

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN PADRÃO P190

KIT PADRÃO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CDNA DE BCR-ABL P190

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN PADRÃO p190 é destinado para a utilização como controle positivo e como quantidade padrão de DNA para obter a curva padrão em ensaios quantitativos para identificação da presença de transcritos de BCR-ABL p190, normalizado com os transcritos do gene controle ABL.

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

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

IMPORTANTE: Para a realização de uma análise quantitativa, o kit XGEN PADRÃO p190 deve ser exclusivamente utilizado em associação com o produto kit XGEN MIX p190. 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.

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 p190.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN PADRÃO p190 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 produto fornece quatro soluções estabilizadoras de plasmídeo com título conhecido, abrangendo a região do cDNA originário do rearranjo BCR-ABL variante p190, que é amplificado pela reação p190 e pela reação controle ABL. Esta formulação garante resultados quantitativos exatos e precisos.

O procedimento requer o uso do kit XGEN PADRÃO p190 nas reações de amplificação do BCR/ABL p190 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 p190 e ABL e permite o cálculo da curva padrão para a quantificação do transcrito BCR-ABL p190 normalizada com o gene controle ABL.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

Verificar item 4.1 da IU do kit XGEN MIX p190.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

Verificar item 4.2 da IU do kit XGEN MIX p190.

4.3 MANUSEIO

Verificar item 4.3 da IU do kit XGEN MIX p190.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

Verificar item 4.4 da IU do kit XGEN MIX p190.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão do kit contém reagentes para 4 sessões de análises.

- Cada sessão envolve duas reações para BCR-ABL p190 e duas reações para ABL.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE
PADRÃO P190 10 ⁵	Solução de Plasmídeo 10 ⁵ cópias/reação	2 microtubos/45 µL
PADRÃO P190 10 ⁴	Solução de Plasmídeo 10 ⁴ cópias/reação	2 microtubos/45 µL
PADRÃO P190 10 ³	Solução de Plasmídeo 10 ³ cópias/reação	2 microtubos/45 µL
PADRÃO P190 10 ²	Solução de Plasmídeo 10 ² cópias/reação	2 microtubos/45 µL
GUIA RÁPIDO	Guia Rápido	1 unidade

5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

5.1.1 PADRÃO P190 - 10⁵ / 10⁴ / 10³ / 10²

Soluções prontas para uso. Descongelar as quantidades suficientes de cada uma das concentrações (10⁵, 10⁴, 10³, 10²), homogeneizar cuidadosamente por inversão e centrifugar brevemente (pulso) para obter todo o conteúdo no fundo do microtubo. Manter em gelo.

5.1.2 KIT XGEN MIX p190

Proceder conforme Instrução de Uso do produto.

Necessário adquirir separadamente.

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;
- ✓ Cabine de fluxo laminar.
- ✓ Kit XGEN Mix p190;
- ✓ 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 ponteiras descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiras após a manipulação de cada amostra.
 - O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, iniciando com o preparo dos reagentes (pré-PCR), passando para a extração de amostras (pré-PCR) e finalizando 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 CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO

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

10.2 PREPARO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

1. Adicionar 5 µL do PADRÃO P190 10⁵ à mistura de amplificação BCR/ABL p190, em duplicata.
2. Proceder de forma igual para as outras soluções do PADRÃO p190 (10⁴, 10³, 10²).
3. Adicionar 5 µL do PADRÃO P190 10⁵ à mistura de amplificação ABL, em duplicata.
4. Proceder de forma igual para as outras soluções do PADRÃO P190 (10⁴, 10³, 10²).
5. Para a preparação da mistura de amplificação e análise de dados, verificar a Instrução do Uso do produto kit XGEN MIX p190.

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 reproduzíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os resultados obtidos com o kit XGEN PADRÃO p190 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 PADRÃO P190 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 P190/reação e 1.000.000 cópias cDNA DE ABL/reação
Limite mínimo de quantificação	5 cópias cDNA DE P190/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

Usuário profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Verificar item 16 da IU do kit XGEN MIX p190.

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 PADRÃO p190 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@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070001