

INSTRUÇÕES DE USO

RUO XGEN MASTER HPV SCREENING

RUO KIT PARA DETECÇÃO DE 14 GENÓTIPOS DE HPV DE ALTO RISCO POR PCR EM TEMPO REAL

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O RUO XGEN MASTER HPV SCREENING é um kit de diagnóstico *in vitro* para a 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 espécimes clínicos humanos de diferentes origens, como citologia líquida e *swabs* vaginais e retais. Baseia-se na técnica de PCR em tempo real multiplex e utiliza primers e sondas fluorescentes para uma região conservada do gene alvo L1 do genoma 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.

Iniciadores específicos e sonda fluorescente são incluídos para a detecção simultânea do gene da beta globina humana como controle de qualidade interno do material de partida e amplificação.

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.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING deve ser transportado e armazenado a -20°C^* . No entanto, além do transporte recomendado a -20°C , também é possível transportá-lo à temperatura de refrigeração (2°C e 8°C), desde que o período de trânsito não exceda no máximo dez dias. Em qualquer caso, o kit deve ser armazenado a uma temperatura de -20°C após o recebimento.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Esse kit realiza a detecção através de um ensaio multiplex, baseado na reação em cadeia de 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 primers e sonda para a detecção do gene da beta globina humana em amostras clínicas 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 de sonda *TaqMan*. Essas sondas são oligonucleotídeos de DNA de fita simples modificados que possuem um fluoróforo (*reporter*) ligado covalentemente à extremidade 5' e um inibidor ligado à extremidade 3'. Se os ácidos nucleicos alvo estiverem presentes, estes são amplificados e, durante o processo de PCR, as sondas se ligarão especificamente nas regiões complementares localizadas entre os primers direto e reverso.

Enquanto ocorre a fase de extensão da PCR, a atividade da nuclease 5' 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 simultaneamente e diferenciar os diferentes sinais em uma única reação. A cada ciclo de desnaturação-extensão ocorre a divisão de novas moléculas de repórter e, conseqüentemente, a intensidade do sinal fluorescente aumenta. A intensidade da fluorescência é monitorada nos instrumentos de PCR em tempo real em cada um dos ciclos e os dados são analisados com um software de análise específico para cada plataforma.

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

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING em tempo real foi validado a partir do material genético purificado de diferentes amostras clínicas, como citologias líquidas e swabs vaginais e retais.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

Utilizar material genético purificado das diferentes amostras clínicas selecionadas.

4.3 MANUSEIO

Este kit foi validado com material genético inicial obtido dos seguintes kits de purificação de DNA/RNA e equipamentos de extração, iniciando 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 eluir em 60 µl de solução de eluição):

KITS DE EXTRAÇÃO	EQUIPAMENTOS DE EXTRAÇÃO
Kit de purificação de tecido <i>LEV ADN Maxwell® 16 FFPE (Promega)</i>	<i>Maxwell® 16 (Promega)</i>
<i>NX48S - Kit de DNA de Urina/Cotonete (Genolution)</i>	<i>Nextractor NX-48S (Genolution)</i>
Kit de extração de patógenos de RNA/DNA (<i>Robot Opentrons OT2 (Vitro, ref. MAD-003955M)</i>)	<i>Opentrons OT-2</i>

NOTA: O produto não foi validado com outros sistemas de extração de DNA/RNA. Portanto, se qualquer outro sistema de purificação for usado, deverá ser verificado previamente.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O RUO XGEN MASTER HPV SCREENING é comercializado como um Master Mix pronto para 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.

O formato padrão do kit contém reagentes para 100 testes.

COMPONENTES		CONTÉUDO	QUANTIDADE 100 TESTES
HPV MMIX	HPV MMIX	Polimerase Hot Start (125 U/mL), Uracila DNA glicosilase (50 U/mL), iniciadores 0,1-0,4 µM, 0,05-0,4 sonda fluorescente, 2x tampão de reação, 1 mM dUTP, 1,3 mM dNTPs (A, G, C, T)	2 frascos com 50 testes/frasco
	ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE	---	1 frasco (200 µl)
CONTROLE POSITIVO HPV SCREENING		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)

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Kit de extração de DNA;
- ✓ Micropipetas (0,5 µL < volume < 1.000 µL);

IMPORTANTE: Devem estar calibradas para distribuir o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a regulares descontaminações das partes que podem acidentalmente entrar em contato com a amostra. Elas devem ser certificadas e devem estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e exatidão de ± 5%.

- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Racks para tubos;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livre de nuclease;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Cabine de fluxo laminar.
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor.

7. ESTABILIDADE EM USO

O HPV MMix é sensível a mudanças de estado físico e foi comprovado que suporta até cinco ciclos de congelamento-descongelamento. Se uma execução for realizada com um número baixo de amostras, recomenda-se a alíquota do reagente com antecedência.

O Controle Positivo é sensível a mudanças de estado físico e ciclos repetidos de congelamento-descongelamento devem ser evitados. É aconselhável manusear o frasco de controle positivo separadamente das amostras clínicas para evitar contaminação potencial que pode gerar falsos positivos.

Se armazenados na temperatura recomendada, os reagentes de PCR são estáveis até a data de validade indicada. Os reagentes de PCR devem ser armazenados em áreas livres de contaminação por DNA ou produtos de PCR.

8. ORIENTAÇÕES GERAIS

- O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e treinado na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
- Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- Os responsáveis pelo manuseio de amostras devem ser vacinados contra tétano, difteria, hepatite B e os estabelecidos no PCMSO, de acordo com a Norma Regulamentadora 32.
- Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras de soro humano, sangue e plasma devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor.
- Os resíduos gerados durante a utilização do kit devem ser descartados de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

9. RECOMENDAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE

- Não utilizar reagentes ou materiais fora da data de validade.
- Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
- Ligar o termociclador e verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio correto.
- Seguir estritamente o manual do equipamento fornecido pelo fabricante para a correta configuração do termociclador em Tempo Real.
- Não trocar os componentes entre diferentes lotes do produto. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
- O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes.
- Utilizar ponteiras descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiras após a manipulação de cada amostra.
- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, iniciando com o preparo dos reagentes (pré-PCR), passando para a extração de amostras (pré-PCR) e finalizando com as de amplificação e de análises de dados (pós-PCR). Não compartilhar reagentes e equipamentos entre as diferentes áreas.

IMPORTANTE: A circulação de pessoas e equipamentos provenientes da área de amplificação para a área de preparo de reagentes deve ser evitada fortemente, para evitar a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.

- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.

8.1 RECOMENDAÇÕES GERAIS PARA EVITAR A CONTAMINAÇÃO COM PRODUTOS DE PCR

- A maior fonte de contaminação 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 do RNA e a preparação da PCR. Recomenda-se trabalhar em diferentes áreas pré e pós-PCR onde são realizados o manuseio do RNA 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 (aventais de laboratório, pipetas, ponteiros 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 pessoas 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 incluída no kit.

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

10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

10.1 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de Controle Negativo (CN) e Controle Positivo (CP).

10.2 PREPARAÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO

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

- Descongelar e homogeneizar o MMix HPV (não utilize vortex). Depois de descongelado, centrifugue brevemente.
- Misture em cada tubo de PCR os seguintes volumes para cada amostra:

REAGENTE	VOLUME/TESTE
HPV SCREENING MMIX	12 µl
AMOSTRA	8 µl

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

NOTA: Recomenda-se manter o MMix em rack termoestável durante o preparo das amostras e não descongelar o frasco mais de cinco vezes.

10.3 PROGRAMAÇÃO DA PCR

No software do instrumento insira os diferentes alvos e canais de detecção para cada um deles. Configure as amostras, o controle positivo (CP), os alvos de PCR (NTC) e aloque as posições das amostras na placa de PCR.

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

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Hold</i>	25 °C	5 min.	1
<i>Hold</i>	95 °C	5 min.	1
Ciclo PCR	95 °C	15 seg.	5
	42 °C	15 seg.	
	72 °C	30 seg.	
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	15 seg.	45
	60 °C (*)	40 seg.	

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:

- Equipamento de PCR em tempo real *QuantStudio™ 5 (Applied biosystems)*
- Equipamento de PCR em tempo real *CFX96™ (Bio-Rad)*
- *VitroCycler (Vitro S.A.)*

Para sua utilização em outras plataformas, recomenda-se verificar a compatibilidade dos fluoróforos com os canais de detecção de cada instrumento. Embora os fluoróforos incluídos no kit sejam compatíveis com a maioria dos instrumentos de tempo real mais utilizados disponíveis no mercado. Nos termocicladores *Applied Biosystems 7500 Fast* e *QuantStudio™ 5*, a opção de controle passivo ROX deve ser desativada.

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

10.4 SELEÇÃO DE DETECTORES

Os canais de detecção dos diferentes alvos são:

DETECÇÃO	REPORTER
HPV 16	ROX
HPV 18	Cy5
HR	FAM
Beta globina	HEX/ JOE/VIC

10.5 CONFIGURAÇÕES PRÉ-ANÁLISE

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

10.6 VALIDAÇÃO DA CORRIDA

Antes da interpretação dos resultados para as amostras clínicas, é necessário seguir o guia de interpretação do controle positivo e negativo citados na tabela a seguir:

	RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
CONTROLE POSITIVO HPV	Sinal para os canais FAM, ROX, Cy5 e JOE/VIC*	O controle/reação está correto.
	Sem sinal para FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE/VIC	Problema na amplificação, repetir a análise.
CONTROLE NEGATIVO	Sinal para os canais FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE/VIC	Contaminação, repetir a análise.
	Sem sinal	O controle/reação está correto.

*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) (Figura 1).

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

ALVO	FAIXA DE ACEITE
HPV 16 (ROX)	20±2
HPV 18 (Cy5)	20±2
HPV HR (FAM)	20±2
Beta globina (JOE/VIC)	20±2

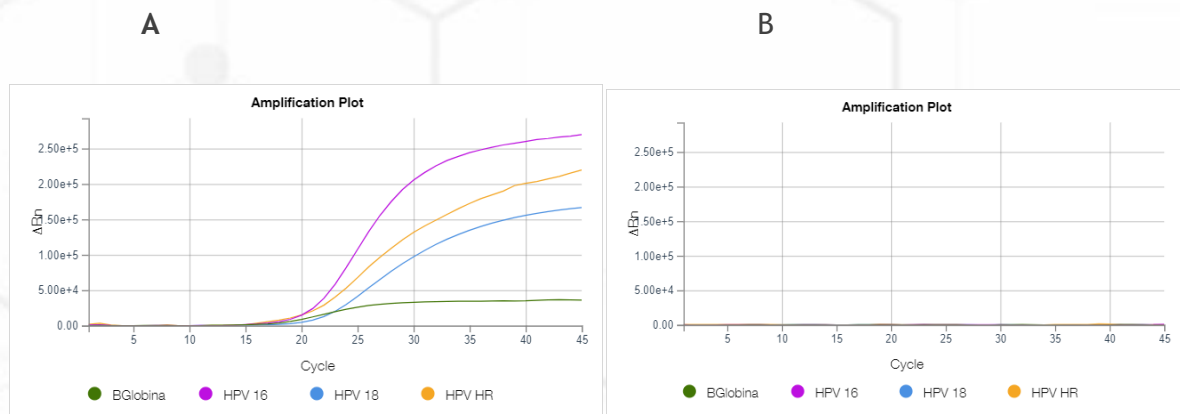


Figura 1: Gráficos de amplificação do controle positivo CP (A) e do controle negativo com água CN (B). (Valores C_t s esperados para PC: HPV 16 (ROX) 20±2; HPV 18 (Cy5) 20±2; HPV HR (FAM) 20±2, Beta globina (JOE) 20±2. Realizado no equipamento de PCR de tempo Real *Applied Biosystems QuantStudio™ 5*.

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

RUO XGEN MASTER HPV SCREENING				INTERPRETAÇÃO
HPV 16 (ROX)	HPV 18 (Cy5)	HPV HR (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 outros genótipos de HPV 16 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 outros genótipos de HPV 18 de alto risco (Tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
			Sem Sinal	
Sinal	Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV 16, HPV 18 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 com a extração ou amplificação.

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

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

Uma amostra é positiva se o valor de *Ct* obtido for ≤ 40 , embora 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.

11. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

Para o usuário deste kit recomenda-se a leitura cuidadosa e a compreensão da instrução de uso. A adesão estrita ao protocolo é necessária para a obtenção de resultados confiáveis.

Em particular, a veracidade da amostra, a pipetagem de reagentes, a aplicação do fluxo de trabalho correto, juntamente com a etapa da programação cuidadosa do termociclador, é

essencial para resultados precisos e reprodutíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os tipos de amostras clínicas validadas são: urina, sêmen, citologias em meio líquido; e swabs uretrais, endocervicais, anais e faríngeos. O método foi validado com base no material genético delas 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.

O desempenho correto 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.

Um número baixo de cópias de destino abaixo do limite de detecção pode ser detectado, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.

Um teste positivo para HPV não exclui a possibilidade de que outros patógenos estejam presentes na amostra clínica.

Um resultado negativo do teste não exclui que haja uma infecção com HPV e não deve ser usado como o único método de diagnóstico para estabelecer um tratamento ou regime de manejo do paciente. O resultado negativo do teste deve ser analisado de acordo o histórico médico do paciente e epidemiologia.

Os resultados obtidos com o kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING devem ser interpretados pelos responsáveis do laboratório levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes e outros parâmetros de laboratório relacionados às condições do paciente.

É recomendado que a confidencialidade, aconselhamento apropriado e avaliação médica sejam considerados aspectos essenciais na sequência de testes.

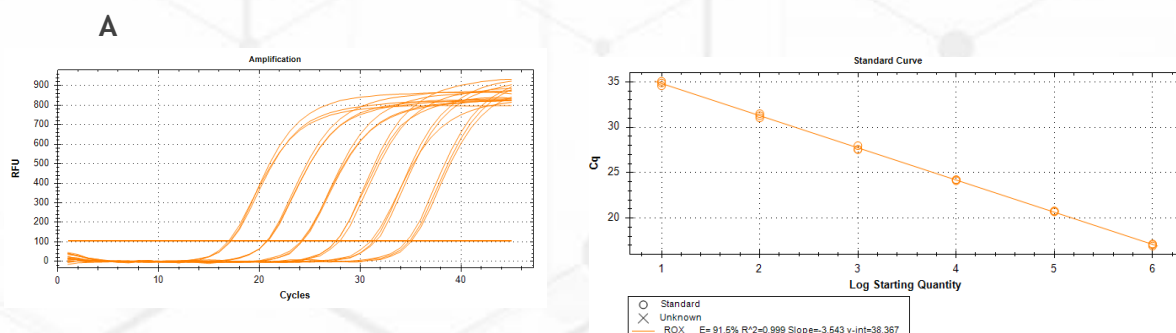
12. DESEMPENHO

12.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA

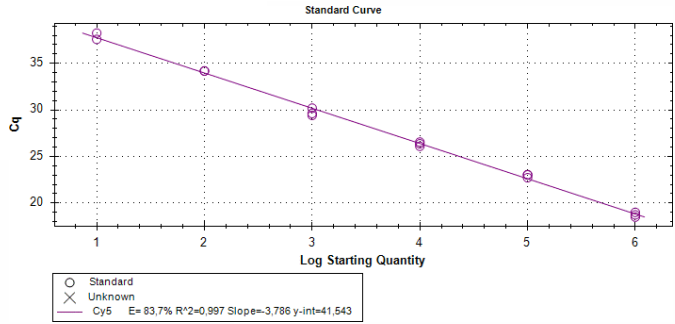
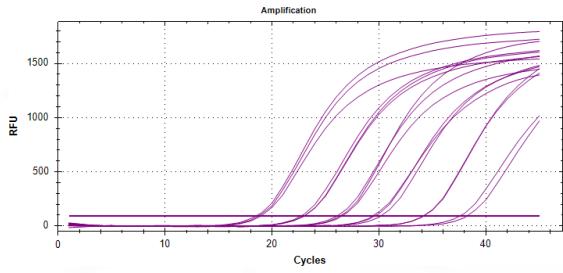
A sensibilidade analítica do kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING foi determinada realizando três réplicas de diluições em série de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^6 cópias/rxn a 10 cópias/rxn. Ajustando os dados de Cts obtidos a uma linha, a eficiência de amplificação, R^2 e a inclinação foram determinadas para cada um dos genes.

Foi estabelecido que o kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING 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).

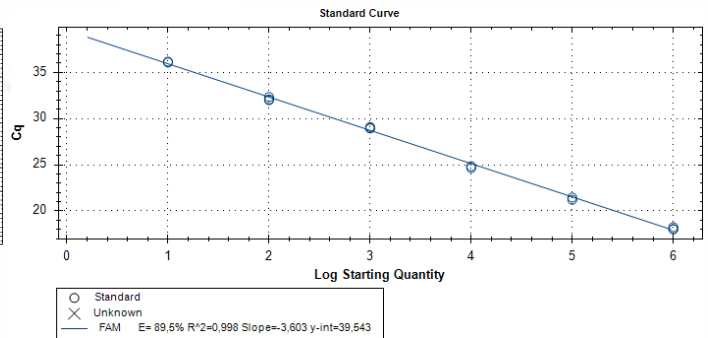
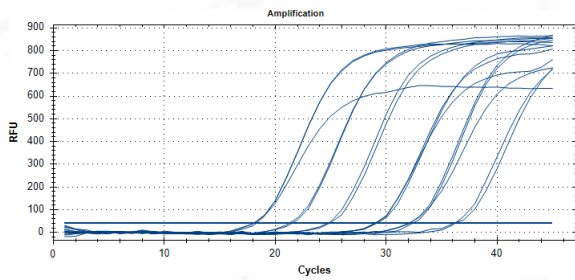
A eficácia na amplificação do alvo escolhido como também do R^2 e a inclinação da linha obtida é mostrada na tabela seguinte.



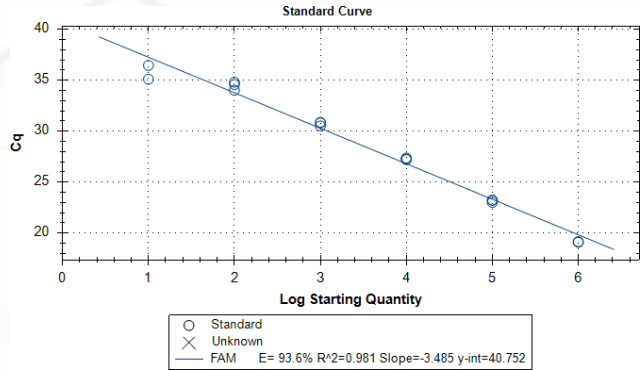
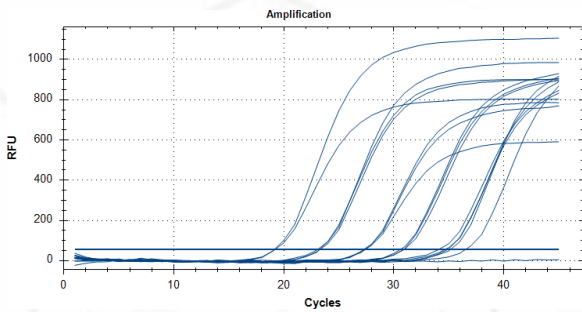
B



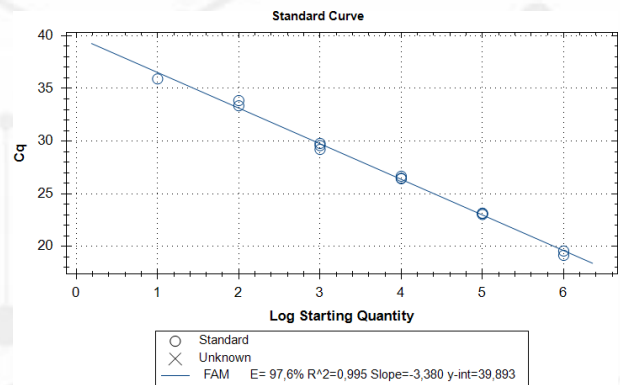
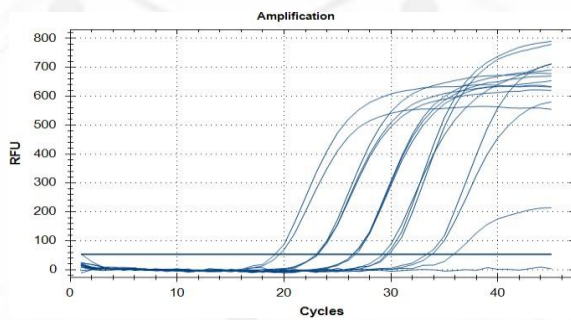
C



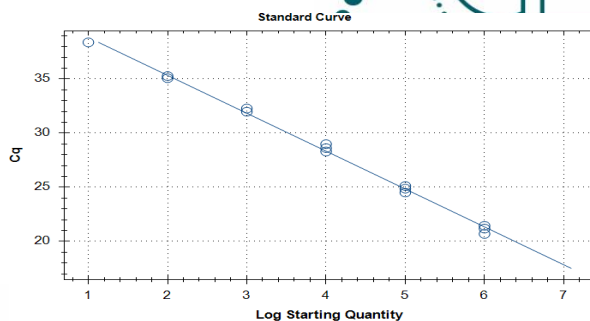
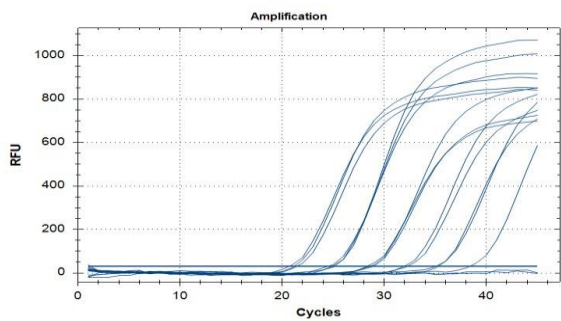
D



E

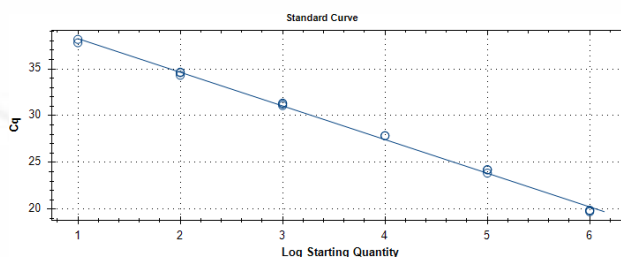
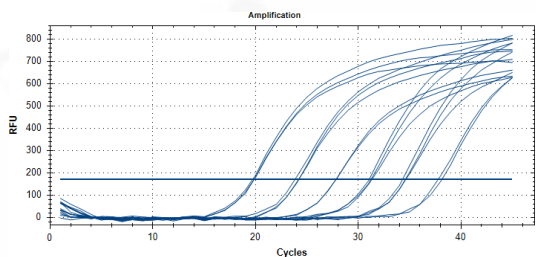


F



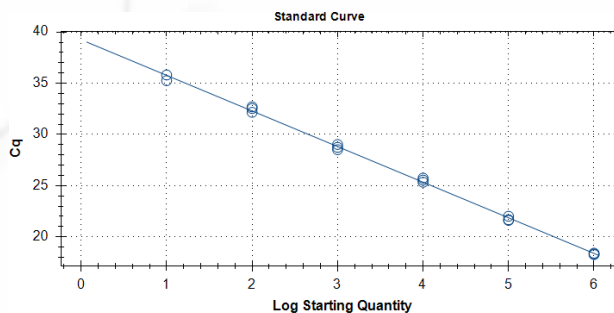
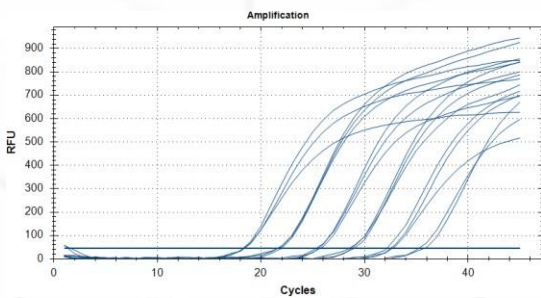
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 93,1% R²=0,996 Slope=-3,499 y-int=42,333

G



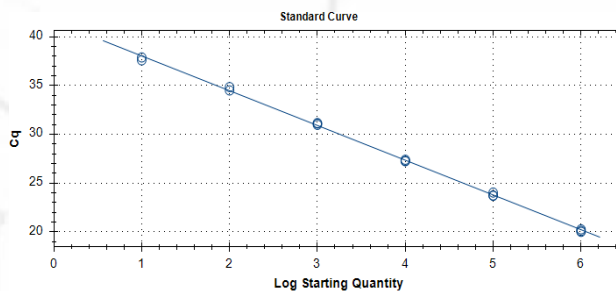
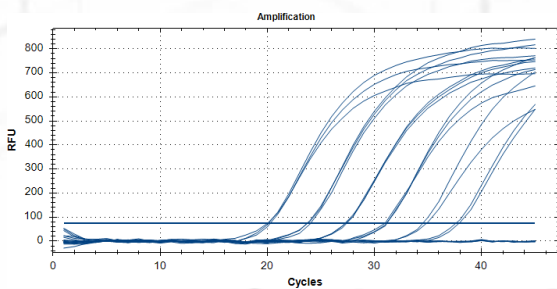
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 89,6% R²=0,997 Slope=-3,600 y-int=41,845

H



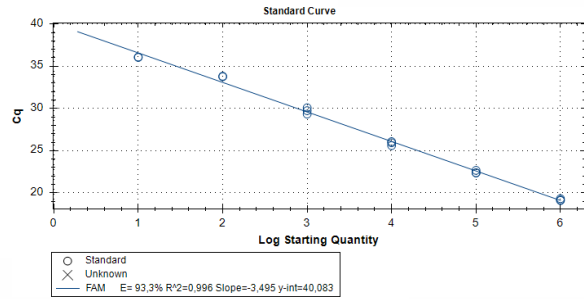
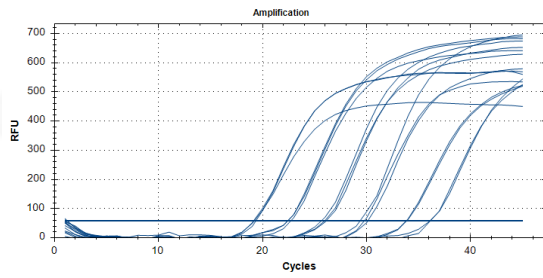
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 93,9% R²=0,998 Slope=-3,477 y-int=39,253

I

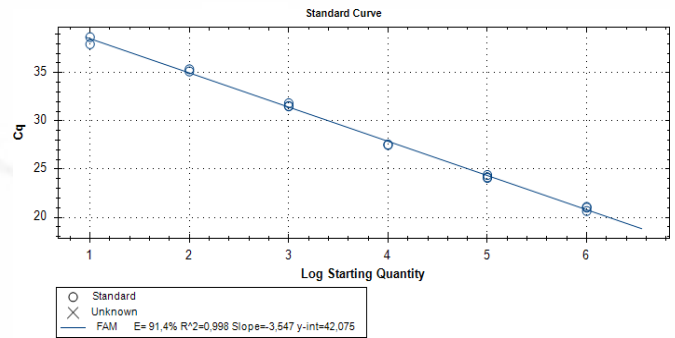
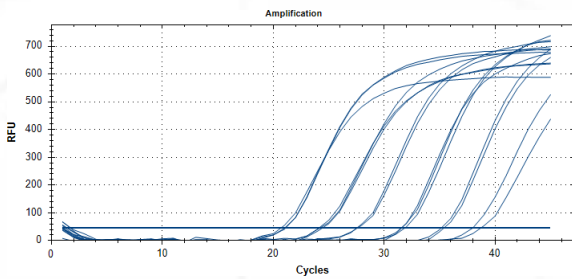


○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 90,9% R²=0,999 Slope=-3,561 y-int=41,594

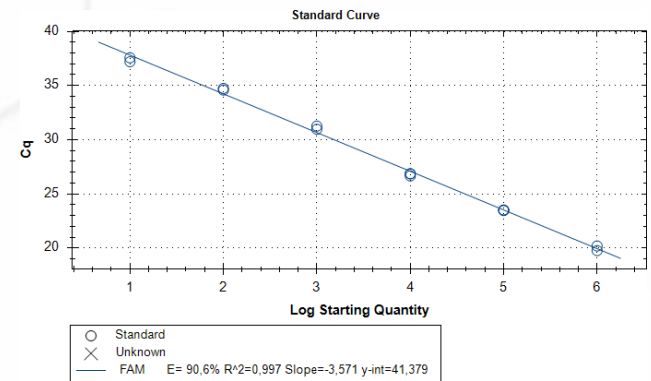
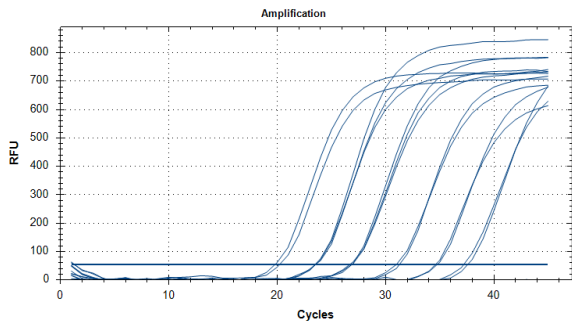
J



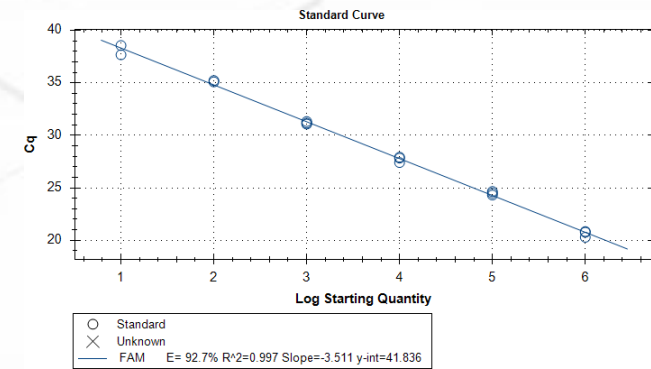
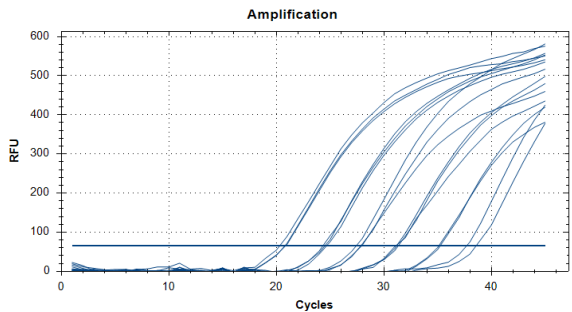
K



L



M



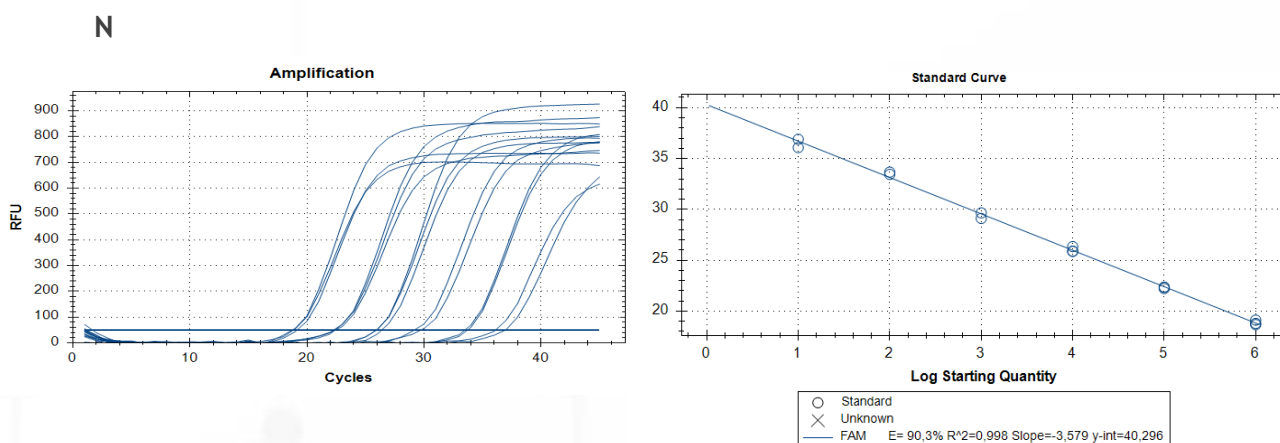


Figura 2: Esquerda: Diluições seriadas de 10^6 cópias/reação para 10 cópias/reação de fragmentos sintéticos de HPV 16 no canal ROX (A), HPV 18 no canal Cy5 (B) e HPV 31 (C), HPV 33 (D), HPV 35 (E), HPV 39 (F), HPV 45 (G), HPV 51 (H), HPV 52 (I), HPV 56 (J), HPV 58 (K), HPV 59 (L), HPV 66 (M) e HPV 68 (N) no canal FAM. Direita: Linhas de calibração obtidas para cada alvo. Experiência realizada no Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real CFX96™ (Bio-Rad).

HPV GENÓTIPO	EFICÁCIA	R ²	PENDENTE
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

12.2 ESPECIFICIDADE

A especificidade do kit RUO XGEN MASTER 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 nicho ecológico. A lista completa de organismos testados para reatividade cruzada é mostrada na tabela a seguir.

PROVA DE REATIVIDADE CRUZADA	
MICROORGANISMO	RESULTADO
<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
HR genótipo HR 53	Negativo
HR genótipo HR 73	Negativo
HR genótipo HR 82	Negativo
LR genótipo HR 11	Negativo
LR genótipo HR 42	Negativo
LR genótipo HR 43	Negativo
LR genótipo HR 54	Negativo
LR genótipo HR 6	Negativo
LR genótipo HR 61	Negativo
LR genótipo HR 62	Negativo
LR genótipo HR 67	Negativo
LR genótipo HR 70	Negativo
LR genótipo HR 71	Negativo
LR genótipo HR 72	Negativo
LR genótipo HR 81	Negativo
LR genótipo 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
<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 Sincicial Respiratório-1	Negativo
Vírus Sincicial Respiratório-2	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
HR genótipo HR 53	Negativo
HR genótipo HR 73	Negativo

Nenhuma reação cruzada foi detectada com qualquer um dos patógenos testados.

12.3 EXATIDÃO

O intervalo de medição do teste foi determinado usando fragmentos de DNA sintético para cada um dos alvos incluídos no kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING.

O kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING demonstrou funcionar corretamente na presença de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^6 cópias/reação a 10 cópias/reação. (Consulte o item. 12.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA).

O kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING demonstrou funcionar corretamente na presença de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^7 cópias/reação a 10 cópias/reação. (Consulte o item. 12.1 Sensibilidade analítica).

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

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

Foi estabelecido que o kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING tem um intervalo de medição de 10^9 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 16 e 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.

12.4 PRECISÃO

12.4.1 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 e utilizando o mesmo lote de reagentes e a mesma plataforma. A plataforma utilizada foi o *Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* e os resultados foram analisados com a versão v. 2.4.3. A variabilidade entre os testes foi determinado a partir dos valores de *Cts* obtidos das repetições. 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 HR.

12.4.2 REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade do método foi analisada simulando a variabilidade interlaboratorial, alterando o operador, o equipamento utilizado no processo e os lotes de PCR mix. Quarenta amostras de DNA foram testadas com kit de extração de patógeno de RNA/DNA (*Robot Opentrons OT2*), (*Vitro*, ref. MAD-003955M) usando o sistema de extração automatizado *Opentrons OT2*. Das 40 amostras, 24 foram positivas para HPV 16, HPV 18, GPV 21, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 42, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66 e/ou HPV 68 e 16 amostras foram negativas.

A concordância foi calculada com um coeficiente kappa de 1.00, erro padrão de 0 e um IC de 95% de 1,000-1,000 mostrando uma força de concordância muito boa para o RUO XGEN MASTER HPV SCREENING.

LABORATÓRIO 2	LABORATÓRIO 1		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	24	0	24
NEGATIVO	0	16	16

TOTAL	24	16	40
-------	----	----	----

12.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING foi validado a partir de DNA purificado por qualquer um dos métodos de extração acima mencionados. A capacidade diagnóstica do kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING 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 $100 \times \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}}$, onde TN é o número de valores verdadeiros negativos e FP é o número de falsos positivos.
- A **sensibilidade diagnóstica** é expressa em porcentagem (fração numérica multiplicada por 100), calculada como $100 \times \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$, onde VP é o número de valores verdadeiros positivos e FN é o número de valores falsos negativos.

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 S.L. (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 marcado com CE-IVD (Vitro S.A.) como método de referência. O DNA das amostras foi extraído com o kit de extração de patógenos de RNA/DNA (*Robot Opentrons OT2*) (*Vitro*, ref. MAD-003955M).

As tabelas a seguir mostram a sensibilidade e especificidade diagnóstica do kit RUO XGEN MASTER HPV SCREENING, bem como seu valor preditivo positivo e negativo.

ORGANISMO	TN	FP	TP	FN	ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA	CI 95%	SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA	CI 95%
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 HR	187	0	77	2	100%	97.49 - 100%	97.5%	90.31 - 99.56%

ORGANISMO	TN	FP	TP	FN	PPV	CI 95%	NPV	CI 95%
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 HR	187	0	77	2	100%	94.08 - 100%	98.94%	95.83 - 99.82%

NOTA: Os resultados das especificações (sensibilidade e especificidade) declarados correspondem ao número total de amostras testadas e o valor pode variar dependendo do tipo de amostra.

12. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

13. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

14. REQUISITOS

Profissional com conhecimentos em biologia molecular.

15. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Não aplicável.

16. ALERTAS E PRECAUÇÕES

- Leia as instruções de uso antes de utilizar o produto.
- O kit deve ser manuseado por profissionais qualificados em técnicas de biologia molecular aplicadas em diagnóstico.
- Não use nenhum componente do kit depois da data de validade.
- O controle positivo deve ser descongelado a temperatura ambiente, misturado bem e centrifugado brevemente antes do uso.
- As precauções de segurança e descarte de resíduos vem descritas na Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) do produto. O produto é destinado unicamente para uso profissional em laboratório, e não como fármaco, para uso doméstico ou outros fins.
- O RUO XGEN MASTER HPV SCREENING utiliza como material de partida ácidos nucleicos previamente extraídos e purificados. É responsabilidade do cliente incluir os controles necessários para verificar o que o sistema de extração de material genético utilizado funciona adequadamente.

17. GARANTIA

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos.

O produto RUO XGEN MASTER HPV SCREENING é garantido contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

17.1 EXCEÇÕES NA GARANTIA

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

17.2 EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.
- A Mobius não se responsabiliza por resultados/diagnósticos que sejam obtidos através da utilização de equipamentos e amostras não previstas na instrução de uso.

18. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

FABRICANTE:

Vitro S.A.

Calle Luís Fuentes Bejarano nº 60. Ed. Nudo Norte Local 3. 41020 Sevilla (Spain).

Tel: +34 954 933 200.

vitro@vitro.bio; www.vitro.bio

IMPORTADO 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@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0002-20

Rua Paraíso do Norte, 866 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-221

Telefone: (41) 3401-1850 | 0800-7101850

E-mail: suporte@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

19. REGISTRO ANVISA

RUO - SOMENTE PARA PESQUISA