

INSTRUÇÕES DE USO XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO

KIT PARA DETECÇÃO DE 15 GENÓTIPOS DE HPV DE BAIXO RISCO POR PCR EM TEMPO REAL

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O Kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO é um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de DNA de 15 genótipos do papilomavírus humano (HPV) considerados de baixo risco oncogênico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81), a partir de DNA purificado de amostras clínicas humanas de diferentes origens, como citologia líquida, swabs vaginais e retais e cortes de tecido parafinados.

O funcionamento do kit é baseado na técnica de PCR multiplex em tempo real, utilizando primers e sondas fluorescentes para a região conservada do gene alvo L1 dos genomas do HPV. O ensaio permite identificar especificamente os genótipos do HPV 6 e 11 e, ao mesmo tempo, detectar, mas não diferenciar, os genótipos 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81 em níveis clinicamente relevantes de infecção.

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

Alvo	Fluoróforo
HPV 6	ROX
HPV 11	Cy5
HPV Baixo Risco	FAM
Beta Globina	HEX/ JOE/VIC

Tabela 1. Canais de detecção para os diferentes alvos do kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO.

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.

Status Microbiológico: Produto não estéril.
Para uso em diagnóstico *in vitro* por profissionais.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO deve ser transportado e armazenado de -10°C a -30°C. No entanto, além do transporte recomendado, também é possível transportá-lo à temperatura de refrigeração (2°C - 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 -10°C a -30°C após o recebimento.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO 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 6, 11, 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81 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 (repórter) ligado covalentemente à extremidade 5' e um 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 especificamente nas regiões complementares localizadas entre os primers *forward* e *reverse*.

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 quencher, e um sinal fluorescente será gerado. As sondas específicas para HPV 6, HPV 11, os demais genótipos de baixo 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 diferencie os 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 equipamentos 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 XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO em tempo real foi validado a partir do material genético purificado de diferentes amostras clínicas, como citologia líquida, swabs vaginais e retais e cortes de tecido parafinados.

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 kits de extração*. O volume inicial da amostra, bem como o volume de eluição, são indicados na tabela a seguir:

KITS DE EXTRAÇÃO	EQUIPAMENTOS DE EXTRAÇÃO	VOLUME INICIAL DE AMOSTRA	VOLUME DE ELUIÇÃO
Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)	200µl	50µl
NX485 - Kit de Urina/Swab DNA (Genolution)	Extrator NX-485 (Genolution)	200µl	50µl
Kit de extração de patógenos de RNA/DNA (Robot Opentrons OT2) (Vitro, ref. MAD-003955M)	Opentrons OT-2	92µl	60µl
Kit de Extração de patógenos de RNA/DNA (Robot Nextractor NX-485) (Vitro, ref MAD-003955M-EX)	Extrator NX-485 (Genolution)	200µl	50µl

Tabela 2. Kits e instrumentos de extração usados para a 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, deverá ser verificado previamente.

4.4 Preparo e preservação

4.4.1 Preparação da mistura de reação

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

1. Descongele e homogeneíze o MMIX HPV BAIXO RISCO (não utilize vortex). Depois de descongelado, centrifugue brevemente.
2. Misture em cada tubo de PCR os seguintes volumes para cada amostra:

Reagente	VOL/teste
HPV SCREENING BAIXO RISCO MMix	12µl
Amostra	8µl

3. Adicione um controle negativo adicionando 8µl da água incluída no kit.
4. Inclua um controle positivo adicionando 8µl do CP HPV BAIXO RISCO 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.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO 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.

Componentes do kit para 100 testes:

DESCRIÇÃO	CONTÉUDO	QUANTIDADE
HPV SCREENING BAIXO RISCO MMIX	Polimerase Hot Start (125 U/ml), Uracil DNA glicosilase (50 U/mL), primer 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 DNase/ RNase	---	1 frasco (200 µl)
CONTROLE POSITIVO HPV SCREENING BAIXO RISCO	DNA sintético não infeccioso contendo parte do genoma de HPV 6, HPV 11, HPV 40 (12500 cópias/µl) e DNA humano (0,625 ng/µl)	1 frasco (100 µl)

Tabela 3. Reagentes e concentrações das substâncias ativas fornecidas pelo kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

6.1 Reativos e materiais

- Luvas descartáveis.
- Ponteiras com filtro livres de DNase/RNase;
- Kit de extração de DNA.

- Microtubo/placas/selo ópticos específicos para cada equipamento de PCR em Tempo Real.

6.2 Equipamentos

- Cabine de fluxo laminar.
- Microcentrífuga para tubos de 1.5ml.
- Microcentrífuga de tiras de tubos de PCR ou placas de 96 poços.
- Vortex.
- Micropipetas automáticas: P1000, P200, P20 e P2.
- Equipamento de PCR em tempo real.

7. ESTABILIDADE EM USO

A **MMix** é sensível a mudanças de estado físico e foi comprovado que suporta até quatro ciclos de congelamento-descongelamento. Se uma execução for realizada com um número baixo de amostras, recomenda-se fazer alíquotas do reagente com antecedência.

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

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

8.1 Considerações 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 DNA e a preparação da PCR. Recomenda-se trabalhar em diferentes áreas pré e pós-PCR onde são realizados o manuseio do DNA 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, ponteiras 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.

8.2 Eliminação de resíduos:

A manipulação de resíduos gerada pelo uso dos produtos comercializados pela Mobius, deve ocorrer de acordo com a legislação vigente. Ver política nacional sobre resíduos líquidos/resíduos sólidos e produtos químicos.

9. RECOMENDAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE

9.1 Configuração do equipamento para PCR em tempo real

No *software* do equipamento insira os diferentes alvos e canais de detecção para cada um deles. Configure o equipamento de PCR em tempo real seguindo as etapas abaixo:

PCR		
25° C	5 min	1 ciclo
95° C	5 min	1 ciclo
95° C	15 seg	5 ciclos
42° C	15 seg	
72° C	30 seg	
95° C	15 seg	45 ciclos
60° C*	40 seg	

Tabela 4. Programa de PCR do kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO.

Os dados de fluorescência devem ser coletados durante o estágio de extensão () através de ROX (HPV 6), Cy5 (HPV 11), FAM (HPV 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81) e canais HEX, JOE ou VIC (Controle Interno).

Este kit foi validado com as plataformas:

- Sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems)
- Sistema de detecção 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 equipamentos de tempo real mais utilizados disponíveis no mercado. No sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast e QuantStudio™ 5, a opção de ROX como referência passiva 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. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

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 SCREENING BAIXO RISCO	Sinal para os canais FAM, ROX, Cy5 e VIC/HEX/JOE*	O controle/reação está correto.
	Sem sinal para FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou VIC/HEX/JOE	Problema na amplificação, repetir a análise.
Controle Negativo	Sinal para os canais FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou VIC/HEX/JOE	Contaminação, repetir a análise.
	Sem sinal	O controle/reação está correto.

Tabela 5. Guia de interpretação controle positivo e negativo.

*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 alto ruído de fundo) (Fig 1).

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

- 20 ± 2 for HPV 6 (ROX)
- 20 ± 2 for HPV 11 (Cy5)
- 20 ± 2 for HPV BR (FAM)
- 20 ± 2 for Beta globina (VIC)

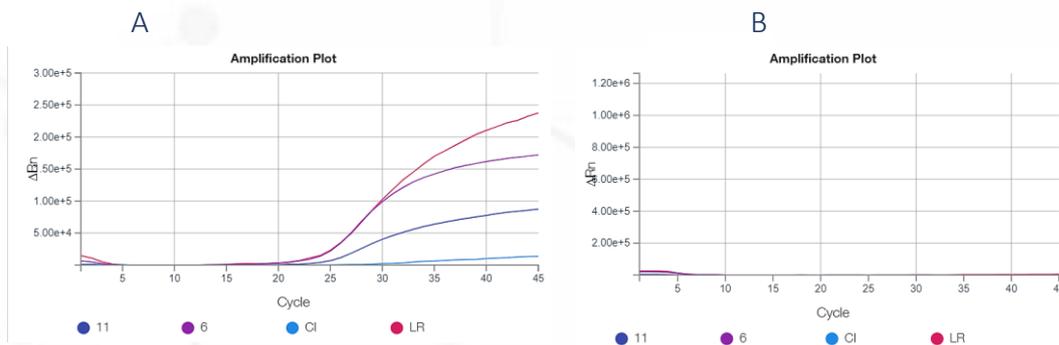


Figura 1: Gráficos de amplificação do controle positivo PC (A) e de um controle negativo com água NTC (B). Experimento realizado no sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 da Applied Biosystems

Se o ensaio for considerado válido, interprete os resultados das amostras clínicas de acordo com a seguinte tabela:

Kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO				INTERPRETAÇÃO
HPV 6 (ROX)	HPV 11 (Cy5)	HPV BR (FAM)	Beta globina (VIC/HEX/JOE)	
Sinal	Sem Sinal	Sem Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 6
			Sem Sinal	
Sem Sinal	Sinal	Sem Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 11
			Sem Sinal	
Sem Sinal	Sem Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV de baixo risco (Tipos 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81)
			Sem Sinal	
Sinal	Sinal	Sem Sinal	Sinal	Amostra positiva para HPV 6 e HPV 11
			Sem Sinal	
Sinal	Sem Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV 6 de baixo risco (Tipos 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81)
			Sem Sinal	
Sem Sinal	Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV 11 de baixo risco (Tipos 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81)
			Sem Sinal	

Sinal	Sinal	Sinal	Sinal	Amostra positiva para outros genótipos de HPV 6, HPV 11 de alto risco (Tipos 40, 42, 43, 44, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 e 81)
			Sem Sinal	
Sem Sinal	Sem Sinal	Sem Sinal	Sinal	Resultado Negativo ⁽¹⁾
			Sem Sinal	Inválido ⁽²⁾ : Problemas com a extração ou amplificação.

Tabela 6. Guia de interpretação de resultados.

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

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

Recomenda-se usar o ajuste automático de threshold feito pelo software padrão de cada equipamento 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.

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 viral, 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 amplificação. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controle interno.

11. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

- Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional da saúde com o histórico médico do paciente, os sintomas clínicos e outras provas de diagnóstico.
- Uso de amostras inadequadas: o método foi validado com base no material genético purificado das amostras. Os tipos de amostras clínicas validadas são: citologias líquidas, *swabs* vaginais e retais e cortes de tecido parafinado. 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 alvo 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.

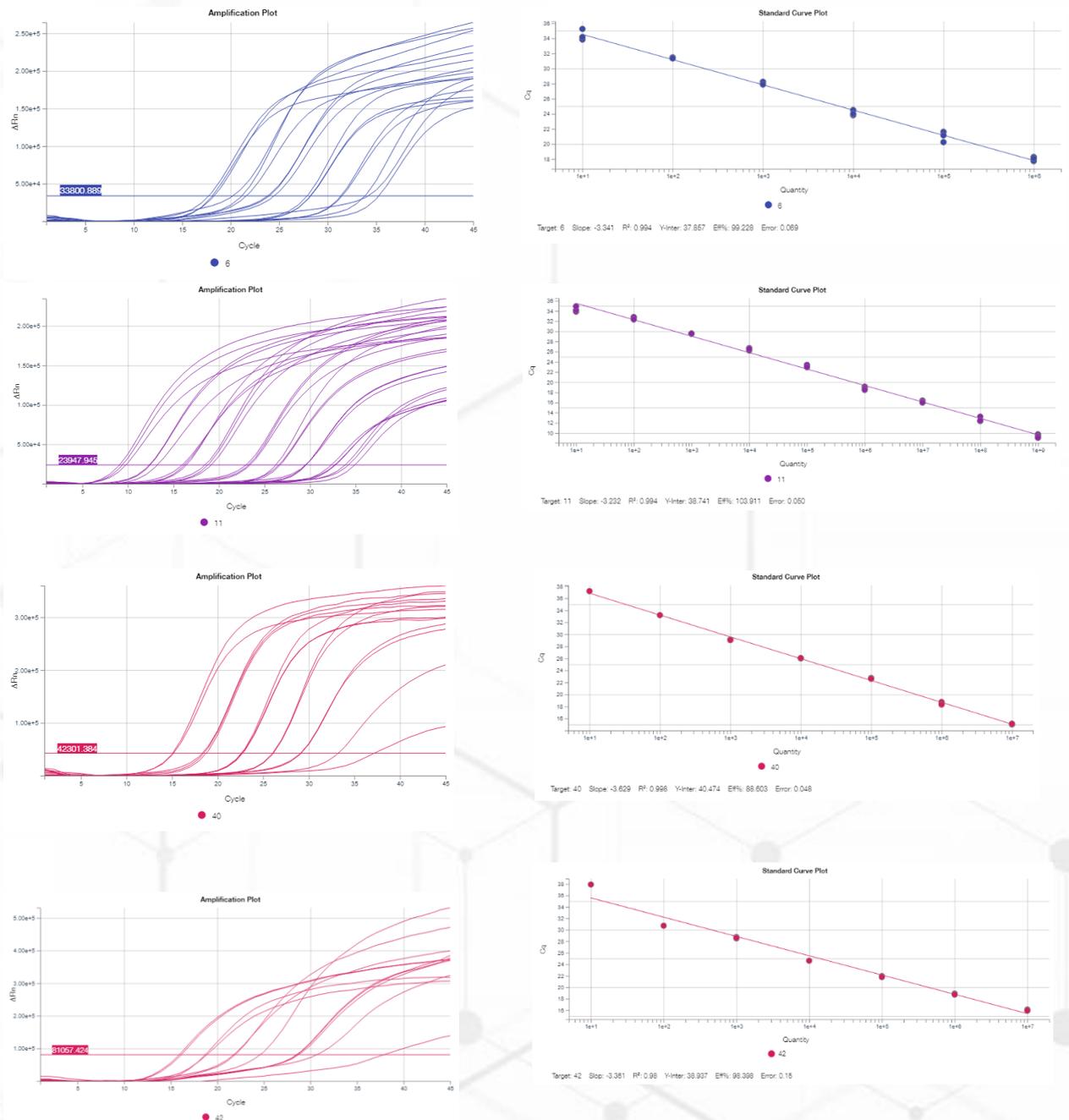
12. DESEMPENHO

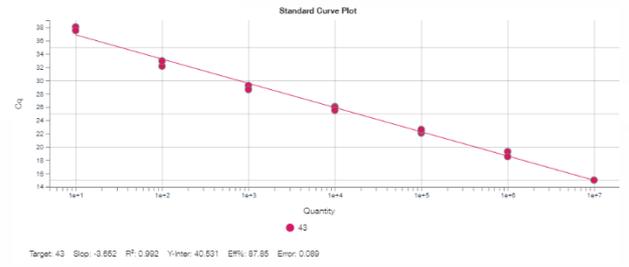
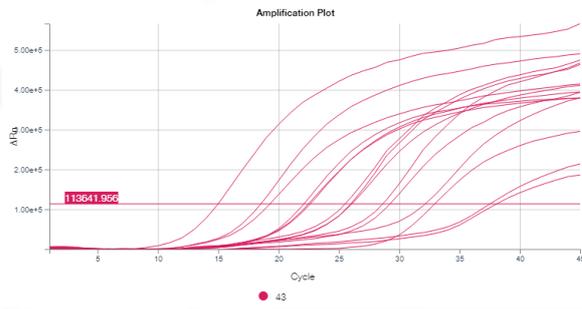
12.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO foi determinada realizando três réplicas de diluições em série de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^9 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.

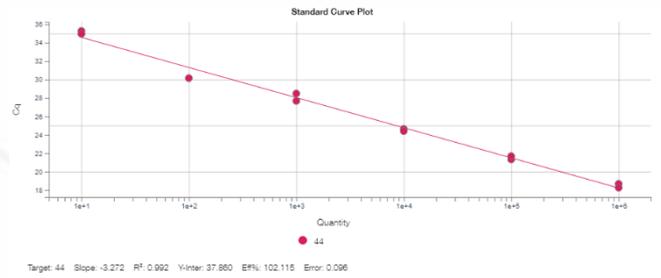
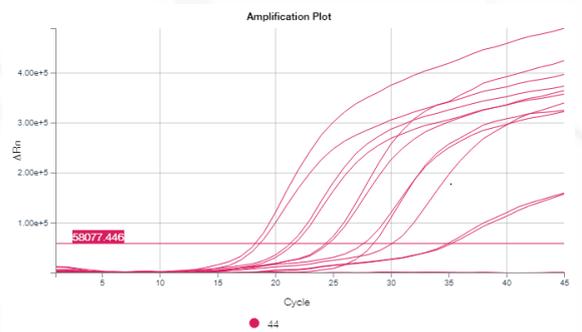
Foi estabelecido que o kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO tem um limite de detecção de 10 cópias/reação para os genótipos HPV 6, HPV 11, HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 44, HPV 55, HPV 61, HPV 62, HPV 67, HPV 69, HPV 70, HPV 71, HPV 72 e HPV 81 (Figura 2).

A eficácia na amplificação do alvo escolhido como também do R^2 e a inclinação da linha obtida é mostrada na Tabela 8.

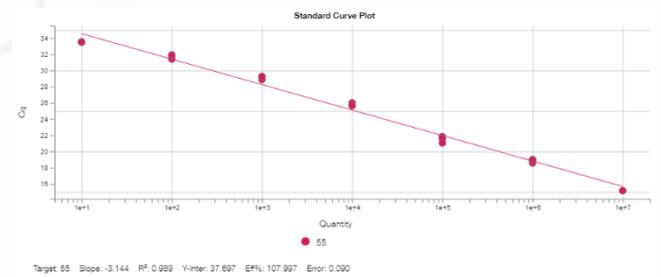
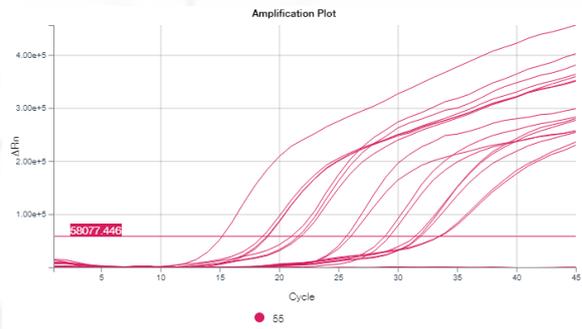




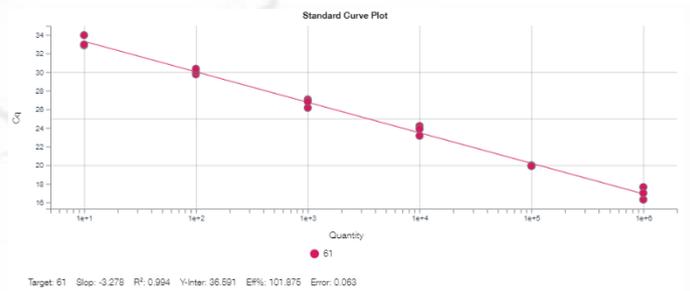
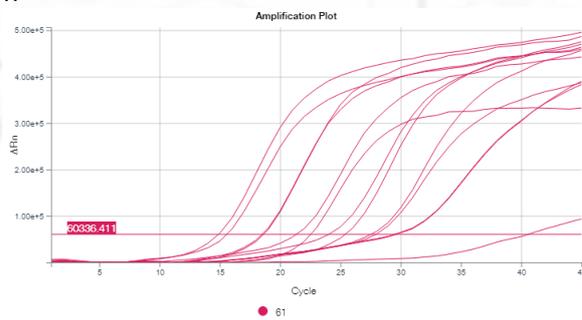
F

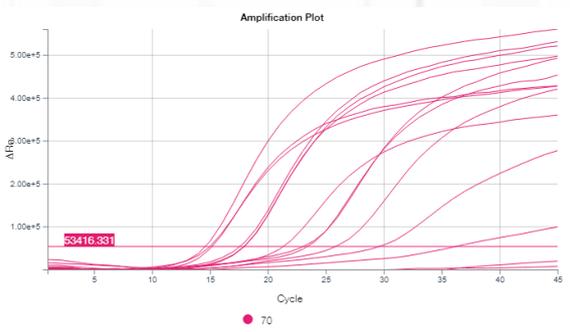
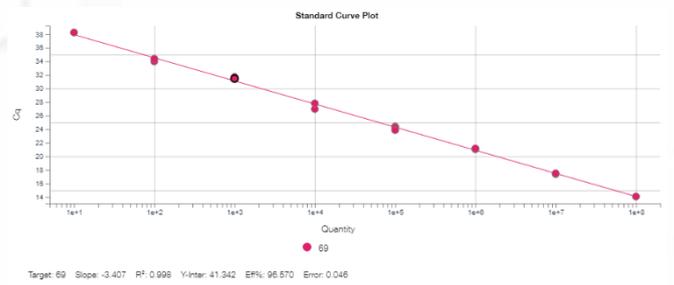
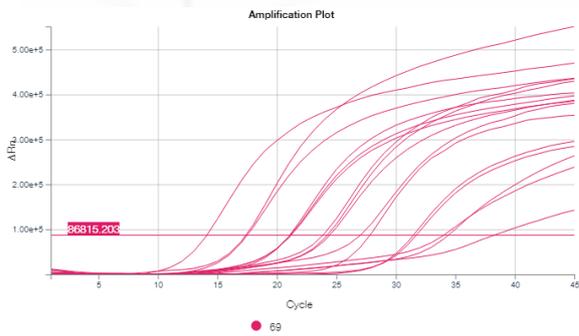
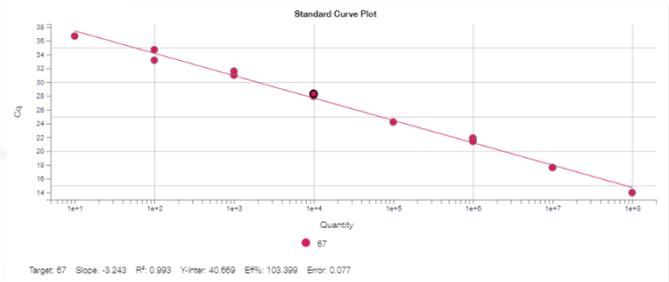
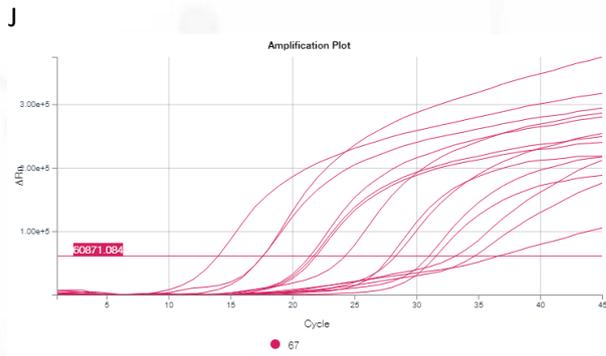
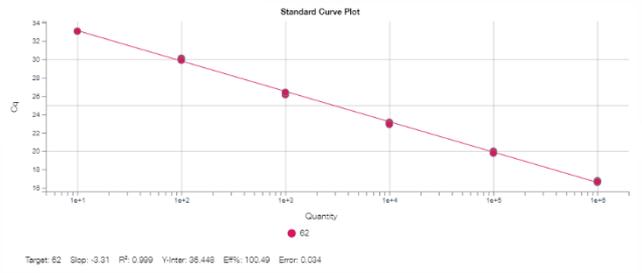
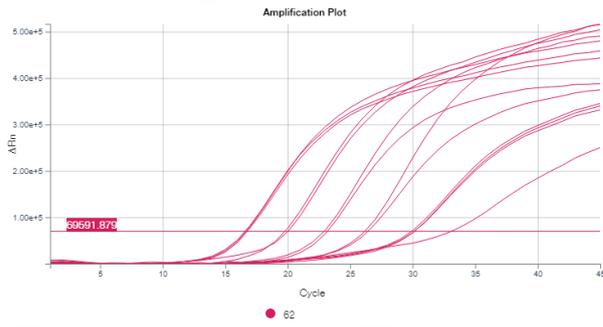


G.



h





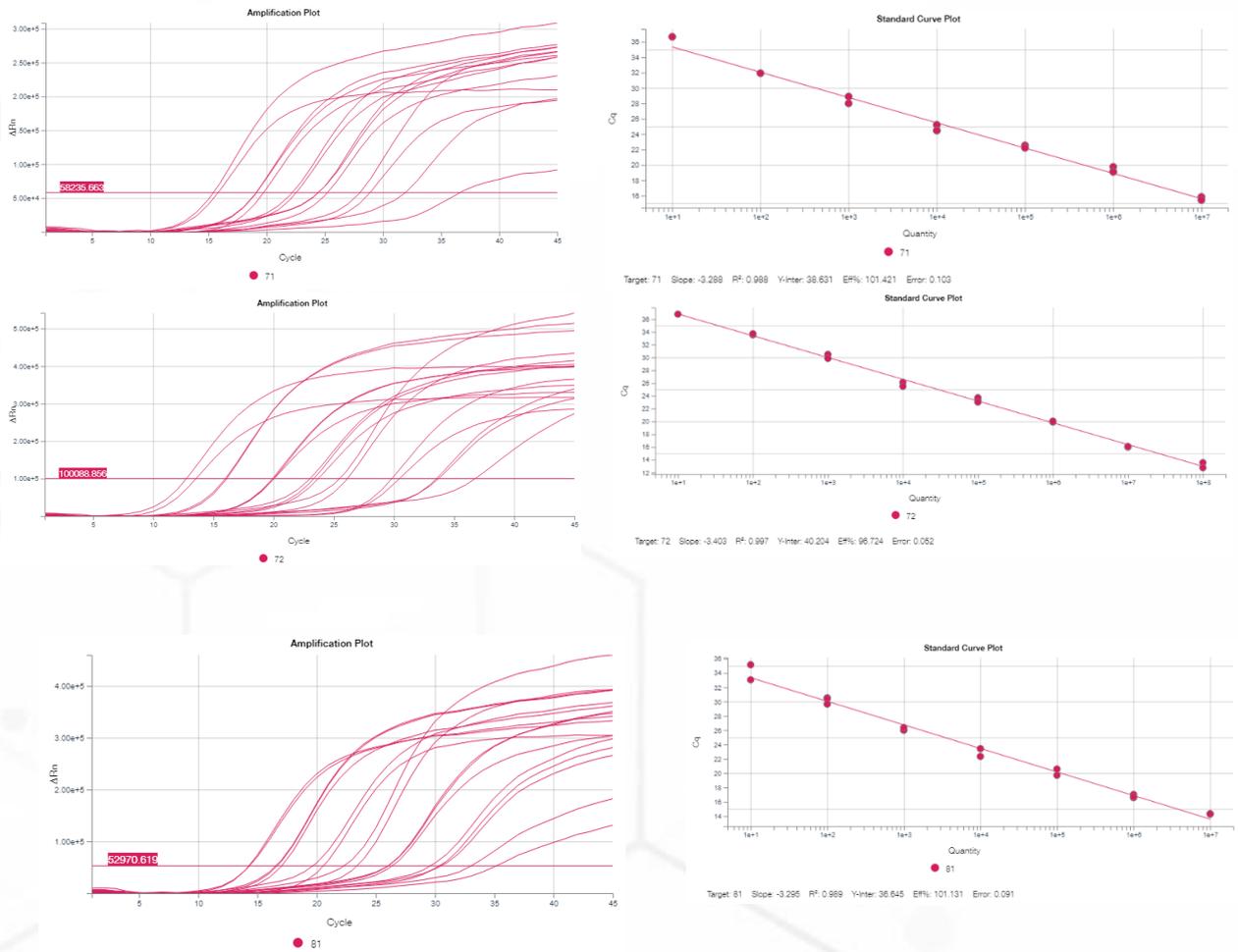


Figura 2: Esquerda: Diluições em série de 10^9 cópias/reação para 10 cópias/reação de fragmentos sintéticos de HPV6 no canal ROX (A), HPV 11 no canal Cy5 (B) e HPV 40 (C), HPV 42 (D), HPV 43 (E), HPV 44 (F), HPV 55 (G), HPV 61 (H), HPV 62 (I), HPV 67 (J), HPV 69 (K), HPV 70 (L), HPV 71 (M), HPV 72 (N) e HPV 81 (O) no canal FAM. Direita: Linhas de calibração obtidas para cada alvo. Experimento realizado no Sistema de PCR em Tempo Real QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems).

HPV genótipo	Eficácia	R ²	Slope
HPV6	99,2%	0,994	-3.341
HPV11	103,9%	0,994	-3.232
HPV 40	88,6%	0,998	-3.629
HPV 42	98,3%	0,980	-3.361
HPV 43	87,8%	0,992	-3.652
HPV44	102,15%	0,992	-3.272
HPV55	107,9%	0,989	-3.144
HPV61	101,87%	0,994	-3.278
HPV62	100,4%	0,999	-3,31
HPV 67	103,3%	0,993	-3.243
HPV 69	96,5%	0,998	-3.407
HPV 70	105,2%	0,976	-3.203
HPV 71	101,4%	0,988	-3.288

HPV 72	96,7%	0,997	-3.403
HPV 81	101,1%	0,989	-3.295

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

12.2 Especificidade

A especificidade do kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO foi confirmada testando amostras clínicas positivas para outros patógenos relacionados a infecções 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	Resultados
<i>Candida albicans</i>	Negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecium</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
Genótipo do HPV HR 26	Negativo
Genótipo do HPV HR 53	Negativo
Genótipo do HPV HR 73	Negativo
Genótipo do HPV HR 82	Negativo
Genótipo do HPV HR 16	Negativo
Genótipo do HPV HR 18	Negativo
Genótipo do HPV HR 31	Negativo
Genótipo do HPV HR 33	Negativo
Genótipo do HPV HR 35	Negativo
Genótipo do HPV HR 39	Negativo
Genótipo do HPV HR 45	Negativo
Genótipo do HPV HR 51	Negativo
Genótipo do HPV HR 52	Negativo
Genótipo do HPV HR 56	Negativo
Genótipo do HPV HR 58	Negativo
Genótipo do HPV HR 59	Negativo
Genótipo do HPV HR 66	Negativo
Genótipo do HPV HR 68	Negativo
Genótipo do HPV LR 54	Negativo
Genótipo do HPV LR 84	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
<i>Mycoplasma hominis</i>	Negativo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negativo
Vírus Sincicial Respiratório-1	Negativo

Vírus Sincicial Respiratório-2	Negativo
--------------------------------	----------

Tabela 9. Microrganismos utilizados no teste de especificidade.

*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 XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO.

O kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO 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).

Para determinar o limite superior, foram testadas diluições seriadas de 10^9 cópias/reação a 10 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 QuantStudio™ Design and Analysis 2.4.3

Foi estabelecido que o kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO tem um intervalo de medição de 10^9 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 11; 10^8 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 67, HPV 69 e HPV 72; de 10^7 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 55, HPV 70, HPV 71 e HPV 81 e 10^6 cópias/reação a 10 cópias/reação para HPV 6, HPV 44, HPV 61 E HPV 62.

12.4 Precisão

12.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi analisada testando o método 10 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 ensaio foi realizado pelo mesmo operador, em um único local e utilizando o mesmo lote de reagentes e o mesmo equipamento. O equipamento utilizado foi o Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e os resultados foram analisados com versão v. 2.6.0 do software Design and Analysis (Applied Biosystems). A variabilidade entre os ensaios foi determinada a partir dos valores de Cts obtidos nas repetições e o coeficiente de variação (CV) foi calculado como um desvio padrão dividido pela média dos Cts, sendo 2,1% para HPV 6, 0,66% para HPV 11 e 0,37% para HPV BAIXO RISCO.

12.4.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi analisada simulando a variabilidade interlaboratorial, variando o operador, o equipamento utilizado no processo e os lotes da mix de PCR. Vinte e uma amostras de DNA purificadas com o "kit de extração de patógenos RNA/DNA (Robot Opentrons OT2)" (Vitro, ref. MAD-003955M) foram testadas usando o sistema de extração automática Opentrons OT2. Das 21 amostras, 19 foram positivas para qualquer um dos genótipos incluídos no kit e 2 amostras foram negativas.

A concordância foi calculada, obtendo um índice kappa de 1,00, erro padrão de 0 e um IC de 95% de 1.000-1.000, demonstrando uma força de concordância muito boa para o kit XGEN MASTER HPV BAIXO RISCO

Laboratório 2	Laboratório 1		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	19	0	19
Negativo	0	2	2
Total	19	2	21

Tabela 10. Teste de reprodutibilidade para os alvos incluídos no kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO.

12.5 Sensibilidade e especificidade clínica

O kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO foi validado a partir de DNA purificado por qualquer um dos métodos de extração acima mencionados. Para a validação clínica do kit, foi realizado um estudo comparativo utilizando o kit CE-IVD HPV Direct Flow Chip Kit (Vitro SA) como método de referência. O estudo comparativo consistiu na análise retrospectiva de um total de 255 amostras clínicas do Hospital Universitário San Cecilio de Granada e do Hospital Universitário Virgen del Rocío de Sevilla. Para determinar a capacidade de detecção do kit, calculou-se o índice Kappa e a concordância entre os dois métodos.

O índice kappa é uma estatística que indica a concordância entre dados qualitativos. Um valor kappa de 1 indica que os resultados obtidos por dois métodos concordam 100%, enquanto um valor de 0 indica que a concordância se deve ao acaso. A interpretação dos valores kappa está demonstrada abaixo:

Um valor kappa <0,2 indica força de concordância fraca.

Um valor kappa entre 0,2 e 0,4 indica força de concordância fraca.

Um valor kappa entre 0,4 e 0,6 indica força moderada de concordância.

Um valor kappa entre 0,6 e 0,8 indica uma boa força de concordância.

Um valor kappa entre 0,8 e 1 indica uma força de concordância muito boa.

Além do valor da estatística Kappa, deve-se avaliar o intervalo de confiança de 95%. Se o limite inferior for superior a 70%, então a concordância entre os dois métodos é substancial.

Os resultados do estudo de validação clínica do kit e os valores do índice kappa obtidos a partir da análise dos casos clínicos indicados acima são apresentados nas tabelas a seguir.

KIT XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO		Kit HPV FLOW CHIP (alvos/resultados)						SOMA Amostras	Amostras TOTAIS
		HPV 6		HPV 11		HPV BR			
Alvos	Resultados	PDV	NEG	PDV	NEG	PDV	NEG		
HPV6	PDV	49	1	-	-	-	-	50	255
	NEG	1	204	-	-	-	-	205	
HPV11	PDV	-	-	8	0	-	-	8*	255
	NEG	-	-	0	247	-	-	247	
HPV LR	PDV	-	-	-	-	102	0	102	255
	NEG	-	-	-	-	15	138	153	
SOMA		50	205	8	247	117	238		
AMOSTRAS TOTAIS		255		255		255			

Tabela 11. Resultados do ensaio comparativo do kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO com o kit HPV Direct Flow Chip em amostras clínicas.

* Como se pode observar, o número de positivos obtidos no estudo do alvo do HPV 11 é baixo, sendo 8 amostras positivas de um total de 255. Não foram detectados mais casos devido à baixa prevalência deste genótipo na população estudo. Além disso, este fato foi previamente observado e publicado no artigo "Prevalência e Distribuição Genotípica da Infecção pelo Papilomavírus Humano do Colo do Útero na Espanha: O Estudo CLEOPATRE" (Castellsagué et al. 2012) no qual foram detectados 13 positivas em 606 amostras.

Genótipo do HPV	ÍNDICE KAPPA	ERRO PADRÃO	CI de 95%	FORÇA DO ACORDO
-----------------	--------------	-------------	-----------	-----------------

HPV6	0,975	0,018	0,941-1,009	Muito boa
HPV11	1	0	1-1	Muito boa
HPV LR	0,88	0,030	0,882-0,939	Muito boa

Tabela 12. Resultados do ensaio comparativo do KIT XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO com o kit HPV Direct Flow Chip em amostras clínicas.

A tabela a seguir mostra a distribuição dos genótipos de 102 amostras que foram positivas para um ou mais dos genótipos de HPV LR que são detectados, mas não discriminados, com o KIT XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO. O número total de amostras avaliadas foi de 255 amostras para este estudo. A seguir, os resultados de cada genótipo são comparados com os resultados de outros estudos semelhantes, deixando clara a baixa prevalência destes.

GENÓTIPO DO HPV	Nº POSITIVO (Total=255) Kit XGEN HPV SCREENING BAIXO RISCO	NÚMERO DE POSITIVOS (Total=606) Castell sagué et al. 2012	NÚMERO DE POSITIVOS (Total=500) Donkoh et ai. 2022	NÚMERO DE POSITIVOS (Total=1523) Phoolcharoen et ai. 2017	NÚMERO DE POSITIVOS (Total=6010) Andújar et al. 2020
HPV 40	9	4	N / D	2	1
HPV 42	36	N / D	39	2	17
HPV 43	13	3	30	N / D	2
HPV44/55	25	HPV 44, 11 positivos HPV 55 N/A	3	N / D	9 da soma de HPV6, 55 e 81 são detectados
HPV61	18	N / D	N / D	11	10
HPV62/81	33	N / D	N / D	São detectados: -21 de HPV62 -3 de HPV81	São detectados: -11 HPV 62 -9 da soma de HPV6, 55, 81
HPV 67	10	N / D	N / D	N / D	2
HPV 69	2	16 positivos da soma de HPV69 e HPV71	N / D	0	1
HPV 70	12	7	N / D	N / D	11
HPV 71	2	16 positivos da soma de HPV69 e HPV71	N / D	11	1
HPV 72	10	N / D	N / D	23	2

Tabela 13. Comparação da distribuição de genótipos positivos de HPV BAIXO RISCO relatados em diferentes estudos.

13. RISCOS RESIDUAIS

N/A

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

N/A

15. REQUISITOS

Usuário profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

N/A

17. 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.
- A mix do HPV SCREENING BAIXO RISCO deve ser manipulada em gelo ou placa fria e protegida da luz. Uma vez inserida a amostra alvo e o controle positivo no MMix reconstituído é importante homogeneizar a mistura mediante pipetagem (aspirando e liberando a amostra de forma repetida) por volta de dez vezes.
- 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 XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO 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.

18. GARANTIA

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

GARANTIA

O produto **Kit XGEN MASTER HPV SCREENING BAIXO RISCO** é garantido pela Mobius contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

A garantia abrange defeitos de produção.

EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

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.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

FABRICANTE:

Vitro S.A.

Avda. del Conocimiento 100, Parque Tecnológico Ciencias de La Salud, Granada, 18016, Espanha

Tel: +34 958 271 449

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@mobiuslife.com.br Website: www.mobiuslife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA
80502070114