

INSTRUÇÕES DE USO XGEN MASTER HPV SCREENING

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

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O Kit **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 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 são 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
HPV AR	FAM
Beta-Globina	HEX/ JOE/VIC

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

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** deve ser transportado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}^*$. No entanto, além do transporte recomendado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, também é possível transportá-lo à temperatura de refrigeração ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $8\text{ }^{\circ}\text{C}$), desde que o período de trânsito não exceda no máximo dez dias. Em qualquer caso, o kit deve ser armazenado a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ após o recebimento.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O **XGEN MASTER 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 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 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 Real Time PCR 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 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* começando com 200µl de amostra clínica e eluindo em 100µl de tampão de eluição (para purificação com Opentrons comece com 92µl de amostra clínica e eluir em 60 µl de solução de eluição):

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

Tabela 2. Kits e instrumentos de extração usados para a purificação de DNA/RNA de amostras clínicas.

***Nota:** O sistema 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 (não utilize vortex). Depois de descongelado, centrifugue brevemente.
2. Misture em cada tubo de PCR os seguintes volumes para cada amostra:

Reagente	V/teste
HPV SCREENING 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 de triagem de HPV de controle de DNA positivo 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 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 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 DNase/ RNase	---	1 frasco (200 µl)
HPV SCREENING CP	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 3. Reagentes e concentrações das substâncias ativas fornecidas pelo kit XGEN MASTER HPV SCREENING.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

6.1 Reativos e materiais

- Luvas descartáveis.
- Ponteira de pipetas com filtro livre 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 cinco ciclos de congelamento-descongelamento. Se uma execução for realizada com um número baixo de amostras, recomenda-se a alíquota do reagente com antecedência.

A mistura 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 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, 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 instrumento para PCR em tempo real

No *software* do instrumento insira os diferentes alvos e canais de detecção para cada um deles. Configura 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:

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

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

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 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. No sistema de PCR em tempo real 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. 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	Sinal para os canais FAM, ROX, Cy5 e JOE*	O controle/reação está correto.
	Sem sinal para FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE	Problema na amplificação, repetir a análise.
Controle Negativo	Sinal para os canais FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou 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 ruído de fundo aumentado) (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 16 (ROX)
- 20±2 for HPV 18 (Cy5)
- 20±2 for HPV AR (FAM)
- 20±2 for Beta globina (VIC)

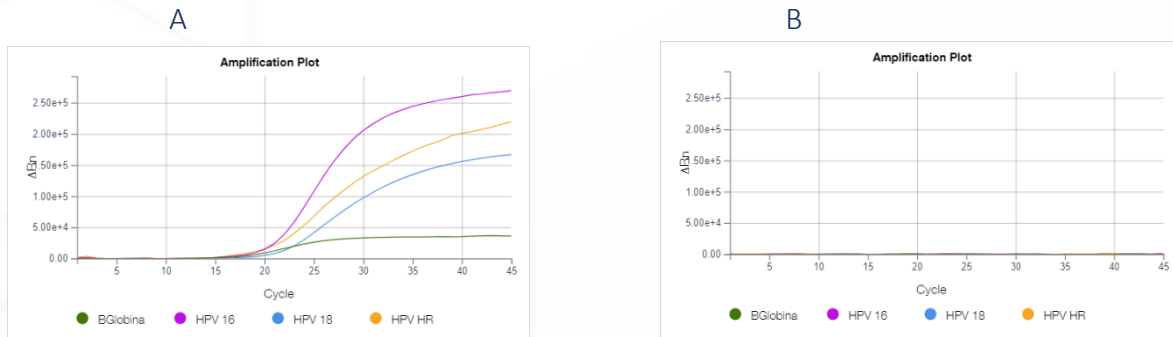


Figura 1: Gráficos de amplificação do controle positivo CP (A) e do controle negativo com água CN (B). (Valores Cts esperados para PC: HPV 16 (ROX) 20±2; HPV 18 (Cy5) 20±2; HPV AR (FAM) 20±2, Beta globina (JOE) 20±2. Experimento realizado no Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Sistema de PCR em tempo real. Se a corrida foi validada, interprete os resultados das amostras clínicas de acordo com a tabela a seguir:

Kit XGEN MASTER SCREENING				INTERPRETAÇÃO
HPV 16 (ROX)	HPV 18 (Cy5)	HPV AR (FAM)	Beta globina (VIC)	
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.

Tabela 6. Guia de interpretação 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 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.

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

1. Os resultados da prova devem ser avaliados por um profissional da saúde com o histórico médico do paciente, os sintomas clínicos e outras provas de diagnóstico.
2. Uso de amostras inadequadas: o método foi validado com base no material genético delas purificado. Os tipos de amostras clínicas validadas são: urina, sêmen, citologias em meio líquido; e *swabs* uretrais, endocervicais, anais e faríngeos. 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 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.
4. Um número baixo de cópias de destino 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 que outros patógenos estejam presentes na amostra clínica.
6. 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.
7. O resultado negativo do teste deve ser analisado de acordo o histórico médico do paciente e epidemiologia.

12. DESEMPENHO

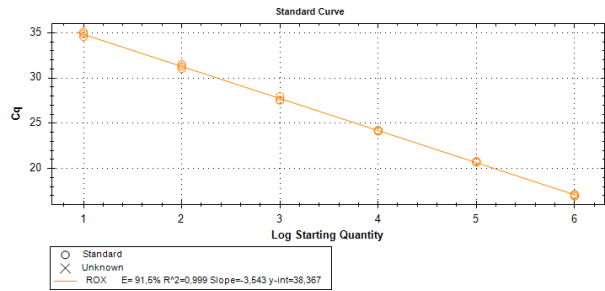
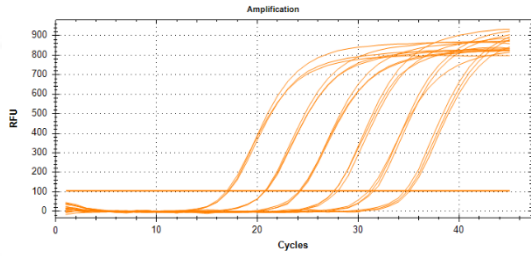
12.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit XGEN MASTER HPV SCREENING 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.

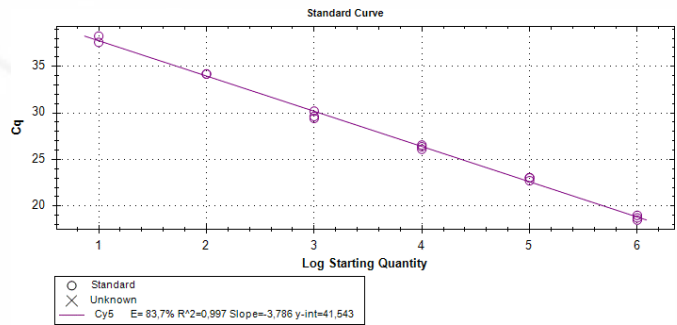
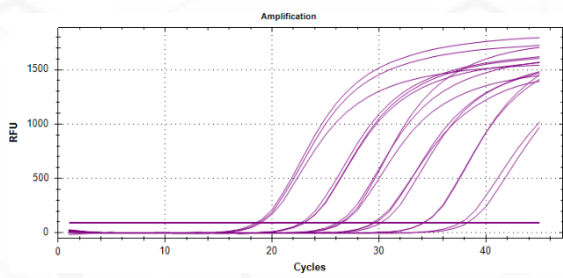
Foi estabelecido que o kit XGEN MASTER HPV SCREENING tem um limite de detecção de 10 cópias/reação para os genótipos HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66 e HPV 68 (Figura 2).

A eficácia na amplificação do alvo escolhido como também do R^2 e a inclinação da linha obtida é mostrada na Tabela 7.

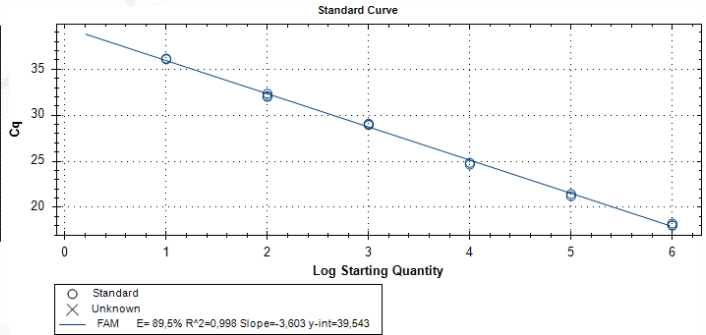
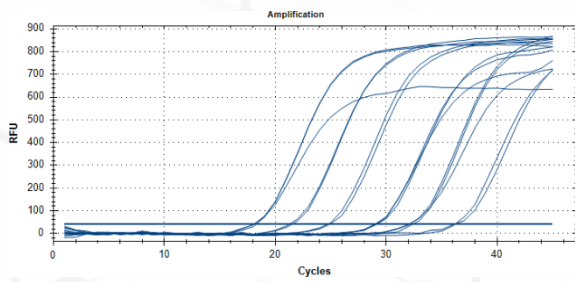
A



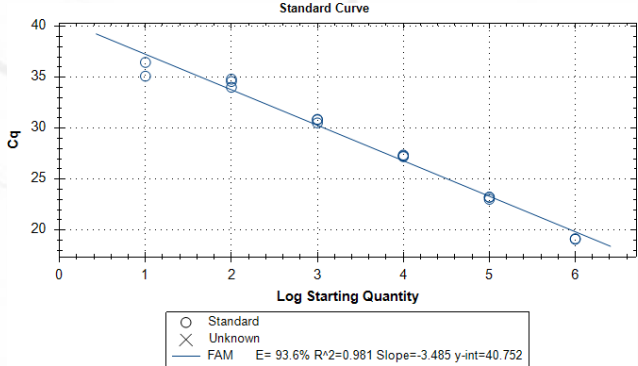
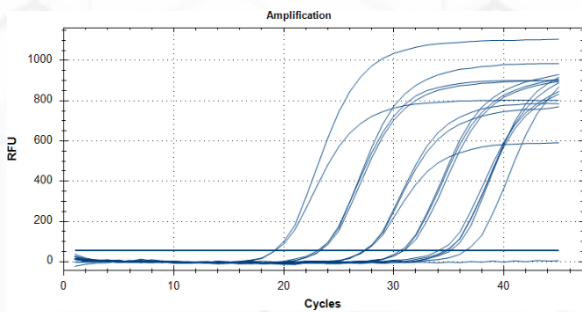
B



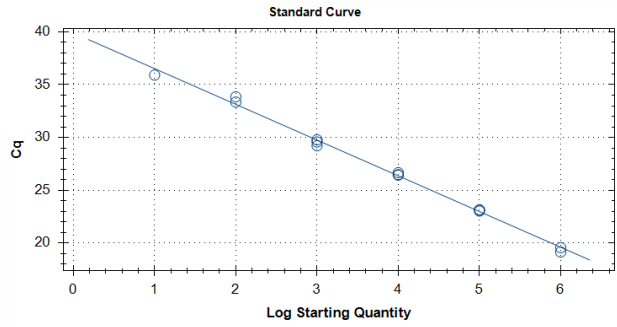
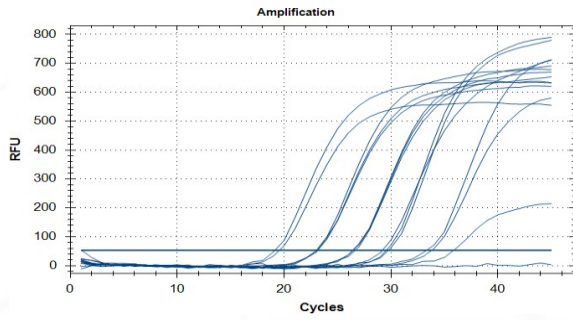
C



D

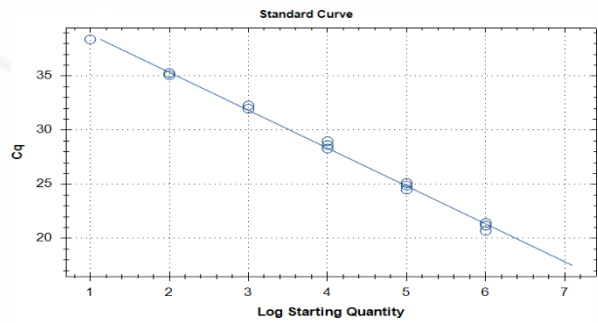
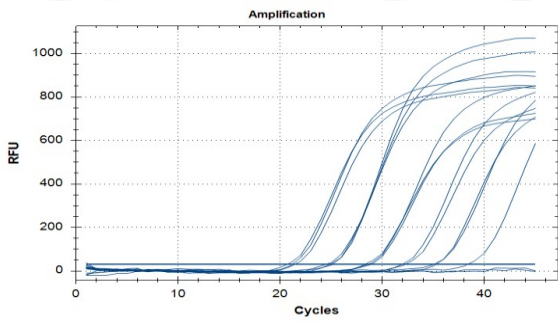


E



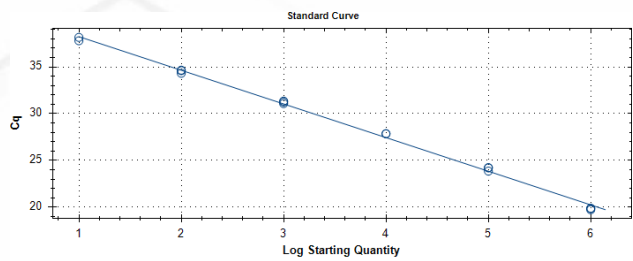
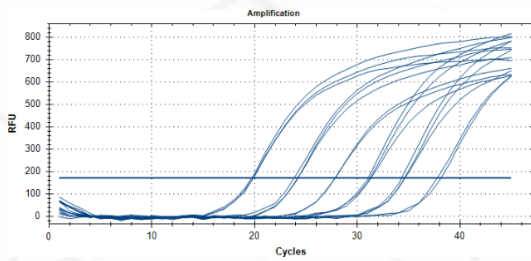
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 97,6% R²=0,995 Slope=-3,380 y-int=39,893

F



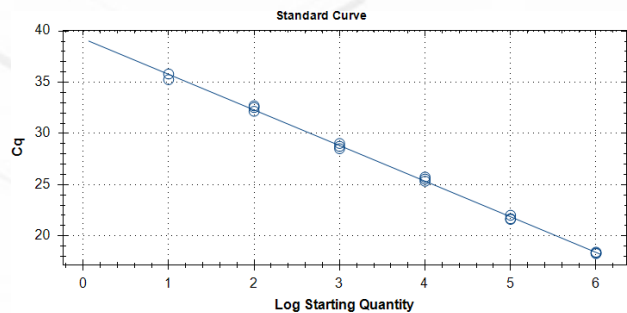
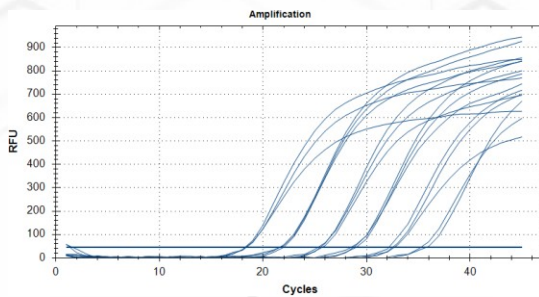
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 93,1% R²=0,996 Slope=-3,499 y-int=42,333

G



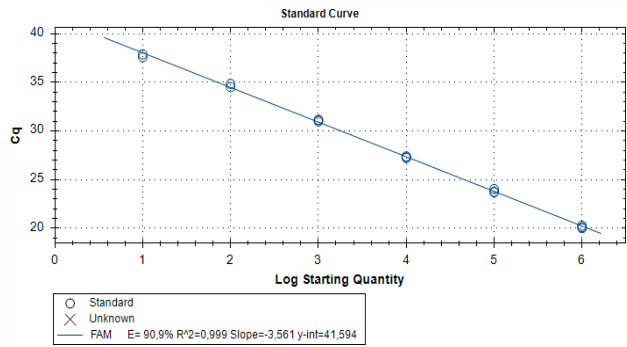
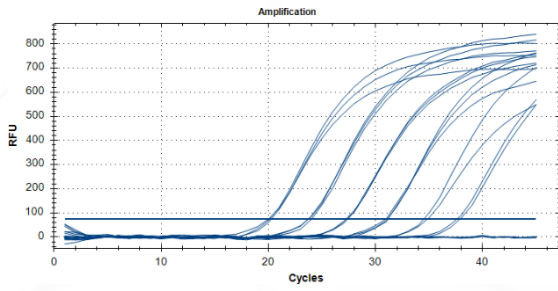
○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 88,6% R²=0,997 Slope=-3,600 y-int=41,845

H

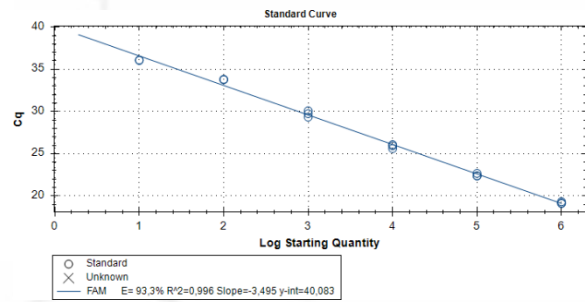
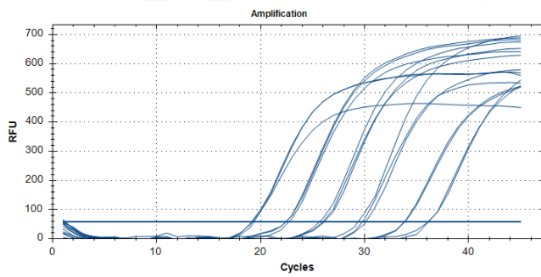


○ Standard
 × Unknown
 — FAM E= 93,9% R²=0,998 Slope=-3,477 y-int=39,253

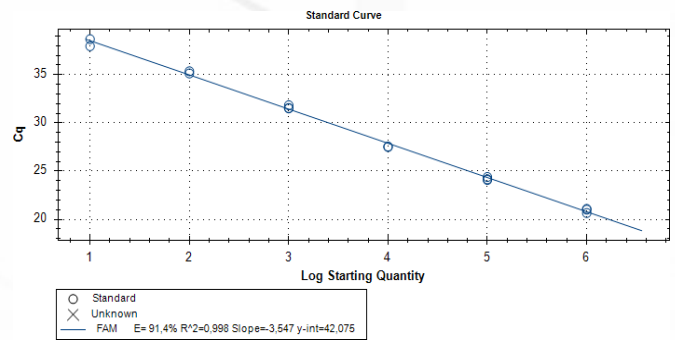
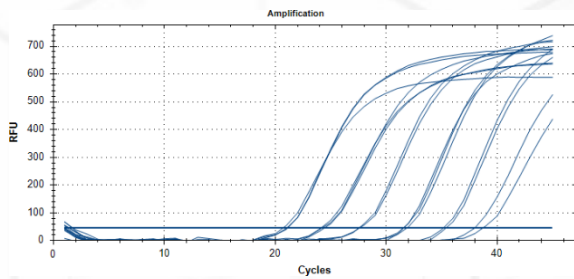
I



J



K



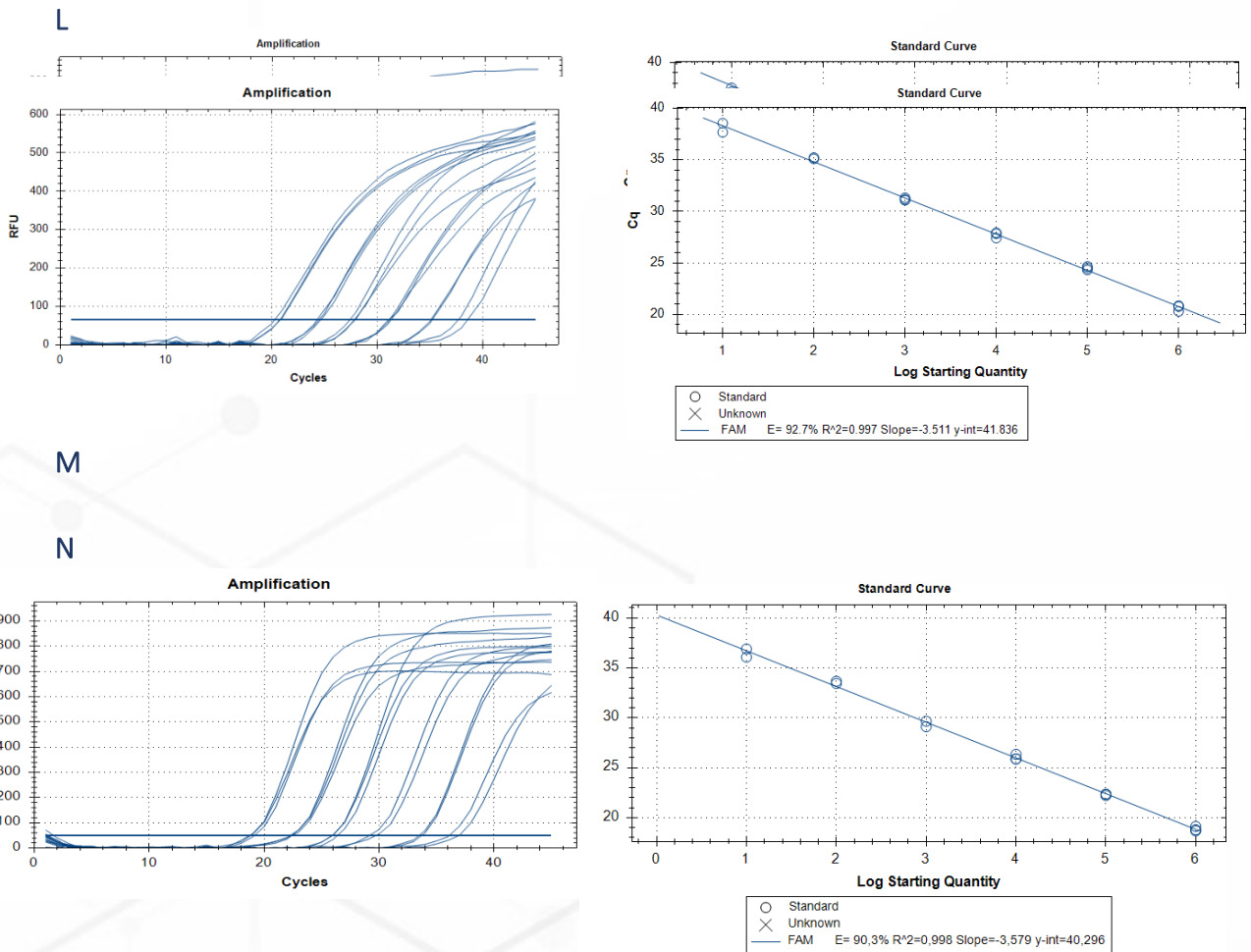


Figura 2: Esquerda: Diluições seriadas de 10^6 cópias/reacção para 10 cópias/reacção de fragmentos sintéticos de HPV 16 no canal ROX (A), HPV 18 no canal Cy5 (B) e HPV 31 (C), HPV 33 (D), HPV 35 (E), HPV 39 (F), HPV 45 (G), HPV 51 (H), HPV 52 (I), HPV 56 (J), HPV 58 (K), HPV 59 (L), HPV 66 (M) e HPV 68 (N) no canal FAM. Direita: 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	Slope
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 dos fragmentos sintéticos de cada alvo.

12.2 Especificidade

A especificidade do kit 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	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
HPV genótipo 26	Negativo
HPV genótipo 53	Negativo
HPV genótipo 73	Negativo
HPV genótipo 82	Negativo
HPV genótipo 11	Negativo
HPV genótipo 42	Negativo
HPV genótipo 43	Negativo
HPV genótipo 54	Negativo
HPV genótipo 6	Negativo
HPV genótipo 61	Negativo
HPV genótipo 62	Negativo
HPV genótipo 67	Negativo
HPV genótipo 70	Negativo
HPV genótipo 71	Negativo
HPV genótipo 72	Negativo
HPV genótipo 81	Negativo
HPV genótipo 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 Sincial Respiratório-1	Negativo
Vírus Sincial 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.

O kit 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 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 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 10^7 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 AR.

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, HPV 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 XGEN MASTER HPV SCREENING.

Laboratório 2	Laboratório 1		Total
	positivo	negativo	
positivo	24	0	24
negativo	0	16	16
Total	24	16	40

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

12.5 Sensibilidade e especificidade clínica

O kit 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 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 são os valores verdadeiros negativos (TN) e FP são os valores falsos positivos (FP).
- 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 são os valores verdadeiros positivos (VP) e FN são os valores falsos negativos (FN).

Um total de 1806 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). O kit de amplificação COBAS® HPV (Roche) foi usado como método de referência. A análise dos resultados discordantes foi realizada utilizando o kit HPV Direct Flow Chip (Vitro, S.A. Ref. MAD-003930M). 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 XGEN MASTER HPV SCREENING, bem como seu valor preditivo positivo e negativo. A tabela 13 mostra os resultados obtidos pela genotipagem através do kit HPV Direct Flow (Vitro, S.A. Ref. MAD-003930M).

Organismo	TN	FP	TP	FN	Especificidade Diagnóstica	CI 95%	Sensibilidade Diagnóstica	CI 95%
HPV 16	1582	0	233	1	100%	99.7 - 100%	99.5%	97,1- 100%
HPV 18	1740	0	66	0	100%	99.7 - 100%	100%	93,1 - 100%
HPV AR	1301	0	501	4	100%	99.6 - 100%	99.1%	97,8 - 99,56%

Tabela 11. Especificidade clínica e sensibilidade obtidas com kit XGEN MASTER HPV Screening.

Organismo	TN	FP	TP	FN	VPP	CI 95%	NPV	CI 95%
HPV 16	1582	0	233	1	100%	97,9 - 100%	99.94%	99,6 - 100%
HPV 18	1740	0	66	0	100%	93,1 - 100%	100%	99,7 - 100%
HPV AR	1301	0	501	4	100%	99,1 - 100%	99.69%	99,1 - 99%

Tabela 12. Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do kit XGEN MASTER HPV SCREENING.

Número de amostras genotipadas		592		
Genótipo HPV	TOTAL	Infecção única	COINFECÇÃO	
HPV AR	HPV 31	116	41	75
	HPV 33	53	22	31
	HPV 35	54	15	39
	HPV 39	59	17	42
	HPV 45	55	15	40
	HPV 51	85	18	67
	HPV 52	98	29	69
	HPV 56	78	21	57
	HPV 58	73	21	52
	HPV 59	53	21	32
	HPV 66	75	22	53
	HPV 68	51	14	37

Tabela 13. Quantitativo de amostras identificadas através do kit HPV Direct Flow (Vitro, S.A. Ref. MAD-003930M)

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 mistura do HPV SCREENING 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 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** 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.

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: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070110