inclua um controle negativo adicionando 8 µl da água incluída no kit.
- 4 Inclua um controle positivo adicionando 8 µl do CP incluído no kit.
- 5 Centrifugue brevemente para certificar-se de que não há bolhas de ar nos poços.

Recomenda-se manter o MMix em placa fria durante o preparo das amostras e não descongelar o frasco mais de cinco vezes.

8.2 Configuração do equipamento para PCR em tempo real

Configure os diferentes alvos e canais de detecção para no *software* do equipamento. Configure também o mapa da placa, cadastrando as amostras, o controle positivo (CP), o controle negativo (CN) e aloque as posições das amostras na placa de PCR.

Configure o equipamento de PCR em tempo real seguindo as etapas abaixo:

PROGRAMA PCR		
25°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	15 segundos	5 ciclos
42°C	15 segundos	
72°C	30 segundos	
95°C	15 segundos	45 ciclos
60°C*	40 segundos	

Tabela 6. Programa de PCR do kit de screening de HPV.

* Os dados de fluorescência devem ser coletados durante o estágio de extensão (*) através de ROX (HPV 16), Cy5 (HPV 18), FAM (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) e canais HEX, JOE ou VIC (Controle Interno).

Este kit foi validado com as plataformas:

- Sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 (Biosistemas Aplicados)
- Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96™ (Bio-Rad)
- VitroCycler (Vitro SA)

Para sua utilização em outras plataformas, recomenda-se verificar a compatibilidade dos fluorocromos com os canais de detecção de cada equipamento. Embora os fluorocromos incluídos no kit sejam compatíveis com a maioria dos equipamentos de tempo real mais utilizados disponíveis no mercado. No sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 e termocicladores do sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 5, a opção de referência passiva ROX deve ser desativada.

Nos termocicladores Applied Biosystems, QuantStudio™ 5 e Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, selecione "Ramp Speed Standard" no menu "Select New Experiment/ Advanced Setup/Experiment Properties".

9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Antes de interpretar os resultados das amostras clínicas, é necessário seguir o guia de interpretação dos controles positivos e negativos conforme tabela abaixo:

	Resultado	Interpretação
Controle Positivo HPV	Sinal para os canais FAM, ROX, Cy5 e JOE*	O controle/reacção está correto
	Sem sinal para FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE	Problema na amplificação: repetir análise
Controle negativo:	Sinal para os canais FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE	Contaminação. Repetir análise
	Sem sinal	O controle/reacção está correto

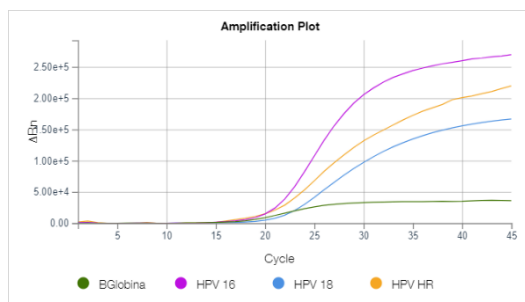
Tabela 6. Guia de interpretação dos controles positivos e negativos.

* O sinal de amplificação deve ser determinado por um aumento rápido e constante dos valores de fluorescência e não por fenômenos de pico ou aumento gradual do sinal de fundo (fundo irregular ou ruído de fundo aumentado) (Fig 1).

A corrida é considerada válida quando forem obtidos resultados adequados para todos os controles de reacção e valores de CTs obtidos no controle positivo para os diferentes alvos estão dentro da faixa de valores esperados, sendo estes:

- 20±2 para HPV 16 (ROX)
- 20±2 para HPV 18 (Cy5)
- 20±2 para HPV AR (FAM)
- 20±2 para Beta globina (JOE)

A



B

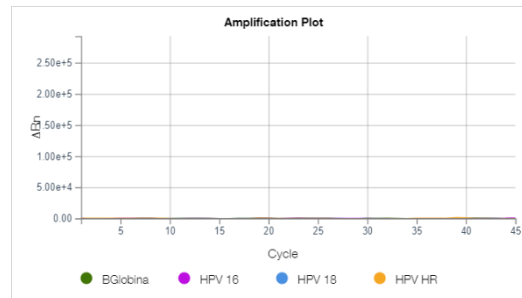


Figura 1: Gráficos de amplificação do controle positivo CP (A) e do controle negativo com água CN (B). (Valores Cts esperados para CP: HPV 16 (ROX) 20±2; HPV 18 (Cy5) 20±2; HPV HR (FAM) 20±2, Beta globina (JOE) 20±2. Experimento realizado no Applied Biosystems QuantStudio™ 5 PCR em tempo real.

Se a execução foi validada, interprete os resultados das amostras clínicas de acordo com a tabela a seguir:

Screening de HPV PCR em tempo real				INTERPRETAÇÃO
HPV 16 (ROX)	HPV 18 (Cy5)	HPV AR (FAM)	Beta globina (JOE)	
Sinal	Sem sinal	Sem sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 16
			Sem sinal	
Sem sinal	Sinal	Sem sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 18
			Sem sinal	
Sem sinal	Sem sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV de alto risco (Tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Sem sinal	
Sinal	Sinal	Sem sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 16 e HPV 18
			Sem sinal	
Sinal	Sem sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 16 e outros genótipos de alto risco (Tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Sem sinal	
Sem sinal	Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 18 e outros genótipos de alto risco (Tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Sem sinal	

Rev.: 22/07/2021

Sinal	Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 16, HPV 18 e outros genótipos de alto risco (Tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Sem Sinal	
Sem sinal	Sem sinal	Sem sinal	Sinal	Resultado negativo(1)
			Sem sinal	Inválido(2): Problemas na extração ou amplificação

Tabela 7. Interpretação do guia de resultados.

(1) Negativo ou abaixo do limite de detecção do kit.

(2) Recomenda-se repetir a PCR o de uma nova extração de DNA.

Recomenda-se usar o ajuste automático de limiar feito pelo *software* padrão de cada equipamento e, se necessário, ajuste o limiar manualmente, garantindo que esteja dentro da fase exponencial da curva de fluorescência e que o ruído de fundo esteja abaixo da linha de limiar.

Uma amostra é positiva se o valor de Ct obtido for ≤ 38 , mesmo que o controle interno não mostre um gráfico de amplificação. Às vezes, pode ocorrer que o controle interno não seja amplificado corretamente devido à presença de um número inicial elevado de cópias do ácido nucleico bacteriano alvo, o que pode causar uma amplificação preferencial deste último.

Uma amostra é negativa se uma curva de amplificação não for detectada acima do valor limite e se o controle interno mostrar isso. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controle interno.

10 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

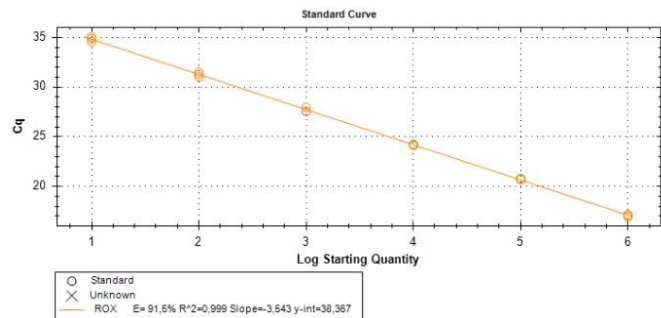
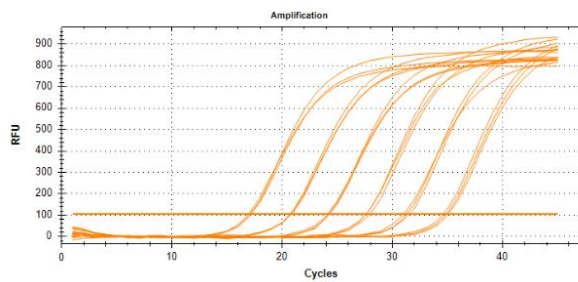
10.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do **kit HPV Screening** foi determinada realizando três réplicas de diluições em série de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^6 cópias/reação a 10 cópias/reação. Ajustando os dados de CTs obtidos para uma linha, a eficiência de amplificação, R^2 e a inclinação foram determinados para cada um dos genes.

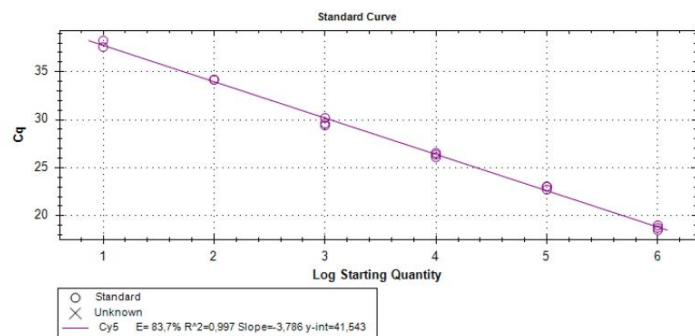
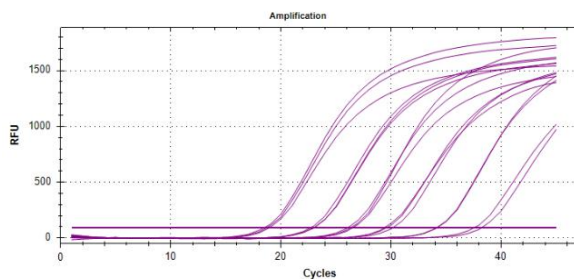
O kit tem um limite de detecção de 10 cópias/reação para os genótipos HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66 e HPV 68 (Figura 2).

A eficiência de amplificação de cada alvo, bem como o R^2 e a inclinação da linha obtida são mostradas na Tabela 8.

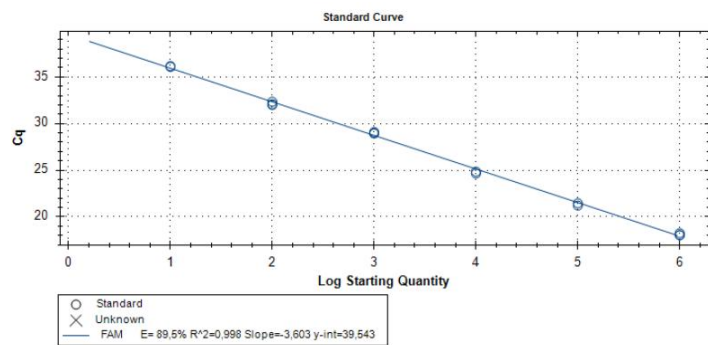
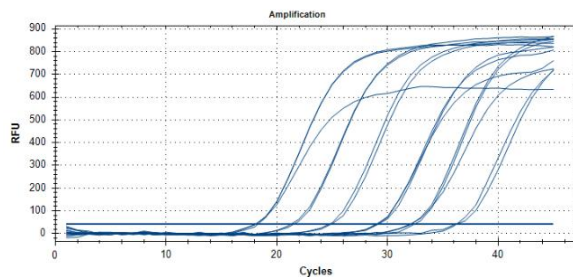
A



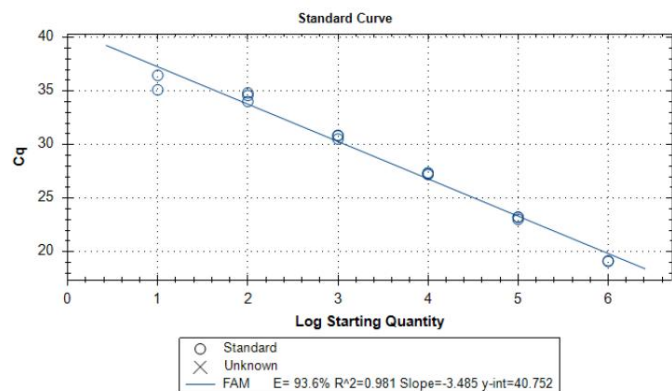
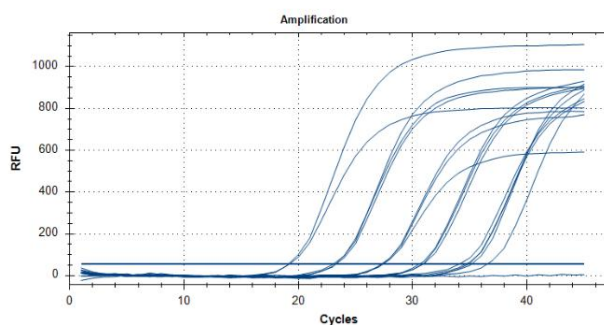
B



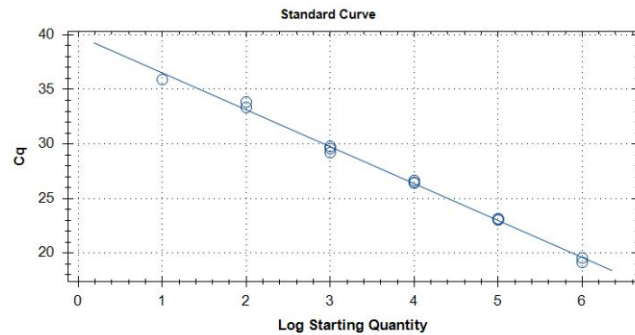
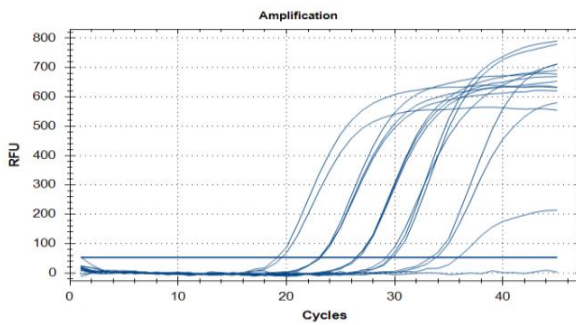
C



D

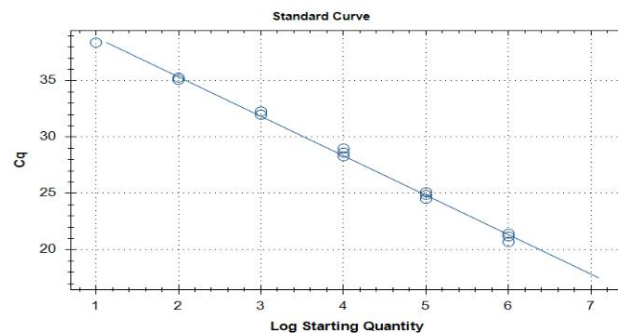
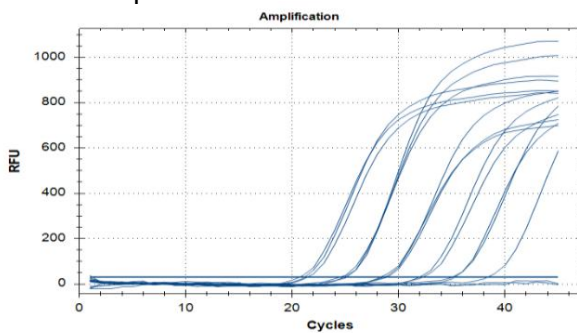


E



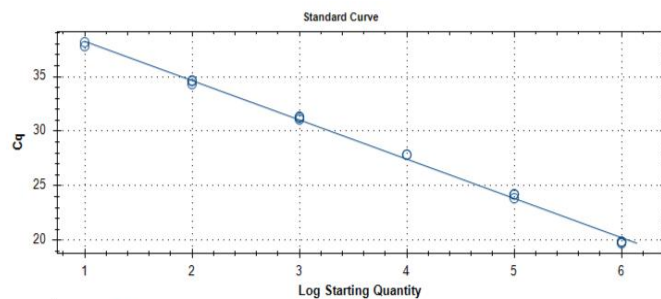
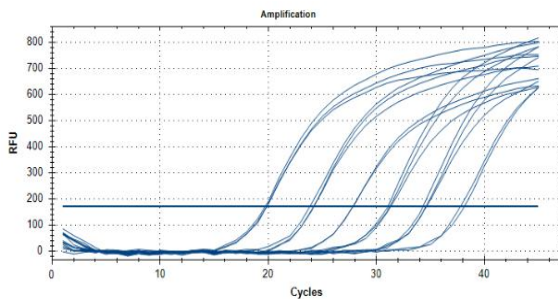
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 97,6% R²=0,995 Slope=-3,380 y-int=39,893

F



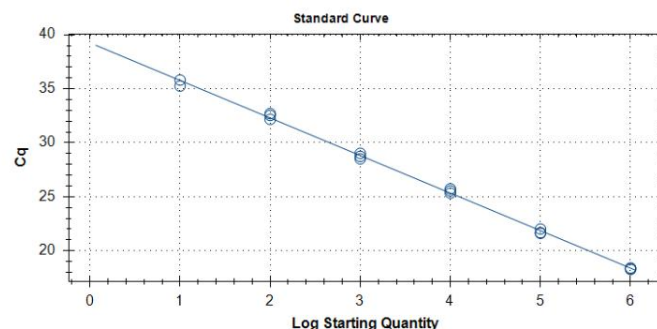
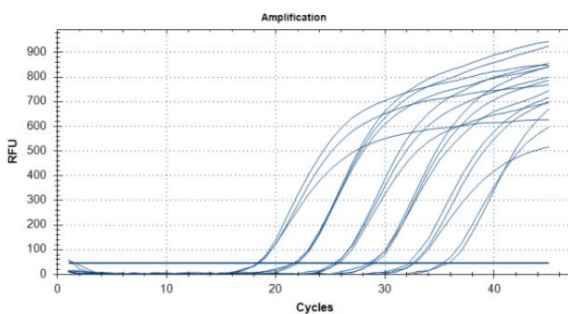
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 93,1% R²=0,996 Slope=-3,499 y-int=42,333

G



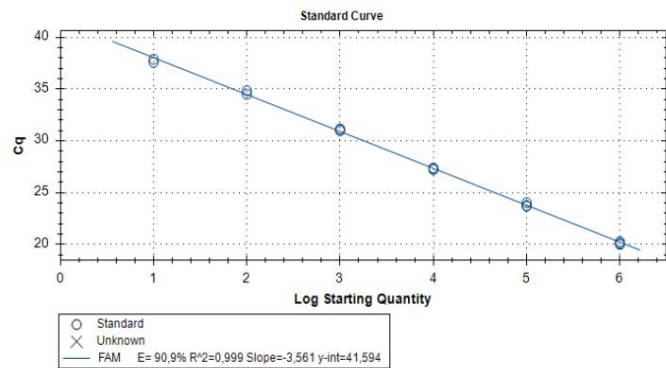
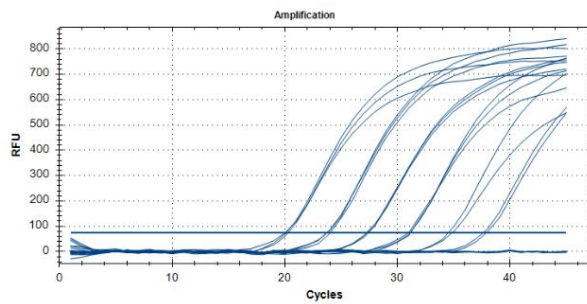
○ Standard
× Unknown
— FAM E= 89,6% R²=0,997 Slope=-3,600 y-int=41,845

H

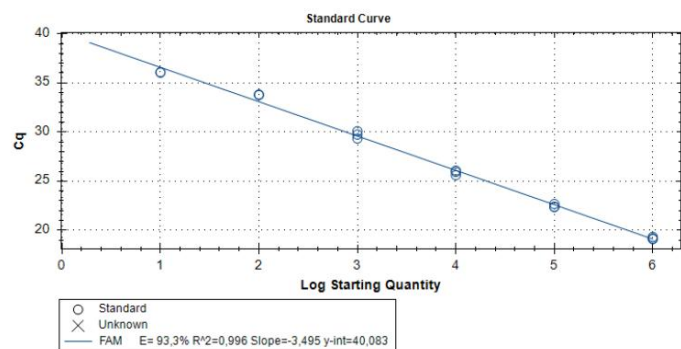
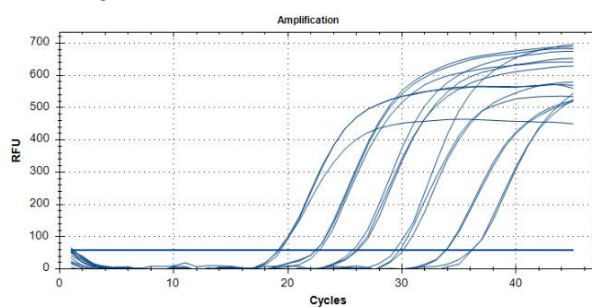


○ Standard
× Unknown
— FAM E= 93,9% R²=0,998 Slope=-3,477 y-int=39,253

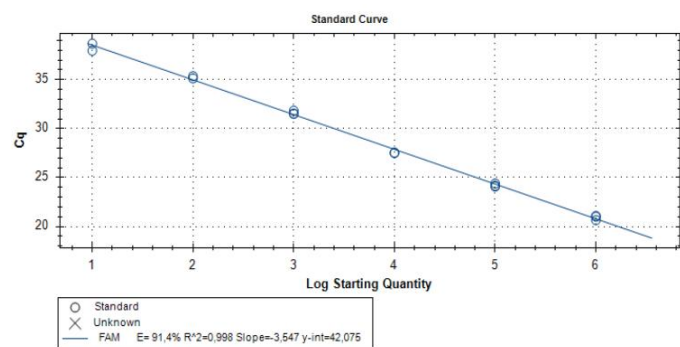
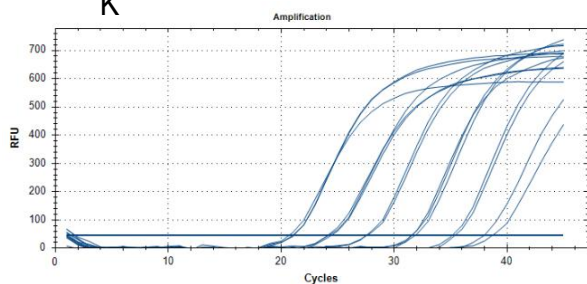
I



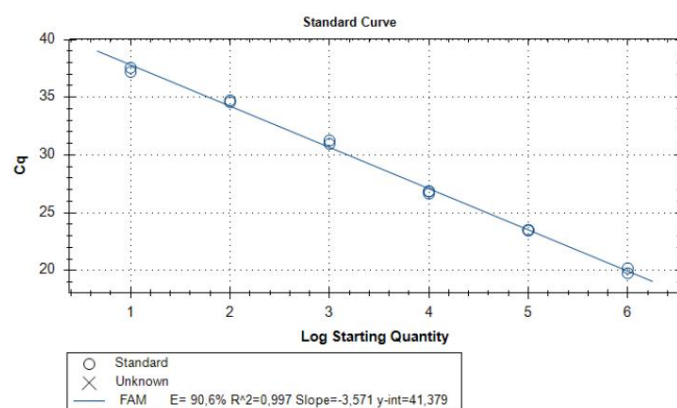
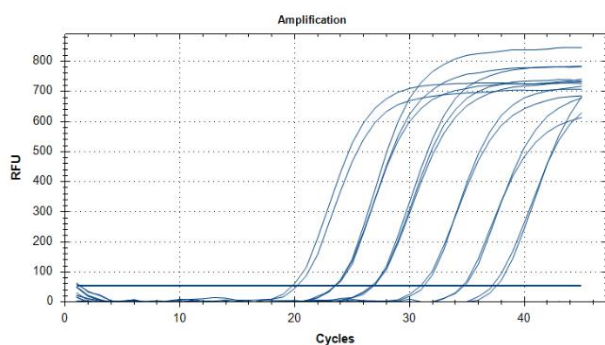
J



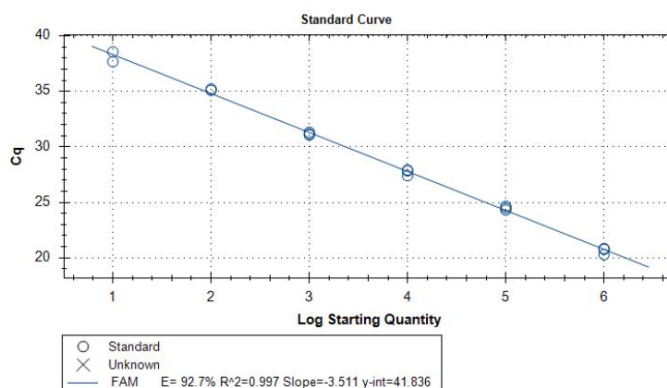
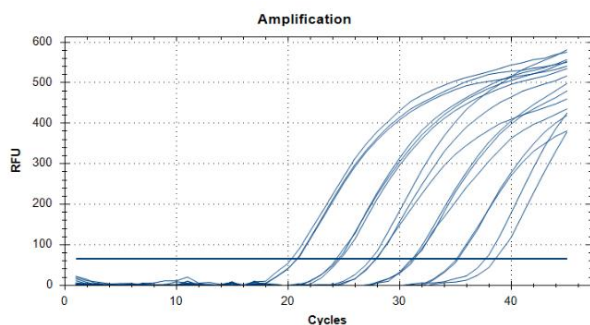
K



L



M



N

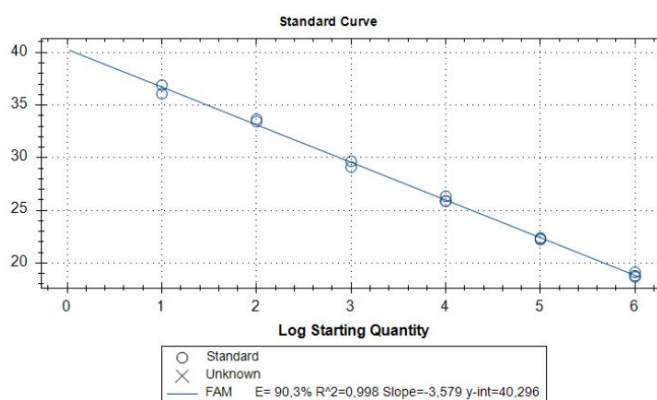
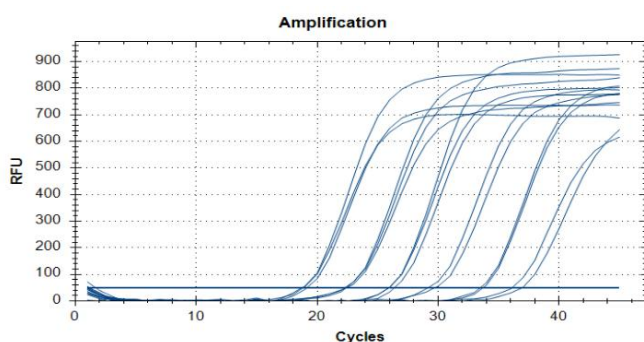


Figura 2. Esquerda: Diluições em série de 10^8 cópias/reacção a 10 cópias/reacção de fragmentos sintéticos de HPV 16 no canal ROX (A), HPV 18 no canal Cy5 (B) e HPV 31 (C), HPV 33 (D), HPV 35 (E), HPV 39 (F), HPV 45 (G), HPV 51 (H), HPV 52 (I), HPV 56 (J), HPV 58 (K), HPV 59 (L), HPV 66 (M) e HPV 68 (N) no canal FAM. Direita: Regressão linear obtida para cada alvo. Experimento realizado no Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96™ (Bio-Rad).

HPV genótipo	Eficiência	R ²	Inclinação
HPV 16	91,5%	0,999	- 3.543
HPV 18	83,7%	0,997	- 3.786
HPV 31	89,5%	0,998	- 3.063
HPV 33	93,6%	0,981	- 3.485
HPV 35	97,6%	0,995	- 3.380
HPV 39	93,1%	0,996	- 3.499
HPV 45	89,6%	0,997	- 3.600
HPV 51	93,9%	0,998	- 3.477
HPV 52	90,9%	0,999	- 3.561
HPV 56	93,3%	0,996	- 3.495
HPV 58	91,4%	0,998	- 3.547
HPV 59	90,6%	0,997	- 3.571
HPV 66	92,7%	0,997	- 3.511
HPV 68	90,3%	0,998	- 3.579

Tabela 8. Eficiência de amplificação, R² e inclinação das retas obtidas com diluições seriadas de fragmentos sintéticos de cada alvo.

10.2 Especificidade analítica

A especificidade do **kit HPV Screening** foi confirmada testando amostras clínicas positivas para outros patógenos relacionados a doenças sexualmente transmissíveis. Além disso, testes de especificidade também foram realizados contra potenciais genótipos de alto e baixo risco de papilomavírus humano e contra outras bactérias que compartilham um nicho ecológico. A lista completa de organismos testados para reatividade cruzada é mostrada na tabela a seguir.

Teste de reatividade cruzada	
Microrganismo	Resultados
<i>Candida albicans</i>	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecium</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Haemophilus ducrey</i>	Negativo
HR genótipo HR 26	Negativo
Genótipo HR HR 53	Negativo
Genótipo HR HR 73	Negativo
Genótipo HR HR 82	Negativo
Genótipo LR HR 11	Negativo
Genótipo LR HR 42	Negativo
Genótipo LR HR 43	Negativo
Genótipo LR HR 54	Negativo
Genótipo LR HR 6	Negativo
Genótipo LR HR 61	Negativo
Genótipo LR HR 62	Negativo
Genótipo LR HR 67	Negativo
Genótipo LR HR 70	Negativo
Genótipo LR HR 71	Negativo
Genótipo LR HR 72	Negativo
Genótipo LR HR 81	Negativo
Genótipo LR HR 84	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Negativo
<i>Mycoplasma hominis</i>	Negativo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo

Rev.: 06/04/2023

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo
<i>Treponema pallidum</i>	Negativo
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Negativo
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negativo
Vírus Sincial Respiratório-1	Negativo
Vírus Sincial Respiratório-2	Negativo

Tabela 90. Microrganismos testados no teste de especificidade

Não foram detectadas reações cruzadas com nenhum dos patógenos testados.

10.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi analisada testando o método 6 vezes para cada um dos alvos incluídos no painel. Para isso, foi utilizada uma concentração conhecida de fragmentos de DNA sintético que mimetizam cada um dos alvos a serem amplificados. O teste foi realizado pelo mesmo operador, em um único local, utilizando o mesmo lote de reagentes e a mesma plataforma. A plataforma utilizada foi a *Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* e os resultados foram analisados com a versão v. 2.4.3 do *software Design and Analysis (Applied Biosystems)*. A variabilidade entre os ensaios foi determinada a partir dos valores de CTs obtidos das repetições e o coeficiente de variação (CV) foi calculado como desvio padrão dividido pela média dos CTs, sendo 0,35% para HPV 16, 0,93% para HPV 18 e 1,43% para HPV AR.

10.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi analisada simulando a variabilidade interlaboratorial, alterando o operador, o equipamento utilizado no processo e os lotes de mix PCR. 40 amostras de DNA purificado foram testadas com o kit de extração de patógenos de DNA/RNA (Opentrons OT2 Robot), (Vitro, ref. MAD-003955M) usando o sistema de extração automatizado Opentrons OT2. Das 40 amostras, 24 foram positivas para HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66 e/ou HPV 68 e 16 amostras foram negativas.

A concordância foi calculada com um índice kappa de 0,884, erro padrão de 0,08 e um IC 95% de 1,000-1,000 mostrando uma força de concordância muito boa para o kit.

Laboratório 2	Laboratório 1		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	24	0	24
Negativo	0	16	16
Total	24	16	40

Tabela 10. Teste de reprodutibilidade para os alvos incluídos no kit Screening de HPV.

10.5 Faixa de medição

O intervalo de medição do ensaio foi determinado usando fragmentos de DNA sintético para cada um dos alvos incluídos no MMix do kit de screening de HPV por PCR em tempo real.

O kit demonstrou funcionar corretamente na presença de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^6 cópias/reação a 10 cópias/reação (Consulte a seção 10.1 Sensibilidade analítica).

Para determinar o limite superior, diluições em série de 10^9 cópias/reação a 10^7 cópias/reação de fragmentos sintéticos de cada alvo foram testadas. Três réplicas foram testadas em cada nível.

Todas as reações foram realizadas com o sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 e analisadas com o *software* de análise e design QuantStudio™ 2.4.3.

Foi estabelecido que o kit de screening de HPV por PCR em tempo real tem uma faixa de medição de 10^9 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 16, HPV 18; 10^6 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 59, HPV 66 e HPV 68 e 10^7 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 39 e HPV 58.

10.6 Sensibilidade e especificidade clínica

O kit **HPV Screening** foi validado a partir de DNA purificado por qualquer um dos métodos de extração mencionados anteriormente. A capacidade diagnóstica do kit de screening de HPV por PCR em tempo real foi avaliada por meio do estudo de sua sensibilidade e especificidade diagnóstica. Esses dois parâmetros são definidos e calculados da seguinte forma:

- A **especificidade diagnóstica** é expressa como uma porcentagem (fração numérica multiplicada por 100), calculada como $100 \times \frac{\text{número de valores negativos verdadeiros (NV)}}{\text{número de valores negativos verdadeiros (NV)} + \text{número de valores falsos positivos (FP)}}$, ou seja: $100 \times \text{NV} / (\text{NV} + \text{FP})$.
- A **sensibilidade diagnóstica** é expressa como uma porcentagem (fração numérica multiplicada por 100), calculada como $100 \times \frac{\text{número de valores verdadeiros positivos (PV)}}{\text{número de valores verdadeiros positivos (PV)} + \text{número de valores falsos negativos (FN)}}$, ou seja: $100 \times \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$.

Um total de 266 amostras clínicas de diferentes origens de diferentes hospitais e laboratórios foram analisadas em um estudo retrospectivo: Hospital Costa de la Luz (Huelva), Hospital Universitario San Cecilio (Granada), Laboratório Dr. Aneiros (Granada), Laboratório Dra. Lasso (Madri), Instituto Jiménez Ayala (Madri), Laboratório Dra. Maestro, Laboratório Dr. Cueva SL (Jaén), Laboratório de Anatomia Patológica Luresa (Lugo) e Bioportugal (Porto). Destas amostras 101 foram positivas para um ou mais dos genótipos detectados pelo kit e 165 foram negativas. O estudo comparativo foi realizado usando o HPV Direct Flow Chip Kit (Vitro SA) marcado com CE-IVD como método de referência. O DNA das amostras foi extraído com o kit de extração de patógenos de DNA/RNA (Robot Opentrons OT2) (Vitro, ref. MAD-003955M).

As Tabelas 11 e 12 mostram a sensibilidade e especificidade diagnóstica do kit HPV Screening por PCR em

Rev.: 06/04/2023

tempo real, bem como seu valor preditivo positivo e negativo.

Organismo	NV	FP	VP	FN	Especificidade diagnóstica	95% IC	Diagnóstico Sensibilidade	95% IC
HPV 16	248	0	18	0	100%	98,09 - 100%	100%	78,12 - 100%
HPV 18	256	0	10	0	100%	98,16 - 100%	100%	65,54 - 100%
HPV AR	187	0	77	2	100%	97,49 - 100%	97,5%	90,31 - 99,56%

Tabela 11. Resultados de sensibilidade e especificidade obtidos com o kit de screening de HPV por PCR em tempo real.

Organismo	NV	FP	VP	FN	PPV	95% IC	VPL	95% IC
HPV 16	248	0	18	0	100%	78,12 - 100%	100%	98,09 - 100%
HPV 18	256	0	10	0	100%	65,54 - 100%	100%	98,16 - 100%
HPV AR	187	0	77	2	100%	94,08 - 100%	98,94%	95,83 - 99,82%

Tabela 12. Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do kit de screening de HPV por PCR em tempo real.

11 LIMITAÇÕES DO TESTE

1. Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto do histórico médico, sintomas clínicos e outros testes diagnósticos.
2. Utilização de amostras inadequadas: Os tipos de amostras clínicas validadas são citologia de base líquida, swabs vaginais e retais. O método foi validado com base no material genético deles purificado. A análise de qualquer outro tipo de amostra não indicada pode levar a resultados errados ou inconclusivos devido à inibição da reação de PCR por agentes químicos inibidores.
3. O correto funcionamento do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico deve ser devidamente extraído das amostras clínicas. A coleta, armazenamento e/ou transporte inadequados de amostras podem resultar em falsos negativos.
4. Um número baixo de cópias alvo abaixo do limite de detecção pode ser detectado, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
5. Um teste positivo para HPV não exclui a possibilidade de outros patógenos estarem presentes na amostra clínica.
6. Um resultado negativo do teste não exclui a existência de infecção por HPV e não deve ser usado como único método diagnóstico para estabelecer um tratamento ou regime de manejo do paciente.
7. Um resultado negativo do teste deve ser analisado no contexto do histórico médico do paciente e da epidemiologia.

12 BIBLIOGRAFIA

- Attempts to detect virus specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., Bornkamm, G.W. 1974. Int J Cancer 13: 650-6.
- Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Muñoz, N. 1999. J Pathol 189: 12-9.
- Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1288: F55-78.
- Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. zur Hausen, H. 2002. Nat Rev Cancer 2: 342-50.
- Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J. 2003. N Engl J Med 348 (6): 518-27.

13 SÍMBOLOS DE ETIQUETA E CAIXA

	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Data de validade
	Número de catálogo		Limite de temperatura
	Código do lote		Fabricante
	Consulte as instruções de uso		Conteúdo suficiente para <n> ensaios
	Ficha de dados de segurança		

14 REGISTRO DE MUDANÇA

Encontro	Descrição
22/07/2021	Criação do documento.
05/12/2023*	Inclusão dos dados do distribuidor e campo para registro ANVISA.

*Referente à Rev 00 Mobius

FABRICANTE:

Vitro S.A.
Avenida del Conocimiento, 100. Parque Tecnológico de la Salud - 18016. Granada - Espanha.
Tel: +34 954 933 200.
vitro@vitro.bio; www.vitro.bio

IMPORTADO E DISTRIBUÍDO POR:

Mobius Life Science Indústria e Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda.
Rua Jandaia do Sul 441 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-440
Telefone: (41) 3401-1850
E-mail: suporte@mobiuslife.com.br Website: www.mobiuslife.com.br
CNPJ: 04.645.160/0001-49

REGISTRO ANVISA:

80502070111

Rev.: 06/04/2023