

Conjunto de primers e sondas para detecção multiplex de HPV
HPV-RNASEP-96 – 96 testes - RUO
Ficha de Instruções de Uso

1. Uso pretendido

O conjunto de primers e sondas de HPV-RNASEP-96 é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa do ácido nucléico dos subtipos do Papilomavírus Humano (HPV). O HPV é um vírus que pode infectar pele ou mucosas (oral, genital ou anal), tanto de homens quanto de mulheres, provocando verrugas anogenitais (região genital e no ânus) e neoplasia. A fim de verificar a presença do vírus, uma amostra de secreção do colo útero e vagina, no caso das mulheres deve ser coletada, também uma amostra de secreção anal ou bucal deverá ser coletada quando se quer verificar a presença deste nestes locais. Em homens a coleta pode ocorrer nas secreções da glândula, uretra ou pênis.

2. Características do Produto

Conjunto de *Primers* (*forward* e *reverse*) e sondas fluorescentes marcadas na extremidade 5' e NFQ (*non-fluorescent quencher*) na extremidade 3' para os subtipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). No Controle interno da reação, o conjunto apresenta *primers* e sonda marcada com o fluoróforo Cy5 para a RNaseP.

2.1. Composição do conjunto

Componentes	Conteúdo	Volume
CAIXA 1		
2X PCR Master Mix	3 frascos/tampa transparente	3,6 mL
<i>Primers/Probes</i> 1 (16, 31, 39, 68,52)	1 frasco/tampa âmbar	480 µL
<i>Primers/Probes</i> 2 (18,51, 56, 59, 66)	1 frasco/tampa âmbar	480 µL
<i>Primers/Probes</i> 3 (33,35,45, 58, RnaseP)	1 frasco/tampa âmbar	480 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	1 frasco/tampa transparente	58 µL
Água ultrapura	1 frasco/tampa transparente	700 µL
CAIXA 2		
Controle Positivo 1	1 frasco transparente/tampa vermelha	400 µL
Controle Positivo 2	1 frasco transparente/tampa vermelha	400 µL
Controle Positivo 3	1 frasco transparente/tampa vermelha	400 µL
Controle Negativo 1	1 frasco/tampa transparente	400 µL
Controle Negativo 2	1 frasco/tampa transparente	400 µL
Controle Negativo 3	1 frasco/tampa transparente	400 µL

Tabela 1 – Insumos fornecidos no conjunto da reação

2.2. Especificações

A presença de uma sequência específica do patógeno na reação de amplificação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, relatado como o valor de *threshold* de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real.

2.3. Equipamento necessário, mas não fornecido

Termociclador para PCR em tempo real.

Nota: Importante trabalhar com equipamentos em boa condição de uso e com as manutenções preventivas realizadas em dia.

3. Armazenamento e transporte

Os componentes fornecidos devem ser armazenados na embalagem original em temperatura controlada entre -15°C e -25°C (-20°C) e são estáveis até à data de vencimento indicada no rótulo. O produto é fornecido em embalagens com gelo seco que devem garantir uma temperatura de transporte abaixo de -20°C. Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser evitado o congelamento e o descongelamento excessivo dos reagentes, pois pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Recomenda-se realizar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

4. Validade

Validade de doze meses quando mantido armazenado corretamente.

5. Informação de Segurança

- Os insumos devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- O pessoal técnico deve ser treinado no uso dos termocicladores em Tempo Real, 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. O uso de objetos perfurocortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- Não trocar os componentes entre diferentes lotes de insumos. Recomenda-se que os componentes entre dois conjuntos de insumos do mesmo lote também não sejam trocados.
- Verificar se os reagentes estão limpos e não contém partículas visíveis pesadas ou grumos. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição dos insumos.
- Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após a aplicação de cada amostra.
- Evitar contaminação cruzada entre os reagentes utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as entre o uso.
- Não utilizar os insumos fornecidos após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor.
- Armazenar e extrair as amostras separadamente de outros reagentes e utilizar sala dedicada para o manuseio.
- Realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes no gelo ou em reservatório refrigerado.
- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, começando na área de extração e passando para a amplificação e área de análises de dados. Não retornar as amostras, equipamentos e reagentes para a área onde as primeiras etapas foram realizadas.
- O uso de plásticos descartáveis é recomendado na preparação dos componentes líquidos ou na transferência dos componentes para sistemas automatizados, a fim de evitar contaminação cruzada.

- Os resíduos gerados durante a utilização dos insumos fornecidos devem ser descartados, de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.
- Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.
- Outros resíduos gerados (exemplo: ponteiros usados para amostras) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.

6. Procedimento

6.1. Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)

- Preparar os *Mix* da reação, conforme a Tabela 2, 3 e 4, em tubo de 1,5 mL.
- Adicionar 20µL do *Mix* da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- Adicionar 5µL da amostra ao poço contendo os mix da reação.
- Adicionar 5µL dos Controles Positivos em um diferente poço contendo os mix da reação. O CP1 no mix 1, o CP2 no mix 2 e o CP3 no mix 3.
- Adicionar 5µL dos Controles Negativos em um diferente poço contendo os mix da reação. O CN1 no mix 1, o CN2 no mix 2 e o CN3 no mix 3.
- Homogeneizar com auxílio de uma pipeta.
- Levar ao equipamento para a leitura.

*Observação¹ - Todo o procedimento deve ser feito com os tubos em gelo.

*Observação² - Não deve ser ultrapassado 30 minutos entre o preparo da *mix* e o início da leitura da reação no equipamento.

	1 reação
2X qPCR <i>Master Mix</i>	12,5 µL
<i>Primers e Probes 1</i>	5,0 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA Polimerase	0,2 µL
Água	2,3 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2 – Preparo da Mix 1 de reação

	1 reação
2X qPCR <i>Master Mix</i>	12,5 µL
<i>Primers e Probes 2</i>	5,0 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA Polimerase	0,2 µL
Água	2,3 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 3 – Preparo do Mix 2 da reação

	1 reação
2X qPCR Master Mix	12,5 µL
Primers e Probes 3	5,0 µL
Enzima Taq DNA Polimerase	0,2 µL
Água	2,3 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 4 – Preparo do Mix 3 da reação.

6.2. Configuração do equipamento de PCR em tempo real

Definir os canais de fluorescência e programar o termociclador *real time*, de acordo com as instruções do fabricante.

O volume total da reação é de 25µL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas, conforme descrito na Tabela 5:

*Observação³ - desativar a opção “referência passiva” no equipamento.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	15 segundos	40
	56°C	30 segundos	
	68°C	30 segundos	

Tabela 5 – Programa de ciclagem

6.3. Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
MIX 1	
HPV 16	FAM
HPV 39, 68	HEX
HPV 31, 52	ROX
MIX 2	
HPV 51, 59, 66	FAM
HPV 18	HEX
HPV 56	ROX
MIX 3	
HPV 45, 58	FAM
HPV 33	HEX
HPV 35	ROX

RNaseP	Cy5
--------	-----

Tabela 6 – Canais de detecção

7. Análise dos resultados

- Limite de detecção: 1000 cópias/mL
- Sensibilidade para detecção de 1000 cópias/mL
- Especificidade: 95 % em relação a reatividade com outros patógenos

8. Interpretação dos resultados

8.1. As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para os alvos nos canais de fluorescência FAM, HEX e ROX com Ct igual ou abaixo de 37 serão consideradas positivas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **DETECTADO OU POSITIVO**.

8.2. As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para os alvos nos canais de fluorescência FAM, HEX e ROX e apresentarem um valor de Ct do controle endógeno (RNaseP) no canal de fluorescência CY5 entre 15 e 37, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**.

8.3. As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para os alvos nos canais de fluorescência FAM, HEX e ROX e **NÃO** apresentarem um valor de Ct do controle endógeno (RNaseP) no canal de fluorescência Cy5, serão consideradas inválidas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **INVÁLIDO**.

Alvo - Valor de Ct	Alvo - Valor de Ct	Resultado
HPV (FAM, HEX e ROX)	RNaseP (Cy5)	
≤37	Detectado ou não detectado	Positivo
Não detectado	≤37	Negativo
>37 CT <40	>37 CT <40	Inconclusivo*
Não detectado	Não detectado ou >37	Inválido**

Tabela 7 – Interpretação dos resultados

* O resultado do teste será considerado **INCONCLUSIVO**. A amostra deverá ser reextraída e amplificada, caso apresente o mesmo resultado, esta poderá ser liberada negativa ou solicitado uma nova coleta.

** O resultado do teste será considerado **INVÁLIDO** e o teste deverá ser repetido com uma nova amostra.

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos produtos por ela fornecidos 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.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

10. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA.

R. PASADENA, 235- PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20951

11. Atendimento ao Consumidor

Tel: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotechologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotechologia.com.br sac@novabiotechologia.com.br