

# BIO GENE

## HSV PCR

*Instrução de uso*  
*Instrucciones de uso*  
*Usage instructions*

---

**REF** K170

Revisão: Agosto/2016

# ÍNDICE

Finalidade .....	3
Princípio de Ação .....	3
Apresentação .....	3
Reagentes .....	4
Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
Condições de Armazenamento e Transporte .....	4
Cuidados Especiais .....	5
Amostras .....	6
Procedimento .....	6
A. Extração do DNA .....	6
B . Preparo dos Reagentes .....	6
C . Diluição do Padrão Quantitativo .....	7
D . Preparo da PCR .....	8
E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real .....	9
F . Validação do Resultado .....	10
G. Interpretação do Resultado .....	11
Limitações de Processo .....	11
Desempenho do Produto / Controle de Qualidade .....	11
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica .....	11
Repetibilidade .....	12
Reprodutibilidade .....	12
Sensibilidade Clínica .....	12
Sensibilidade Analítica .....	13
Significado Diagnóstico .....	13
Referências Bibliográficas .....	13
Atendimento ao Consumidor .....	13
Simbologia Universal .....	14

**FINALIDADE**

Teste para detecção quantitativa do DNA dos *Herpes Simplex Vírus* tipo 1 e 2 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

**PRINCÍPIO DE AÇÃO**

O kit **Bio Gene HSV PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA dos HSV 1 e 2 através da PCR em tempo real.

O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA patógeno.

Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração do HSV, expressa em cópias/ $\mu\text{L}$ , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit

Reagente	Apresentação
	50 Testes
<b>R1</b>	1 x 55 $\mu\text{L}$ *
<b>R2</b>	1 x 525 $\mu\text{L}$ *
<b>R3</b>	1 x 525 $\mu\text{L}$
<b>R4</b>	1 x 55 $\mu\text{L}$ *
<b>R5</b>	1 x 600 $\mu\text{L}$ *
<b>R6</b>	1 x 50 $\mu\text{L}$
<b>R7</b>	1 x 500 $\mu\text{L}$ *
<b>R8</b>	2 x 1,5 mL
<b>R9</b>	1 x 1 mL

\*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B (Preparo dos Reagentes).

**REAGENTES**

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.  
**R2. Mix Taq:** DNA Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>.  
**R3. Tampão Mix:** TRIS-HCl.  
**R4. Solução PCR CI:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.  
**R5. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl.  
**R6. Controle Negativo:** TRIS-HCl.  
**R7. Padrão A** (2 x 10<sup>5</sup> cópias/μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.  
**R8. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.  
**R9. Água:** Água livre de DNase/RNase.

**EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS****Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

**Materiais necessários, mas não contidos no kit:**

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador de PCR em Tempo Real).
- 2- Capela de fluxo laminar.
- 3- Tubos para reação de PCR ou placa de PCR.
- 4- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 5- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 6- Vórtex.
- 7- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 8- Kit para extração de ácidos nucleicos.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE**

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

**Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão.** Deve-se evitar o congelamento e descongelamento.

O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

**CUIDADOS ESPECIAIS**

- 1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.**
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.**
- 3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.**
- 4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucléicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucléicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.**
- 5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.**
- 6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.**
- 7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.**
- 8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.**
- 9- Não usar o kit após a data de validade.**
- 10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.**
- 11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.**
- 12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.**
- 13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.**

## AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de sangue total, líquido amniótico, swab genital/urinário ou esfregaço de lesões. Outros tipos de amostras podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas conforme descrito abaixo<sup>3</sup>:

Líquido amniótico - entre 2 e 8°C por 1 dia.

Demais amostras - entre 2 e 8°C por 3 dias.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

## PROCEDIMENTO

### A. *Extração do DNA*

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R5)** deve ser preparado e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R5)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.

2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

**Obs: Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.**

### B. *Preparo dos Reagentes*

1- Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.

2- Ressuspenda o reagente **Mix taq (R2)** com 525µL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

3- Ressuspenda os reagentes, **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)** e **Controle Interno (R5)** com o reagente **Água (R9)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagentes	Volume de Água (R9)
Solução PCR (R1)	55 µL
Solução PCR CI (R4)	55 µL
*Controle Interno (R5)	600 µL

\*Os reagentes R5 e R7 contêm molde de DNA. Eles devem ser manipulados (ressuspendidos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

### C. Diluição do Padrão Quantitativo

- 1- Ressuspender o **Padrão A (R7)** com 500 µL do **Diluyente (R8)**.
- 2- Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)**.
- 3- Pipetar 90µL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 4- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 6- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 7- No final da diluição temos padrões A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A –  $2 \times 10^5$  cópias/µL

Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/µL

Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/µL

Padrão D –  $2 \times 10^2$  cópias/µL

#### D. Preparo da PCR

- 1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, controles e padrões quantitativos a serem analisados.
- 2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1mL
Solução PCR (R1)	1 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Solução de PCR CI (R4)	1 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Água (R9)	3 $\mu$ L	75 $\mu$ L	150 $\mu$ L	300 $\mu$ L

Para o preparo de número de reação diferente deve se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3. Pipetar 15 $\mu$ L da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
- 4- Adicionar 5 $\mu$ L do DNA extraído das amostras ou dos Padrões Quantitativos ou do **Controle Negativo (R6)** nos tubos previamente determinados.
- 5- Homogeneizar bem.
- 6- Observe que o volume total da reação é de 20 $\mu$ L e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Interno e Padrões Quantitativos).
- 7- Transportar os tubos/placa para o termociclador e seguir o descrito na seção E (Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real).



### E. Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

#### 1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão.

#### 2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

	Detector	Quencher
HSV	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

**Obs:** O Controle Negativo e os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno, pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

#### 3- Defina os Padrões Quantitativos (standards) como:

Padrão A –  $2 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L

Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/ $\mu$ L

Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/ $\mu$ L

Padrão D –  $2 \times 10^2$  cópias/ $\mu$ L

#### 4- Defina as condições dos ciclos:

	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

## F. Validação do Resultado

### 1- Curva Padrão

Curva Padrão	Faixa Permitida	Amplificação / Detecção
Coeficiente de correlação ( $R^2$ )	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de  $R^2$  não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

### 2- Controle Negativo

CT Controle Negativo		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

### 3- Amostras

HSV		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

\*Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

**Exemplo:** Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

### **G. Interpretação do Resultado**

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

**Exemplo:** Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será  $2.0 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L.

<b>Resultado da Amostra em Cópias/<math>\mu</math>L (FAM)</b>	<b>Cópias por Reação</b>
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

### **LIMITAÇÕES DO PROCESSO**

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

### **DESEMPENHO DO PRODUTO CONTROLE DE QUALIDADE**

#### **Exatidão**

#### **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**

O kit **Bio Gene HSV PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA do Herpesvírus (1 e 2). Foram realizadas 25 análises e os resultados foram avaliados. A diferença entre os valores das amostras, obtidos nos dois produtos foi  $\leq 0,5$  log. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica

**Precisão****REPETIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas de 2 amostras positivas com concentrações distintas, os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>
<b>Concentração Média (Log)</b>	5,138	3,869
<b>Desvio Padrão (Log)</b>	0,054	0,048
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	1,068	1,248

**REPRODUTIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos com 1 amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
<b>Concentração Média (Log)</b>	3,869	3,912	3,878
<b>Desvio Padrão (Log)</b>	0,048	0,034	0,043
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	1,248	0,876	1,108

**Sensibilidade Clínica**

O kit **Bio Gene HSV PCR** apresentou sensibilidade clínica de 99,9%, e especificidade clínica de 99,9%.

<b>Método</b>		<b>Dados Clínicos</b>		<b>Total</b>
	<b>Resultado</b>	Positivo	Negativo	
<b>Bio Gene HSV PCR</b>	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
<b>RESULTADO TOTAL</b>		25	25	50

**Sensibilidade Analítica**

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 0,64 log, ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 4

moléculas alvo em 5µL do produto de extração do DNA adicionado a reação de amplificação.

### **SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO**

O *Vírus Herpes Simples* (HSV), pertencente à família *Herpesviridae*, causa lesões na pele e nas mucosas principalmente da face, mas pode infectar outras regiões do corpo, como a região genital. O HSV-1 frequentemente causa lesões nos lábios, no interior da boca e nos olhos, além disso, complicações neurológicas, como encefalite, também já foram relacionadas ao HSV-1, a transmissão ocorre por contato direto com a secreção infectada. O HSV-2 causa lesões, bolhas e prurido nos genitais, normalmente é transmitido sexualmente e via perinatal. A infecção cruzada dos HSV 1 e 2 pode acontecer se houver contato oral-genital.

A sintomatologia clínica da infecção primária é variada, mas em muitos pacientes a infecção é assintomática. O HSV pode permanecer no hospedeiro na forma latente após a infecção primária. A detecção dos herpesvirus (1 e 2) pela técnica de PCR, de acordo com a literatura, tem sido considerada uma das técnicas mais sensíveis, principalmente em doença neonatal. Logo, a detecção quantitativa dos HSVs por PCR real time tem grande importância por ser um método preciso e ágil.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Aldea, C; Alvarez, C.P; Folgueira, L, et al. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1060-2.
2. Chudzik, E; Karabin, K; Dzieciotkowski, T, et al. [Development of a novel real-time PCR method for detection of HSV types 1 and 2 DNA using HybProbe chemistry]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2010;62(3):255-62. Polish.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Kessler, H.H; Mühlbauer, G; Rinner, B, et al. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2638-42.

### **ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR**

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro do kit Bio Gene HSV PCR na ANVISA: 10269360243

## SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLÁMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO		MARCA CE
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA

**Bioclin ·· QUIBASA**

**BIO GENE**

**HSV PCR**

***Español . Instrucciones de uso***

---

**REF** K170

Revisión: Agosto/2016

# ÍNDICE

Finalidad .....	3
Principio de Acción .....	3
Presentación .....	3
Reactivos .....	4
Equipamientos e Insumos Operacionales .....	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte .....	4
Cuidados Especiales .....	5
Muestras .....	6
Procedimiento .....	6
A . Extracción de DNA .....	6
B . Preparo de los reactivos .....	6
C . Dilución de lo Patrón Cuantitativo .....	7
D . Preparo de la PCR .....	8
E . Definiciones del termociclador para la PCR en Tiempo Real .....	8
F . Validación de lo resultado .....	9
G . Interpretación de lo resultado .....	10
Limitaciones del Proceso .....	11
Desempeño del Producto / Control de Calidad .....	11
Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica .....	11
Repetibilidad .....	11
Reproductibilidad .....	12
Sensibilidad Clínica .....	12
Sensibilidad Analítica .....	12
Significado Diagnóstico .....	13
Referencias Bibliográficas .....	13
Asistencia al Consumidor .....	13
Simbología Universal .....	14



**FINALIDAD**

Test para detección cuantitativa del DNA de *Herpes Simplex Virus tipo 1 y 2* (HSV) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

**PRINCIPIO DE ACCIÓN**

El kit **Bio Gene HSV PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del DNA de HSV a través de la PCR en tiempo real.

El método de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar el DNA del patógeno.

Un termociclador de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar y detectar la sonda fluorescente. El software del aparato calcula la concentración del HSV, expresada en copias/ $\mu$ L, utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación
	50 pruebas
<b>R1</b>	1 x 55 $\mu$ L*
<b>R2</b>	1 x 525 $\mu$ L*
<b>R3</b>	1 x 525 $\mu$ L
<b>R4</b>	1 x 55 $\mu$ L*
<b>R5</b>	1 x 600 $\mu$ L*
<b>R6</b>	1 x 50 $\mu$ L
<b>R7</b>	1 x 500 $\mu$ L*
<b>R8</b>	2 x 1,5 mL
<b>R9</b>	1 x 1 mL

\*Reactivos liofilizados. Los volúmenes arriba descritos corresponden el volumen final después de la resuspensión de los reactivos como se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

**REACTIVOS**

- R1. Solución PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.  
**R2. Mix Taq:** DNA Polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>.  
**R3. Tapón Mix:** TRIS-HCl.  
**R4. Solución PCR CI:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.  
**R5. Control Interno:** Plásmido, TRIS-HCl.  
**R6. Control Negativo:** TRIS-HCl.  
**R7. Patrón A** (2 x 10<sup>5</sup> copias/μL): Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.  
**R8. Diluyente:** TRIS-HCl, EDTA.  
**R9. Agua:** Agua libre de DNase/RNase.

**EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES****Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucción de uso (manual).

**Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:**

- 1- Sistema óptico programable de detección de fluorescencia (Termociclador de PCR en Tiempo Real).
- 2- Cámara del flujo laminar.
- 3- Tubos para reacción de PCR o placa de PCR.
- 4- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 5- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 6- Vórtice.
- 7- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 8- Kit para extracción de ácidos nucleicos.

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE**

La temperatura de almacenamiento es de -20 (-10 a -30°C).

**Después de resuspensión de los reactivos liofilizados, el producto es estable por 6 meses a partir de la fecha de resuspensión.** Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento.

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 2 y 30°C. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

## **CUIDADOS ESPECIALES**

**1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.**

**2-** Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.

**3-** Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evite contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.

**4-** Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.

**5-** Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones y para la amplificación/detección de productos. Nunca introducir un producto de amplificación en el área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.

**6-** Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados debajo de una cámara de flujo laminar. Las pipetas deben ser usadas con punteras con filtro. Las punteras empleadas deben ser estériles, libres de DNases y RNAses.

**7-** Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos.

**8-** Almacenar las muestras de DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ , caso no fueran utilizadas inmediatamente.

**9-** No usar el kit después de la fecha de vencimiento.

**10-** Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

**11-** Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

**12-** No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

**13-** Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

## MUESTRAS

Este kit puede ser utilizado con muestras de DNA extraídas de sangre total, líquido amniótico hisopos uretrales / genital o de lesiones. Otros tipos de muestras pueden ser utilizados de acuerdo con las recomendaciones de médico o de laboratorio.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para tests moleculares y, transportadas y almacenadas como se describe a abajo:

Líquido Amniótico – entre 2-8 ° C durante 1 día.

Otras muestras - entre 2-8 ° C durante 3 días.

Utilizar muestras de DNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

## PROCEDIMIENTO

### A. Extracción de DNA

Los ácidos nucleicos (DNA) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit escogido. Para controlar el proceso de extracción, el **Control Interno (R5)** debe ser preparado y añadido a las muestras durante la extracción, como se describe a abajo:

1- Adicionar 4µL de **Control Interno (R5)** a cada tubo conteniendo las muestras ya resuspendidas en tapón de extracción / lisis.

2- Completar el proceso de extracción de acuerdo con las instrucciones de uso del kit de extracción.

**Obs: Nunca adicionar el Control Interno directamente a la muestra biológica pura, pues puede resultar en degradación del mismo.**

### B. Preparo de los Reactivos

1- Centrifugar (pulso *spin*) los reactivos: **Solución de PCR (R1)**, **Solución de PCR CI (R4)**, **Control Interno (R5)** y **Patrón A (R7)** antes de la abertura de los microtubos.

2- Resuspender el reactivo **Mix taq (R2)** con 525µL del reactivo **Tapón Mix (R3)**.

3- Resuspender los reactivos, **Solución de PCR (R1)**, **Solución de PCR CI (R4)** y **Control Interno (R5)** con el reactivo **Agua (R9)** de acuerdo con la tabla abajo:

Reactivo	Volumen de Agua (R9)
Solución PCR (R1)	55µL
Solución PCR CI (R4)	55µL
*Control Interno (R5)	600µL

\*Los reactivos R5 y R7 contienen molde de DNA. Ellos deben ser manipulados (resuspender) en área apropiada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

### C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo

1- Resuspender el **Patrón A (R7)** con 500 µL del **Diluyente (R8)**.

2- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R7)**.

3- Pipetar 90µL del **Diluyente (R8)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.

4- En seguida, pipetar 10µL del **Patrón A (R7)** en el microtubo B y homogenizar.

5- Cambiar la puntera y pipetar 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.

6- Cambiar la puntera y pipetar 10µL del microtubo C en el microtubo D y homogenizar.

7- Al final de la dilución tenemos patrones A, B, C y D con las siguientes concentraciones:

Patrón A –  $2 \times 10^5$  copias /µL

Patrón B –  $2 \times 10^4$  copias /µL

Patrón C –  $2 \times 10^3$  copias /µL

Patrón D –  $2 \times 10^2$  copias /µL

### D. Preparación de la PCR

1- Separar previamente los microtubos/pozos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras, controles y patrones cuantitativos a ser analizados.

2- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

Reactivos	1 Reacción	25 Reacciones	50 Reacciones	100 Reacciones
Mix Taq (R2)	10µL	250µL	500µL	1mL
Solución PCR (R1)	1µL	25µL	50µL	100µL
Soluciones de PCR CI (R4)	1µL	25µL	50µL	100µL
Agua (R9)	3µL	75µL	150µL	300µL

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

3- Pipetear 15µL de la solución de PCR final en los microtubos/pozos a ser utilizados.

4- Adicionar 5µL del DNA extraído de la muestra (concentración sugerida 5ng/µL) o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R6)** en los tubos predeterminados.

5- Homogenizar bien.

6- Observe que el volumen total de la reacción es de 20µL y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo, Control Interno y Patrones Cuantitativos).

7- Transportar los tubos/placa para el termociclador y seguir lo descrito en la sección E (Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real).

### E. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real

Verificar el manual de operaciones del equipamiento de PCR en tiempo real para la programación de lo experimento.

**1- Defina el tipo de experimento:**

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

**2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:**

	Detector	Quencher
HSV	FAM	NFQ-MGB
Control Interno	VIC	

**Obs:** El Control Negativo y los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Interno (reporter 2), pues el mismo es utilizado para control de extracción y amplificación de las muestras.

**3- Defina los patrones cuantitativos (standards) como:**

Patrón A –  $2 \times 10^5$  copias / $\mu$ L

Patrón B –  $2 \times 10^4$  copias / $\mu$ L

Patrón C –  $2 \times 10^3$  copias / $\mu$ L

Patrón D –  $2 \times 10^2$  copias / $\mu$ L

**4- Defina las condiciones de los ciclos:**

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Colection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

**F. Validación de lo Resultado****1- Curva Patrón**

Curva Patrón	Rango Permitido	Amplificación / Detección
Coeficiente de correlación ( $R^2$ )	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Si el valor de  $R^2$  no queda entre los límites del rango permitido, el resultado es considerado inválido y la prueba debe ser repetida.

## 2- Control Negativo

CT Control Negativo		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

## 3- Muestras

HCV		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Concentración determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentración indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

\*El valor de CT de Control Interno varía con las condiciones del proceso, tales como la eficiencia de la extracción de DNA/RNA, la concentración de las muestras y los ajustes del termociclador. Por lo tanto, estas condiciones deben ser evaluadas cuando los valores de CT no son apropiados y los resultados relevantes se pueden validar.

**Ejemplo:** Las muestras con un alto número de copias de DNA/RNA pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Interno resultante en el valor de CT fuera del rango óptimo, este resultado no invalida el test.

Si los requisitos mencionados no fueran cumplidos, el ensayo es considerado inválido y el test debe ser repetido.

## G. Interpretación de lo Resultado

El kit es capaz de detectar 10 a 1.000.000 copias por reacción.

El software del aparato calcula automáticamente la concentración de las muestras.

**Ejemplo:** Si el programa muestra una concentración como 2.00E+005,



entonces la concentración de la muestra será  $2.0 \times 10^5$  copias / $\mu$ L.

<b>Resultado de la Muestra en Copias/<math>\mu</math>L (FAM)</b>	<b>Copias por Reacción</b>
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Cantidad} \leq 9 \times 10^5$	Cantidad obtenida
< 2	< 10

Si el DNA del patógeno no es detectado, esto no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno está por debajo de lo límite de detección de este kit.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta los datos clínicos y las pruebas de laboratorio del paciente.

### **LIMITACIONES DEL PROCESO**

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

### **DESEMPEÑO DEL PRODUCTO CONTROL DE CALIDAD**

#### **Exactitud**

#### **COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA**

El kit **Bio Gene HSV PCR** fue comparado con otro kit para la cuantificación del DNA del Virus del Herpes. Fueron realizadas 25 análisis y los resultados fueron evaluados. La diferencia entre los valores de las muestras, obtenidos en los dos productos fue  $\leq 0,5$  log. Con estos resultados se puede concluir que lo kit presenta buena especificidad metodológica.

#### **Precisión**

#### **REPETIBILIDAD**

Fueron realizadas 10 dosificaciones sucesivas de 2 muestras positivas con

concentraciones distintas, los resultados están mostrados en la tabla abajo:

	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>
<b>Concentración Promedio (Log)</b>	5,138	3,869
<b>Desvio Patrón (Log)</b>	0,054	0,048
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	1,068	1,248

### REPRODUCTIBILIDAD

Fueron realizadas 10 dosificaciones durante 3 días consecutivos con 1 muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>
<b>Concentración Promedio (Log)</b>	3,869	3,912	3,878
<b>Desvio Patrón (Log)</b>	0,048	0,034	0,043
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	1,248	0,876	1,108

### Sensibilidad Clínica

El kit **Bio Gene HSV PCR** presentó sensibilidad clínica de 99,9% y especificidad clínica de 99,9%.

<b>Método</b>		<b>Datos Clínicos</b>		<b>Total</b>
	<b>Resultado</b>	Positivo	Negativo	
<b>Bio Gene HSV PCR</b>	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
<b>RESULTADO TOTAL</b>		25	25	50

### Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 0,64 log, o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 4 moléculas alvos en 5 $\mu$ L del producto de extracción del DNA adicionado a reacción de amplificación.

## SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El Virus Herpes Simplex (HSV), que pertenece a la familia *Herpesviridae*, provoca lesiones en la piel y las mucosas, especialmente del rostro, pero puede infectar a otras partes del cuerpo tales como la región genital.

El HSV-1 a menudo causan lesiones en los labios, el interior de la boca y los ojos, además, complicaciones neurológicas, tales como la encefalitis, también se han relacionado con HSV-1, la transmisión se produce por contacto directo con secreciones infectadas. El HSV-2 provoca lesiones, ampollas y prurito genital, por lo general se transmite sexual y perinatal. La infección cruzada de HSV 1 y 2 puede suceder si el contacto oral-genital.

Los síntomas clínicos de la infección primaria son variados, pero en muchos pacientes la infección es asintomática. HSV puede permanecer en forma latente en el huésped después de la infección primaria.

La detección de virus del herpes humano (1 y 2) por PCR de acuerdo con la literatura, se ha considerado una de las técnicas más sensibles, especialmente en la enfermedad neonatal. Luego, la detección cuantitativa del virus herpes simple por PCR en tiempo real tiene gran importancia por la precisión y agilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldea, C; Alvarez, C.P; Folgueira, L, et al. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1060-2.
2. Chudzik, E; Karabin, K; Dzieciotkowski, T, et al. [Development of a novel real-time PCR method for detection of HSV types 1 and 2 DNA using HybProbe chemistry]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2010;62(3):255-62. Polish.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Kessler, H.H; Mühlbauer, G; Rinner, B, et al. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2638-42.

## ASISTENCIA AL CONSUMIDOR


Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Número de registro del kit Bio Gene HSV PCR en la ANVISA:  
10269360243

## SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NÚMERO DEL CATÁLOGO		ELABORADO POR
	NÚMERO DE LOTE		CONTROL
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	ESTABLE HASTA (último día del mês)		CONTROL NEGATIVO
	TEMPERATURA LIMITE (conservar a)		RIESGO BIOLÓGICO
	CONTENIDO SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLAMABLE
	CONSULTAR INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	EUROPEA REPRESENTANTE AUTORIZADO		MARCADO CE
	PROTEGER DEL LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA

Bioclin ·· QUIBASA

BIO GENE

HSV PCR

*English . Usage instructions*

---

**REF** K170

Review: August/2016

# INDEX

Function .....	3
Principle of Action .....	3
Presentation .....	3
Reagents .....	4
Equipments and Operational Inputs .....	4
Transportation and Storage Conditions .....	4
Special Care .....	5
Samples .....	5
Process Description .....	6
A. DNA Extraction .....	6
B . Preparation of the reagents .....	6
C . Dilution of Quantitative Standard .....	7
D . PCR Preparation .....	7
E . Thermocycler settings for Real-Time PCR .....	8
F . Result Validation .....	9
G.Result Interpretation.....	10
Process Limitations .....	11
Product Performance / Quality Control .....	11
Comparison of Methods and Methodology Specificity .....	11
Repeatability .....	11
Reproducibility .....	12
Clinical Sensitivity .....	12
Analytical Sensitivity .....	12
Diagnostic Significance .....	12
Bibliographic References .....	13
Customer Service .....	13
Universal Symbology .....	14

**FUNCTION**

Quantitative detection of *Herpes Simplex Virus* (HSV) types 1 and 2 DNA using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology. Designed for *in vitro* diagnostic use only.

**PRINCIPLE OF ACTION**

The **Bio Gene HSV PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of HSV DNA by real-time PCR.

The Real Time PCR method is used to amplify the pathogen DNA.

A thermocycler for Real Time PCR is used to amplify and detect the fluorescent probe. Software calculates the HSV DNA concentration, expressed in copies/ $\mu\text{L}$ , using the standard curve generated from the quantitative standard, contained in the kit.

Reagent	Presentation
R1	1 x 55 $\mu\text{L}$ *
R2	1 x 525 $\mu\text{L}$ *
R3	1 x 525 $\mu\text{L}$
R4	1 x 55 $\mu\text{L}$ *
R5	1 x 600 $\mu\text{L}$ *
R6	1 x 50 $\mu\text{L}$
R7	1 x 500 $\mu\text{L}$ *
R8	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL

\*Lyophilized reagents. The volumes described above refer to the final volume after the reagents resuspension, as described in the item PROCESS DESCRIPTION, subitem B (Preparation of the Reagents).

**REAGENTS**

**R1. PCR Solution:** Primer, probe, TRIS-HCl.

**R2. Mix Taq:** DNA Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>.

**R3. Mix Buffer:** TRIS-HCl.

**R4. IC PCR Solution:** Primer, probe, TRIS-HCl.

**R5. Internal Control:** Plasmid, TRIS-HCl.

**R6. Negative Control:** TRIS-HCl.

**R7. Standard A** (2 x 10<sup>5</sup> copies/μL): Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.

**R8. Diluent:** TRIS-HCl, EDTA.

**R9. Water:** DNase/RNase free water.

**EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS****Materials in the kit:**

- Reagents described in the previous item
- Usage Instructions (manual)

**Materials needed but not contained in the kit:**

- 1- Real-time PCR thermocycler.
- 2- Laminar flow hood.
- 3- PCR reaction tubes or PCR reaction plate.
- 4- Powder free latex gloves or similar material.
- 5- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 6- Vortex.
- 7- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 8- Nucleic acid extraction kit.

**TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS**

The required storage temperature is -20°C (-10 to -30°C).

**After resuspension of lyophilized reagents, the product is stable for 6 months from the date of resuspension.** Avoid freezing and thawing. The kit may be transported between 2-30°C. Protect from light and avoid moisture.



**SPECIAL CARE**

**1- For professional *in vitro* diagnostic use only.**

**2-** Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.

**3-** Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose of wastes in accordance with appropriate security procedures.

**4-** It is require skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.

**5-** It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of reactions and for the amplification / detection of products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.

**6-** All samples and reagents should be handled inside a laminar flow hood. It is necessary to use sterile and DNase/RNase free filter pipettes tips.

**7-** Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.

**8-** Store the DNA samples at -20°C in case they will not be used immediately.

**9-** Do not use reagents after expiration date.

**10-** We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.

**11-** To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.

**12-** Do not use the product in case of damaged packaging.

**13-** It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

**SAMPLES**

This kit should be used with DNA samples extracted from whole blood, amniotic fluid, lesions or genital / urinary swab. Other types of samples can be used according to medical recommendations or to laboratories.

Samples must be collected according to the laboratory's recommendations for molecular tests and transported and stored as described below<sup>3</sup>:

Amniotic fluid - between 2 and 8 ° C for 1 day.

Other samples - between 2 and 8 ° C for 3 days.

Use DNA samples suitable for PCR amplification with adequate purity and concentration. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

## PROCESS DESCRIPTION

### A. DNA Extraction

The nucleic acids (DNA) must be extracted in accord to the procedure of the chosen extraction kit.

For control of the extraction process, the **Internal Control (R5)** must be prepared and added to the samples during the extraction as described below:

- 1- Add 4µL of the **Internal Control (R5)** to each tube containing the resuspended samples in extraction/lysis buffer.
- 2- Complete the extraction procedure according to the usage instructions of the extraction kit.

**Note: Never add the Internal Control directly to pure biological sample. This may result in degradation of the sample.**

### B. Preparation of the Reagents

1- Before open, spin (*spin* pulse) each of the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)**, **Internal Control (R5)** and **Standard A (R7)**.

2- Resuspend the **Mix Taq (R2)** reagent in 525µL of Reagent **Mix Buffer (R3)**.

3- Resuspend the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)** and **Internal Control (R5)** with **Water (R9)** reagent, in according to the following table:

Reagent	Volume of Water (R9)
PCR Solution (R1)	55 µL
IC PCR Solution (R4)	55 µL
*Internal Control (R5)	600 µL

\*R5 and R7 reagents contain DNA template. They need to be handle (resuspended) in a separated area from the area designed to prepare

other reagents in order to prevent contamination of other reagents.

### C. Dilution of Quantitative Standard

- 1- Resuspend **Standard A (R7)** with 500  $\mu\text{L}$  of **Diluent (R8)**.
- 2- Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of **Standard A (R7)**.
- 3- Pipette 90 $\mu\text{L}$  of the **Diluent (R8)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 4- Pipette 10 $\mu\text{L}$  of **Standard A (R7)** in microtube B and mix.
- 5- Replace the tip and pipette 10 $\mu\text{L}$  of microtube B in microtube C and mix.
- 6- Replace the tip and pipette 10 $\mu\text{L}$  of microtube C in microtube D and mix.
- 7- At the end of dilution procedure, it will be available 4 standards with the following concentrations:

Standard A -  $2 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$

Standard B -  $2 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$

Standard C -  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$

Standard D -  $2 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$

### D. PCR Preparation

- 1- Prior beginning the assay, select sufficient number of microtubes/wells to be used on the reaction, in accord to the number of samples, controls and quantitative standards to be used.
- 2- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

Reactivos	1 Reaction	25 Reactions	50 Reactions	100 Reactions
Mix Taq (R2)	10 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	1mL
PCR Solution (R1)	1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
CI PCR Solution (R4)	1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Water (R9)	3 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

**3-** Pipette 15µL of the final PCR solution in microtubes or wells previously determined.

**4-** Add 5µL of extracted DNA sample (the suggested concentration is 5 ng/µL) or 5µL of Quantitative Standards or 5µL of **Negative Control (R6)** in previously determined tubes.

**5-** Mix well.

**6-** The total volume of the reaction is 20µL. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control, Internal Control and Quantitative Standards.

**7-** Transport the tubes to the thermocycler and go to the section E (Thermocycler Settings for Real Time PCR).

**E. Thermocycler Settings for Real-Time PCR**

Check the operation manual of the Real-time PCR thermocycler to program the experiment.

**1- Set the type of experiment:**

Quantitative Test with Standard Curve.

**2- Set the fluorescent probes:**

	Detector	Quencher
HSV	FAM	NFQ-MGB
Internal Control	VIC	

**Note:** The Negative Control and Quantitative Standards do not present the Internal Control, because it is used for extraction and amplification control of the samples.

**3- Set the quantitative standards:**

Standard A - 2 x 10<sup>5</sup> copies/µL

Standard B - 2 x 10<sup>4</sup> copies/µL

Standard C - 2 x 10<sup>3</sup> copies/µL

Standard D - 2 x 10<sup>2</sup> copies/µL

**4- Set the cycling conditions:**

	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	2 minutes	1
2	95°C	10 seconds	50
	60°C	60 seconds	

Set “Data Collection” as “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

**F. Result Validation****1- Standard curve**

Standard Curve	Permitted Range	Amplification / Detection
Correlation Coefficient ( $R^2$ )	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Valid

If the  $R^2$  value does not fall within the limits of range, the result must be considered invalid and the test must be repeated.

**2- Negative Control**

CT Negative Control		Result	Detection
FAM	VIC		
Undetermined	Undetermined	Negative	Valid

**3- Samples**

HSV		Result	Detection
FAM	VIC		
Determined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Positive	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positive	Invalid*
Undetermined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Negative	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negative	Invalid*

\*The CT values of Internal Control vary with the process conditions, as the extraction efficiency of the DNA/RNA, the concentration of the samples and the thermocycler settings. Therefore, these conditions must be evaluated when the CT values are not appropriated and, in case it is relevant, the results can be validated.

**Example:** In some cases, the samples with high numbers of copies of DNA / RNA can inhibit the amplification of the Internal Control, resulting in CT value outside the optimal range, this does not invalidate the test results.

If the above requirements are not achieved, the assay must be considered invalid and must be repeated.

**G. Result Interpretation**

This kit is able to detect from 10 to 1.000.000 copies of DNA per reaction. The thermocycler software calculates automatically the samples concentration.

**Example:** If the program shows a concentration of 2.00E+005, this means that the sample concentration is  $2.0 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L.

Sample Result in Copies/ $\mu$ L (FAM)	Copies per Reaction
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantity} \leq 9 \times 10^5$	Quantity obtained
< 2	< 10

The non-detection of the pathogen DNA does not exclude the presence of infection when the pathogen titer is below the detection limit of this kit. The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only parameter for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient.

The results obtained must be evaluated considering the clinical data and laboratory tests of the patient.

### **PROCESS LIMITATIONS**

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

### **PRODUCT PERFORMANCE**

#### **QUALITY CONTROL**

#### **Accuracy**

#### **COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY**

The **Bio Gene HSV PCR** test was compared with another test for the quantification of the HSV DNA. 25 analyzes were performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was  $\leq 0.5$  log. This shows that the test has good methodological specificity.

#### **Precision**

#### **REPEATABILITY**

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 2 positive samples with different concentrations, obtaining the following results:

	<b>Sample 1</b>	<b>Sample 2</b>
<b>Average Concentration (Log)</b>	5,138	3,869
<b>Standard Deviation (Log)</b>	0,054	0,048
<b>Coefficient of Variation (%)</b>	1,068	1,248

**REPRODUCIBILITY**

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 1 sample with different concentrations, obtaining the following results:

	Day 1	Day 2	Day 3
<b>Average Concentration (Log)</b>	3,869	3,912	3,878
<b>Standard Deviation (Log)</b>	0,048	0,034	0,043
<b>Coefficient of variation (%)</b>	1,248	0,876	1,108

**Clinical Sensitivity**

The **Bio Gene HSV PCR** showed clinical sensitivity of 99.9% and a clinical specificity of 99.9%.

Method		Clinical Data		Total
Bio Gene HSV PCR	Result	Positive	Negative	
	Positive	25	0	25
	Negative	0	25	25
<b>TOTAL</b>		25	25	50

**Analytical Sensitivity**

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 0,64 log. This means the assay is capable to detect approximately 4 target molecules in 5µL DNA extraction product, used on the amplification reaction.

**DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE**

The Herpes Simplex Virus (HSV), which belongs to the *Herpesviridae* family, causes lesions in the skin and mucous mainly of the face, but can infect other parts of the body such as the genital region.

The HSV-1 often cause lesions on the lips, the inside of the mouth and eyes besides, neurological complications such as encephalitis, have also



been related to HSV-1, transmission occurs by direct contact with infected secretions. The HSV-2 causes lesions, blisters and genital pruritus, is usually transmitted sexually or perinatally. The cross-infection of HSV 1 and 2 can happen if there is oral-genital contact.

The clinical symptoms of primary infection is varied, but in many patients the infection is asymptomatic. The HSV can remain in latent form in the host after primary infection.

Detection of human herpesvirus (1 and 2) by PCR according to the literature, has been considered one of the most sensitive techniques, especially in neonatal disease. Therefore, the quantitative detection of HSV by real time PCR is very important due to its accuracy and agility.

### **BIBLIOGRAPHIC REFERENCES**

1. Aldea, C; Alvarez, C.P; Folgueira, L, et al. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):1060-2.
2. Chudzik, E; Karabin, K; Dzieciotkowski, T, et al. [Development of a novel real-time PCR method for detection of HSV types 1 and 2 DNA using HybProbe chemistry]. Med Dosw Mikrobiol. 2010;62(3):255-62. Polish.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Kessler, H.H; Mühlbauer, G; Rinner, B, et al. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. J Clin Microbiol. 2000 Jul;38(7):2638-42.

### **CUSTOMER SERVICE**







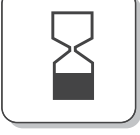









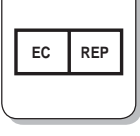

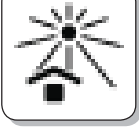

Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

ANVISA registration for Bio Gene HSV PCR: 10269360243

## UNIVERSAL SYMBOLOLOGY

	CATALOG NUMBER		MANUFACTURED BY
	BATCH CODE		CONTROL
	DATE OF MANUFACTURE		POSITIVE CONTROL
	USED BY (last day of month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMITATION (store at)		BIOLOGICAL RISK
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <N> TESTS		INFLAMMABLE
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE		POISON
	EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE		CE MARK
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED



**BIO** **GENE**

**Bioclin** · **QUIBASA**

 Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130  
Tel +55 31 3439 5454 . Fax +55 31 3439 5455 . [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br)  
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422  
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira