

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MIX P210

KIT MIX PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CDNA DE BCR-ABL P210

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MIX p210 é destinado para a identificação e quantificação do transcrito p210 do gene quimérico BCR-ABL, normalizado com os transcritos do gene controle ABL, em RNA total extraído de amostras de sangue periférico e/ou de medula óssea e de suspensão de linfomonócitos e/ou leucócitos.

O kit foi otimizado para uso nos aparelhos de PCR em Tempo Real.

IMPORTANTE: Para a realização de uma análise quantitativa, o kit XGEN MIX p210 deve ser exclusivamente utilizado em associação com o produto kit XGEN PADRÃO p210. O produto deve ser utilizado seguindo as instruções dadas neste manual, em combinação com instrumentos e reagentes dentro da validade. Qualquer modificação anulará a responsabilidade da Mobius Life Science.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

1.1 INTRODUÇÃO

O cromossomo *Philadelphia* é uma alteração citogenética, que resulta de uma translocação recíproca de material genético entre os genes ABL no cromossomo 9 e o BCR no cromossomo 22, formando o gene quimérico BCR-ABL. Esta alteração está associada à Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

A variante p190 está normalmente associada às formas agudas de leucemias, entre elas a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA), já a variante p210 está associada às fases crônicas da leucemia, com a Leucemia Mielóide Crônica (LMC).

A análise molecular é indicada na fase de diagnóstico inicial e para o monitoramento da Doença Residual Mínima que define a percentagem de células neoplásicas que estão presentes no organismo afetado durante as diferentes fases do tratamento.

Devido à alta sensibilidade, técnicas de amplificação de ácidos nucleicos têm substituído as técnicas de citogenética para a identificação do cromossomo *Philadelphia*, variante 210.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN MIX p210 deve ser armazenado na embalagem original em temperatura controlada entre -25°C a -15°C e são estáveis até a data de vencimento indicada no rótulo.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O ensaio utiliza a metodologia de PCR em Tempo Real através do princípio de hidrólise de oligonucleotídeo corado com dois fluoróforos. A sonda específica marcada com o fluoróforo FAM como repórter e TAMRA como *quencher*, liga-se ao *amplicon* durante cada etapa de anelamento da PCR.

Quando a Taq-Polimerase se estende a partir do iniciador ligado ao *amplicon*, a extremidade 5' da sonda é deslocada, e em seguida degradada pela atividade da exonuclease 5'-3' da Taq-Polimerase. Este processo libera o fluoróforo e o *quencher* na solução, separando-os e

resultando no aumento da fluorescência do FAM e na diminuição do TAMRA. O processamento dos dados obtidos determina a presença e o título de cDNA de BCR-ABL p210 na amostra inicial, comparado à referência que é a quantidade de cDNA do ABL.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O RNA utilizado para o ensaio deve ser extraído de amostras de sangue periférico, de medula óssea e suspensão de linfo-monócitos e/ou leucócitos de origem humana.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

Amostras devem ser coletadas e processadas de acordo com as diretrizes de laboratório, transportadas entre 2 °C a 8 °C e armazenadas sob as mesmas condições por no máximo 4 horas. Quando o material de partida é o sangue periférico, é aconselhável separar os linfo-monócitos, de acordo com as diretrizes do laboratório.

4.3 MANUSEIO

Para utilização do kit com outras amostras deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

Para preparação do RNA são recomendados os seguintes procedimentos:

- Extração manual (TRIzol reagente ou similar);
- Extração de RNA por coluna;
- Extração semi-automatizada.

1. A quantidade ótima de leucócitos para extração de RNA total é de aproximadamente 10.000.000 células. Não congelar o sangue periférico a fim de prevenir a degradação do RNA.

2. A amostra de RNA total não deve conter heparina, hemoglobina ou Ficoll para evitar efeitos inibitórios na reação de amplificação.

3. Não existem dados disponíveis sobre possíveis efeitos inibitórios de antibióticos, drogas antivirais, drogas quimioterápicas ou imunossupressores.

4. A preparação do RNA de pacientes deve ser realizada através de protocolo validado pelo laboratório. A performance do ensaio depende em grande parte da qualidade do RNA inicial.

Recomenda-se verificar os parâmetros de qualidade e quantidade através de medição em espectrofotômetro a 260/280nm e eletroforese em gel de agarose antes de iniciar o procedimento.

IMPORTANTE: Para realização do ensaio o volume mínimo adequado de RNA é de 20 µL, com concentração entre 100 e 300ng/µL e a pureza em uma razão 260/280 nm variando entre 1,8 e 2,0. Em cada reação, 0,5 - 1,5 µg de RNA total são analisados. Caso haja uma concentração maior que 300ng/µL indica-se diluir a amostra de RNA de modo que 5 µL contenha no máximo 1,5 µg de RNA.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão do kit permite a realização de 24 determinações em duplicata de mRNA de BCR-ABL p210 e 24 determinações em duplicata de mRNA de ABL, contendo curvas e controles, com volume final de 25 µL.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE
MM BCR-ABL p210	Mistura para detecção do transcrito p210 do gene BCR-ABL	2 microtubos/530 µL
MM ABL p210	Mistura para detecção do transcrito do gene ABL	2 microtubos/530 µL
TR p210	Solução de Enzima MMLV	1 microtubos/34 µL
ÁGUA ULTRAPURA	Água Grau Molecular	1 microtubos/500 µL
GUIA RÁPIDO	Guia Rápido	1 unidade

5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

5.1.1 MM BCR-ABL p210

Solução pronta para uso. Descongelar a quantidade necessária, homogeneizar cuidadosamente por inversão e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo. Manter em gelo.

AVISO: O MM BCR-ABL p210 é sensível à luz, proteger de forte exposição.

5.1.2 MM ABL p210

Solução pronta para uso. Descongelar a quantidade necessária, homogeneizar cuidadosamente por inversão e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo. Manter em gelo.

AVISO: O MM ABL p210 é sensível à luz, proteger de forte exposição.

5.1.3 TR p210

Solução pronta para uso. Manter em gelo.

5.1.4 ÁGUA ULTRAPURA

Solução pronta para uso. Utilizar como Controle Negativo.

5.1.5 KIT XGEN PADRÃO p210

O procedimento requer o uso do kit XGEN PADRÃO p210 nas reações de amplificação do BCR-ABL p210 e ABL. A detecção do cDNA alvo durante a reação de amplificação em Tempo Real confirma a capacidade de identificar a presença de cDNA BCR-ABL p210 e ABL.

Para análises quantitativas, devem ser aplicados os quatro pontos de diluição da curva padrão do kit XGEN PADRÃO p210, para a quantificação do transcrito BCR-ABL p210 normalizada com o gene controle ABL.

Item não incluso no kit XGEN MIX p210.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ 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 $\pm 5\%$.

- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Racks para Tubos;
- ✓ Ponteiras Estéreis com Filtro;
- ✓ Microtubos Livres de Nuclease;
- ✓ Luvas Descartáveis Sem Talco;
- ✓ Kit XGEN PADRÃO p210;
- ✓ Cabine de fluxo laminar;
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor.

NOTA: O kit XGEN MIX p210 é direcionado para uso em combinação com os aparelhos de PCR em Tempo Real ABI 7300 e ABI 7500 (*Software Sequence Detection System® Applied Biosystems™*).

Para utilização do kit em outros equipamentos deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

Uma calibração válida dos filtros (*Pure Spectra Component File*) e do background (*Background Component File*) deve ser feita rotineiramente.

7. ESTABILIDADE EM USO

O kit permanecerá estável e manterá seu desempenho até a data de validade impressa no rótulo sob as condições de armazenamento corretas.

Recomenda-se realizar no máximo quatro ciclos de congelamento/descongelamento após o primeiro descongelamento dos reagentes. Caso sejam utilizados de forma intervalada, sugere-se que sejam realizadas alíquotas em tubos livres de RNase e DNase, de acordo com a necessidade.

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.
- 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, verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio está 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 ponteiros descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiros 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 nas áreas 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 que não haja a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.

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

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 Curva Padrão.

10.2 PREPARAÇÃO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

Para preparo das duas misturas de amplificação é necessário calcular o volume de acordo com o número de amostras a serem analisadas, utilizando como base a tabela a seguir:

COMPONENTE	NÚMERO DE REAÇÕES
	x 1
MM BCR-ABL p210 ou MM ABL p210	19,7 µL
TR p210	0,3 µL
VOLUME TOTAL	20 µL

- Separar um microtubo de 1,5 mL para preparar cada mistura de amplificação.
- Descongelar em gelo os reagentes MM BCR-ABL p210, MM ABL p210 e TR p210 para a reação. Homogeneizar por inversão e centrifugar brevemente (pulso).
- Pipetar a quantidade requerida dentro do microtubo, de acordo com a relação da quantidade dos outros reagentes. Trocar as ponteiros após cada passo de pipetagem.

10.3 PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

- Dispensar 20 µL da mistura de amplificação BCR-ABL p210 nos poços da microplaca, conforme gabarito de teste.
- Dispensar 20 µL da mistura de amplificação ABL nos poços da microplaca, conforme gabarito de teste.
- Com cuidado, depositar 5 µL de ÁGUA ULTRAPURA como controle negativo (CN) da reação de amplificação, em duplicata, nos poços com a mistura de amplificação ABL e BCR-ABL p210, conforme gabarito.
- Com cuidado, depositar 5 µL de RNA de cada amostra, em duplicata, e homogeneizar *up and down* nos poços com a mistura de amplificação BCR-ABL p210 utilizando o primeiro estágio da micropipeta, conforme gabarito.
- Com cuidado, depositar 5 µL de RNA de cada amostra, em duplicata, e homogeneizar *up and down* nos poços com a mistura de amplificação ABL utilizando o primeiro estágio da micropipeta, conforme gabarito.
- Com cuidado, depositar 5 µL do PADRÃO p210 10⁵, em duplicata, e homogeneizar *up and down* nos poços com a mistura de amplificação ABL e BCR-ABL p210, utilizando o primeiro estágio da micropipeta conforme gabarito. Proceder de forma igual para as outras soluções do PADRÃO p210 (10⁴, 10³ e 10²).
- Selar a microplaca.
- Centrifugar brevemente a microplaca a 2.000 rpm.
- Não deixar a microplaca preparada em temperatura ambiente por mais de 30 minutos e exposta à luz.
- Colocar a microplaca no termociclador de PCR em Tempo Real.
- Após configurar as operações descritas no subitem 10.4 PROGRAMAÇÃO DA PCR, iniciar a corrida no termociclador.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	P5	P4	P3	P2	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
B	P5	P4	P3	P2	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
C	P5	P4	P3	P2	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
D	P5	P4	P3	P2	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
E												
F												
G												
H												

Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e reagentes na placa de PCR

LEGENDA:

- P5: Padrão 100.000 (1x10⁵) cópias/µL
- P4: Padrão 10.000 (1x10⁴) cópias/µL
- P3: Padrão 1000 (1x10³) cópias/µL
- P2: Padrão 100 (1x10²) cópias/µL
- CN: Controle Negativo
- A1 - A7: Amostras

- **FUNDO AMARELO:** Mistura de Amplificação (MM BCR-ABL p210 + TR p210)
- **FUNDO ROXO:** Mistura de Amplificação (MM ABL p210 + TR p210)

10.4 PROGRAMAÇÃO DA PCR

A programação deve ser feita conforme descrito abaixo.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Hold</i>	50 °C	10 min	1
<i>Hold</i>	95 °C	5 min	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	20 s	50
	60 °C (*)	1 min	

AVISO: Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

10.5 SELEÇÃO DE DETECTORES

Selecionar os detectores informados na tabela abaixo, conforme o manual de instrução do equipamento a ser utilizado.

DETECÇÃO	REPORTER	QUENCHER
BCR-ABL p210	FAM	TAMRA
ABL	FAM	TAMRA

IMPORTANTE: Configurar ROX como referência passiva.

10.6 CONFIGURAÇÕES PRÉ-ANÁLISE

É necessária a realização de ajuste de configuração para avaliação dos parâmetros de validação da corrida. Recomenda-se definir os valores de limite (*threshold*) e *baseline* para o canal (alvo), seguindo os valores de acordo com as informações abaixo.

ABI™ SDS 7300 e ABI™ SDS 7500	
THRESHOLD	0,15
BASELINE	Do ciclo 3 ao ciclo 15

10.7 VALIDAÇÃO DA CORRIDA

O valor de fluorescência das quatro soluções padrões, obtidas com o BCR-ABL p210 e ABL são utilizadas para calcular as Curvas Padrão da sessão de amplificação, validar a amplificação e detectar as reações através da análise de regressão linear.

Os valores de *SLOPE* e R^2 das Curvas Padrão devem ser verificados, a fim de garantir a qualidade da execução, e devem estar de acordo com a tabela abaixo.

CRITÉRIO	FAIXA DE ACEITE
SLOPE	$-3,0 \geq \text{SLOPE} \geq -3,9$
R²	$0,990 \leq R^2 \leq 1,000^*$

NOTA: Se o valor de R^2 não estiver dentro dos limites indicados, um problema poder ter ocorrido durante a fase de amplificação ou de detecção gerando resultados menos precisos. Verificar o item 16 para identificar o problema.

*Um $R^2 > 0,98$ ainda é aceitável para obtenção de resultados precisos.

Os valores de fluorescência obtidos na reação de amplificação de controle negativo são usados para validar a amplificação e detecção de reações. Dessa forma, para o teste ser válido as amplificações devem ser negativas.

Se o resultado da reação de amplificação do controle negativo for diferente de "Ct INDETERMINADO", significa que o DNA alvo foi detectado na reação de amplificação. Problemas durante a fase de amplificação (contaminação) podem causar resultados incorretos e falsos positivos. Ou seja, a corrida é inválida e deve ser repetida. Verificar o item 16 para identificar a solução para o problema.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica na reação de amplificação e o valor limiar de fluorescência são usados para detectar a presença do alvo através da determinação do Ct.

Quando o produto é utilizado para a pesquisa de BCR-ABL p210, os resultados para cada amostra são analisados conforme descrito abaixo.

BCR-ABL p210 (FAM)	ABL (FAM)	RESULTADO DO ENSAIO
Ct INDETERMINADO	Cópias < 10.000 ou indeterminado	INVÁLIDO
	Cópias > 10.000	VÁLIDO (NEGATIVO)
Ct DETERMINADO	Cópias < 10.000 ou indeterminado	VÁLIDO (POSITIVO)
	Cópias > 10.000	VÁLIDO (POSITIVO)

Se a reação de amplificação da amostra indica "Ct INDETERMINADO" para cDNA de p210 e "Cópias < 10.000 ou INDETERMINADO" para cDNA de ABL, o transcrito do gene alvo ABL não foi detectado de forma eficaz. Problemas durante a fase de amplificação, na fase de transcrição reversa ou na fase de extração podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e deve ser repetido começando com a extração de uma nova amostra.

Se a reação de amplificação da amostra indica "Ct INDETERMINADO" para cDNA de p210 e "Cópias > 10.000" para cDNA de ABL, o transcrito alvo do gene ABL foi detectado de forma eficaz, enquanto não houve detecção do transcrito alvo do gene BCR-ABL.

Não é possível excluir a presença de cDNA de p210 em casos de quantidade inferior ao limite de detecção do produto. Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e outros testes de laboratório realizados no paciente.

Se o cDNA de p210 é detectado enquanto a amplificação do cDNA de ABL indica "Cópias < 10.000" ou "Ct INDETERMINADO", isto significa que a amostra ainda é adequada em termos de qualidade e o resultado positivo do ensaio é válido. Neste caso, no entanto, não é possível utilizar os dados para a análise quantitativa dos resultados.

10.8 QUANTIFICAÇÃO

Os valores obtidos com a sonda específica BCR-ABL p210 e ABL são usados para calcular a quantidade de cDNA alvo presente na reação de amplificação de cada amostra.

O kit XGEN MIX p210 é capaz de quantificar de 5 a 1.000.000 de cópias de cDNA de BCR-ABL p210 por reação de amplificação. Para o limite superior da faixa de medição linear para ABL

foi fixado 1.000.000 moléculas/5 µL e para o limite inferior da faixa de medição linear para ABL foi fixado 10.000 moléculas/5 µL. Esses valores representam os limites máximo/mínimos úteis para medições quantitativas. No entanto, para a análise quantitativa dos resultados obtidos, é necessário verificar as diretrizes vigentes adotadas pelo laboratório.

IMPORTANTE: Para expressar os dados da quantificação final de BCR-ABL p210 na Escala Internacional (IS) é necessária a utilização do Fator de Conversão (FC). Esse deve ser obtido com o uso do kit XGEN RNA REFERÊNCIA/p210, através da avaliação de desempenho do ensaio quantitativo para detecção do transcrito do gene BCR-ABL p210, normalizado com os transcritos do gene controle (ABL).

RESULTADO DA AMOSTRA (FAM p210)	cDNA BCR-ABL p210 POR REAÇÃO
Quantidade > 1 x 10 ⁶	Mais que 1.000.000 de cópias
5 ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	QUANTIFICAÇÃO
Quantidade < 5	Menos que 5 cópias

Quando o produto é utilizado para monitorar a taxa de p210, os resultados quantitativos são utilizados para calcular o número de cópias de cDNA de BCR-ABL p210, normalizada com o número total de cópias de cDNA de ABL, de acordo com a fórmula abaixo:

$$p210\% = \frac{\text{Quantidade média de BCR - ABL p210}}{\text{Quantidade média de ABL}} \times 100$$

Antes de calcular o p210% é necessário analisar os dados obtidos nas duplicatas de acordo com a tabela abaixo.

AMOSTRA	CONFORMIDADE DA AMOSTRA	cDNA DE p210	QUANTIDADE DE cDNA de BCR-ABL p210	QUANTIDADE DE cDNA de ABL
1ª REPLICATA	ADEQUADA	PRESENTE	Quantidade Média de BCR-ABL p210	Quantidade Média de ABL
2ª REPLICATA	ADEQUADA	PRESENTE		
1ª REPLICATA	ADEQUADA	NÃO DETECTADO	0	Quantidade Média de ABL
2ª REPLICATA	ADEQUADA	NÃO DETECTADO		
1ª REPLICATA	ADEQUADA	PRESENTE (< 3 cópias)	3 cópias de p210*	Quantidade Média de ABL
2ª REPLICATA	ADEQUADA	NÃO DETECTADO		
1ª REPLICATA	ADEQUADA	PRESENTE (> 3 cópias)	Quantidade de p210	Quantidade Média de ABL
2ª REPLICATA	ADEQUADA	NÃO DETECTADO		
1ª REPLICATA	NÃO ADEQUADA	PRESENTE/NÃO DETECTADO	RETESTAR A AMOSTRA	
2ª REPLICATA	ADEQUADA	PRESENTE/NÃO DETECTADO		
1ª REPLICATA	NÃO ADEQUADA	PRESENTE/NÃO DETECTADO	RETESTAR A AMOSTRA	
2ª REPLICATA	NÃO ADEQUADA	PRESENTE/NÃO DETECTADO		

*Se o número de cópias P210 for <3, mas ainda estiver presente, os valores de 3 devem ser usados para o cálculo da relação p210/ABL

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 resultados obtidos com o kit XGEN MIX p210 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

A sensibilidade analítica é a capacidade de um método analítico obter resultados positivos frente a resultados positivos obtidos pelo método de referência, até a menor quantidade do analito que pode ser mensurada. O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de cópias do alvo que pode ser detectada pelo sistema de ensaio com uma probabilidade de 95%. A sensibilidade do kit XGEN MIX p210 para cada um dos alvos está na tabela abaixo.

CRITÉRIO	RESULTADO
Limite de detecção (LOD)	5 cópias / 5 µL DNA plasmídeo
Limite máximo de quantificação	1.000.000 cópias cDNA DE p210/reação e 1.000.000 cópias cDNA DE ABL/reação
Limite mínimo de quantificação	5 cópias cDNA DE p210/reação e ~1000 cópias cDNA DE ABL/reação

12.2 ESPECIFICIDADE

Já a especificidade analítica é a capacidade de um método analítico de determinar somente o analito frente a outras substâncias presentes na amostra.

CRITÉRIO	RESULTADO
Especificidade	100%

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável

12.4 PRECISÃO

O ensaio de precisão foi realizado através do resultado de um mesmo analito medido diversas vezes sob mesmas condições operacionais (repetibilidade) e sob condições operacionais distintas (reprodutibilidade). O resultado pode ser visualizado através do coeficiente de variação (CV%). Assim, os resultados foram estabelecidos conforme tabela a seguir.

CRITÉRIO	RESULTADO
Repetibilidade	CV% < 5%
Reprodutibilidade	CV% < 5%

13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

15. REQUISITOS

Profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Os resultados obtidos com o kit XGEN MIX p210 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.

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
RESULTADO NEGATIVO PARA ABL E BCR-ABL NAS AMOSTRAS, PADRÕES VÁLIDOS	Baixa qualidade da amostra de RNA.	Sempre verificar a qualidade do RNA e concentração antes do uso.
	Falha no passo de Transcriptase Reversa.	Verificar esquema de pipetagem e o preparo da reação.
RESULTADO NEGATIVO PARA ABL NAS AMOSTRAS, PADRÕES VÁLIDOS	Baixa qualidade da amostra de RNA.	Sempre verificar a qualidade do RNA e concentração antes do uso.
	Falha no passo de Transcrição Reversa.	Verificar esquema de pipetagem e o preparo da reação.
	Erro de pipetagem ou exclusão de reagente.	
AUSÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO NOS PADRÕES	Erro de pipetagem.	Verificar esquema de pipetagem e o preparo da reação.
	Armazenamento inapropriado de componente.	Repetir a corrida de PCR. Aliquotar o reagente.
	Degradação do padrão.	Armazenar o kit entre -15°C a -25°C protegido da luz.

	Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.	Evitar congelamento e descongelamento repetitivo. Usar novas alíquotas do padrão. Comparar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
	Configuração incorreta da reação de PCR.	Conferir a calibração das micropipetas. Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o procedimento, se necessário.
CURVA PADRÃO NÃO-LINEAR ($R^2 < 0,98$)	Erro de pipetagem.	Verificar esquema de pipetagem e o preparo da reação.
	Armazenamento inadequado de componente.	Repetir a corrida de PCR.
	Degradação do padrão.	Armazenar o kit entre -15°C a -25°C protegido da luz. Evitar congelamento e descongelamento repetitivo.
PRESENÇA DE AMPLIFICAÇÃO NO CONTROLE NEGATIVO	Contaminação-cruzada.	Substituir todos os reagentes críticos. Repetir o experimento com novas alíquotas de todos os reagentes.
	Microplaca mal selada.	Sempre manusear amostras, componentes do kit e consumíveis de acordo com as práticas aceitáveis para prevenir contaminação por transferência.
	Degradação da sonda.	É recomendado realizar a pipetagem da Curva Padrão após todos os outros reagentes. Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas. Limpar superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lavar

		<p>jalecos de laboratório, substituir tubos de ensaio e ponteiros em uso.</p> <p>Tomar cuidado ao selar a microplaca.</p> <p>Armazenar o kit entre -15°C a -25°C protegido da luz.</p>
<p>AUSÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO, INCLUSIVE NOS PADRÕES</p>	<p>Detecção incorreta devido à escolha de canal incorreto.</p>	<p>Configurar canal correto.</p>
	<p>Erro de pipetagem ou exclusão de reagente.</p>	<p>Checar esquema de pipetagem e o preparo da reação.</p>
	<p>Degradação da sonda.</p>	<p>Usar novas alíquotas de Master Mix.</p>
	<p>Degradação do padrão.</p>	<p>Usar novas alíquotas do Padrão.</p>
<p>INTENSIDADE MUITO BAIXA DE FLUORESCÊNCIA</p>	<p>Armazenamento inapropriado de componentes do kit.</p>	<p>Aliquotar reagentes.</p> <p>Armazenar o kit entre -15°C a -25°C protegido da luz.</p> <p>Evitar congelamento e descongelamento repetitivo.</p>
	<p>Quantidade inicial muito baixa de RNA alvo</p>	<p>Sempre verificar a concentração de RNA antes do uso</p>

IMPORTANTE: A interpretação dos resultados deve ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório para reduzir o risco de erros e resultados mal interpretados. Quando os resultados do laboratório são transmitidos do laboratório para o centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erro na transferência de dados.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Não aplicável.

18. GARANTIA

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

O produto XGEN MIX p210 é garantido pela Mobius contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

18.1 EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

18.2 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 amostras não previstas na instrução de uso.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

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

80502070002