Instruções de Utilização

Epi proColon 2.0 CE

Epi proColon Plasma Quick Kit	(M5-02-001)
Epi proColon Sensitive PCR Kit	(M5-02-002)
Epi proColon Control Kit	(M5-02-003)

Aviso:
Utilize apenas a versão mais recente das instruções de utilização. Antes de proceder a cada teste verifique sempre se tem a versão mais recente das instruções de utilização em http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/instructions-for-use.html.

As instruções devem ser lidas cuidadosamente antes da utilização e seguidas minuciosamente para obter resultados fiáveis.

IFU 0009PT, rev 9, copyright©, 27 Abril 2018, Epigenomics AG

REF M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003

Epigenomics AG, Geneststr. 5, 10829 Berlim, Alemanha

Conteúdo

1. Nome e uso pretendido ... 3
2. Resumo e explicação ... 3
3. Princípios do método ... 3
4. Material fornecido ... 4
4.1. Conteúdo ... 4
4.2. Informação de segurança ... 4
5. Armazenamento e estabilidade ... 5
5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) e Epi BiSKit (M7-01-001) ... 6
5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) ... 6
5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003) ... 6
6. Materiais necessários, mas não fornecidos ... 6
6.1. Equipamento geral de laboratório ... 6
6.2. Consumíveis e reagentes gerais de laboratório ... 7
6.3. Equipamentos e consumíveis especiais necessários ... 7
6.4. Requisitos de instalação ... 8
7. Avisos e precauções ... 8
7.1. Precauções laboratoriais ... 8
7.2. Estado microbiológico e infecioso ... 8
8. Colheita e manuseamento de amostras ... 9
8.1. Colheita e armazenamento de sangue ... 9
8.2. Preparação e armazenamento de amostras de plasma ... 9
9.1. Preparação das soluções de trabalho ... 9
9.2. Extração de ADN e conversão de bissulfito a partir do plasma dos pacientes ... 10
9.3. Preparação do PCR ... 13
10. Análise com os equipamentos Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx PCR Instruments ... 14
10.1. Requisitos de software ... 14
10.2. Preparação da placa de PCR (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx) ... 14
10.3. Carregamento da placa (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx) ... 15
10.4. Definições da análise (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx) ... 17
10.5. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx) ... 18
10.6. Interpretação dos resultados para um PCR individual (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx) ... 18
11. Análise com o instrumento Roche LightCycler 480 Instrument I ... 19
11.1. Preparação da placa (LightCycler 480 Instrument I) ... 19
11.2. Carregamento da placa (LightCycler 480 Instrument I) ... 19
11.3. Definições da análise (LightCycler 480 Instrument I) ... 20
11.4. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument I) ... 20
11.5. Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument I) ... 21
12. Análise com o instrumentoRoche LightCycler 480 Instrument II ... 21
12.1. Preparação da placa (LightCycler 480 Instrument II) ... 21
12.2. Carregamento da placa (LightCycler 480 Instrument II) ... 22
12.3. Definições da análise (LightCycler 480 Instrument II) ... 22
12.4. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument II) ... 23
12.5. Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument II) ... 24
13. Interpretação dos resultados para a amostra de um paciente ... 24
14. Controlo de qualidade ... 24
14.1. Controlos externos ... 24
14.2. Controlos internos ... 24
15. Limitações do método ... 25
16. Caraterísticas do desempenho ... 25
16.1. Sensibilidade analítica ... 25
16.2. Reprodutibilidade ... 25
16.3. Sensibilidade clínica e específica ... 26
16.4. Concordância dos dois instrumentos de PCR em tempo real ... 26
16.5. Interferência ... 26
17. Significado dos símbolos ... 27
18. Referências ... 28
19. Contactos ... 28

1. Nome e uso pretendido

O Epi proColon 2.0 CE é um teste qualitativo para a deteção da forma metilada do gene Septina 9, através da técnica de PCR em tempo real, em ADN convertido com bissulfito e previamente extraído de amostras de plasma humano. A presença da forma metilada do gene Septina 9 está associada, e pode auxiliar, à deteção do cancro colorectal.

O Epi proColon 2.0 CE é composto pelo Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), pelo Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) e pelo Epi proColon Control Kit (M5-02-003).

2. Resumo e explicação

O Epi proColon 2.0 CE é um teste que utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a deteção da forma metilada do gene Septina 9 em ADN isolado de 3,5 mL de plasma humano. Os resíduos de citosina na região v2 do gene Septina 9 encontram-se metilados no tecido de cancro colorectal (CCR), mas não na mucosa normal do cólon. Esta metilação aberrante pode ser detetada através da amplificação específica do ADN presente na corrente sanguínea. A deteção do ADN de CCR no plasma, usando o biomarcador da metilação do gene Septina 9, foi demonstrada em múltiplos estudos caso-controlo em pacientes com CCR e controlos negativos verificados com colonoscopia[1-3]. O Epi proColon 2.0 CE oferece assim, aos pacientes que atualmente se recusam a realizar o rastreio por colonoscopia, uma alternativa razoável de rastreio não invasiva para o CCR.

3. Princípios do método

O Epi proColon 2.0 CE envolve dois passos. No primeiro passo, o ADN é extraído do plasma e segue-se a conversão por bissulfito do ADN purificado usando o Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) ou Epi BiSKit (M7-01-001). No segundo passo, o ADN convertido por bissulfito (bisADN) é utilizado num PCR duplex usando o Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), que deteta a forma metilada do gene Septina 9 e um controlo interno, o gene da β-actina (ACTB), para avaliação da qualidade do ADN utilizado. O controlos fornecidos com o Epi proColon Control Kit (M5-02-003) são necessários como controlos positivos e negativos em todos os ensaios.

A extração de ADN contido no plasma dos pacientes é baseada na ligação do ADN circulante a partículas magnéticas, que são separadas magneticamente do plasma. As impurezas são depois removidas das partículas magnéticas durante os passos de lavagem. No passo de eluição o ADN purificado é removido das partículas magnéticas por dissolução no tampão de eluição. O eluído que contém o ADN é depois sujeito a uma reação química que altera especificamente resíduos de citosina não-metilados no interior ADN. O tratamento de bissulfito é o método preferencial para a análise da metilação do ADN. A conversão baseia-se na adição nucleofílica de um ião de bissulfito aos nucleótidos citosina não-metilados e à subsequente reação de desaminação, de forma a originar uracilos. Nesta conversão as citosinas metiladas mantêm-se intactas.

Na subsequente reação de PCR, bloqueadores e sondas especificas permitem discriminar as sequências metiladas e não metiladas. O Epi proColon 2.0 CE deteta a sequência de bisADN que contêm locais CpG metilados no interior da região v2 do gene Septina 9 e o bisADN de uma região do gene ACTB. Para o efeito, no PCR duplex, são usados *primers* para uma região específica do gene Septina 9 sem dinucleótidos CpG. É adicionado um bloqueador específico para as sequências não-metiladas convertidas por bissulfito para que as sequências metiladas sejam preferencialmente amplificadas. É utilizada ainda uma sonda de deteção fluorescente específica para a forma metilada do gene Septina 9, de forma a identificar exclusivamente as sequências metiladas amplificadas durante a reação de PCR[4].

O Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) e o Epi BiSKit (M7-01-001) são intercambiáveis para extração de ADN e conversão de bissulfito.

4. Material fornecido

4.1. Conteúdo

Tabela 1 - Constituintes do Epi proColon Plasma Kit e Epi BiSKit.

Reagente Epi proColon Plasma Quick Kit	Reagente Epi BiSKit	Contém	Volume	Temperatura de Armazenamento
Epi proColon Lysis Binding Buffer	Lysis Binding Buffer	1 frasco	125 mL	15 °C a 30°C
Epi proColon Wash A Concentrate	Wash A Concentrate	1 frasco	60 mL	15 °C a 30°C
Epi proColon Magnetic Beads	Magnetic Beads	1 frasco	4 mL	15 °C a 30°C
Epi proColon Wash B Concentrate	Wash B Concentrate	1 frasco	7 mL	15 °C a 30°C
Epi proColon Elution Buffer	Elution Buffer	1 tubo	6 mL	15 °C a 30°C
Epi proColon Bisulfite Solution	Bisulfite Solution	4 tubos	1,9 mL em cada	15 °C a 30°C
Epi proColon Protection Buffer	Protection Buffer	1 tubo	1 mL	15 °C a 30°C

Nota: A cor do reagente Epi proColon Protection Buffer pode variar entre castanho claro e castanho escuro.

Tabela 2 - Constituintes do Epi proColon Sensitive PCR Kit

Reagente	Contém	Volume	Temperatura de Armazenamento
Epi proColon PCR Mix	2 tubos	810 µL em cada	-25 °C a -15°C
Epi ProColon Polymerase	1 tubo	85 µL	-25 °C a -15°C

Tabela 3 - Constituintes do Epi proColon Control Kit

Reagente	Contém	Volume	Temperatura de Armazenamento
Epi proColon Negative Control	6 tubos	3,65 mL em cada	-25 °C a -15°C
Epi proColon Positive Control	6 tubos	3,65 mL em cada	-25 °C a -15°C

4.2. Informação de segurança

Usar bata de laboratório e luvas descartáveis sempre que trabalhar com produtos químicos. Limpar as zonas contaminadas com água. Para mais informações, por favor consulte as respetivas folhas de dados de segurança do material (MSDS), disponíveis na nossa página na internet (http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/safety-data-sheets.html).

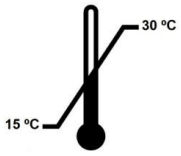
(Epi proColon) Lyisis Buffer e (Epi proColon) Wash A Concentrate: contém TRITON X-100 e tiocianato de guanidina **Advertências de perigo:** H302: Nocivo se ingerido. H312: Nocivo em contato com a pele. H318: Provoca danos sérios nos olhos. H332: Nocivo se inalado. H412: Nocivo para organismos aquáticos e com efeitos a longo prazo. EUH032: O contato com ácidos liberta gás muito tóxico. **Advertências de precaução:** P261: Evite respirar os aerossóis. P273: Evite libertar no meio ambiente. P301 + P312: SE ENGOLIR: Ligue para o Centro de Informação Anti-venenos (CIAV), ou para um médico, se sentir-se mal disposto. P302 + P352.1: EM CONTACTO COM A PELE: Lavar com bastante água e sabão. P305 + P351 + P338: EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar com água, cuidadosamente, durante alguns minutos. Remover lentes de contacto, se presentes e se forem fáceis de remover. Continue a enxaguar.	 PERIGO
(Epi proColon) Bisulfite Solution: contém solução aquosa de bissulfito de amónio (ácido de bissulfito de amónio) **Advertências de perigo:** H319: Provoca irritação ocular grave. EUH031: Contacto com ácidos liberta gás tóxico. **Advertências de precaução:** P264.1: lavar as mãos minuciosamente depois de manusear; P271: usar apenas ao ar livre ou em áreas bem ventiladas; P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção; P305+351+338: EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar com água, cuidadosamente, durante alguns minutos. Remover lentes de contacto, se presentes e se forem fácies de remover. Continue a enxaguar; P312: Ligue para o Centro de Informação Anti-venenos (CIAV), ou para um médico, se sentir-se mal disposto.	 ATENÇÃO
(Epi proColon) Protection Buffer: contém 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, Tetra-hidro-furfuril-álcool **Advertências de perigo:** H302: Nocivo por ingestão. H315: Provoca irritação cutânea. H319: Provoca irritação ocular grave. H360Df: Pode afectar o nascituro. Suspeito de afectar a fertilidade. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias. **Advertências de precaução:** P101: Se for necessário consultar um médico, mostre-lhe a embalagem ou o rótulo. P102: Manter fora do alcance das crianças. P201: Pedir instruções específicas antes da utilização. P271: Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P308+P313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. P405: Armazenar em local fechado à chave.	 PERIGO

Os reagentes (Epi proColon) Wash B Concentrate, (Epi proColon) Elution Buffer, (Epi proColon) Magnetic Beads, Epi proColon PCR Mix, Epi proColon Polymerase, Epi proColon Positive Control, e Epi proColon Negative Control não são nocivos.

5. Armazenamento e estabilidade

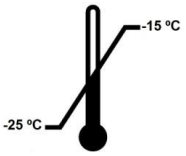
Os reagentes fornecidos pelos kits Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi BiSKit (M7-01-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) e Epi proColon Control Kit (M5-02-003) são estáveis até à data de validade, quando armazenados e manuseados conforme o indicado. Não utilize material após a data de validade. Não misture componentes de diferentes lotes.

5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) e Epi BiSKit (M7-01-001)



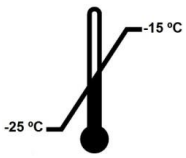
Armazene todos os reagentes do Epi proColon Plasma Quick Kit e do Epi BiSKit a uma temperatura entre 15 a 30 °C.
A solução (Epi proColon) Bisulfite Solution é sensível ao contacto com o oxigénio. Use apenas tubos por abrir desta solução. Descarte os tubos utilizados!
Armazene os tampões reconstituídos (Epi proColon) Wash A e (Epi proColon) Wash B entre 15 a 30 °C, até um máximo de 6 semanas.
Após a primeira utilização, armazene todos os reagentes entre 15 a 30 °C, até um máximo de 6 semanas.

5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)



Armazene os reagentes Epi proColon PCR Mix e Epi proColon Polymerase a uma temperatura entre -25 a -15 °C.
Cada tudo Epi proColon Mix pode ser descongelado e congelado de novo, apenas uma vez. Após a primeira utilização, guarde todos os reagentes a uma temperatura entre -25 a -15 °C, até o máximo de 6 semanas.

5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003)



Armazene o Epi proColon Control Kit a uma temperatura entre -25 a -15 °C.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

6.1. Equipamento geral de laboratório

O seguinte equipamento geral de laboratório é necessário para realizar o teste Epi proColon 2.0 CE. Todo o equipamento de laboratório deve estar instalado, calibrado, operado e mantido conforme as recomendações do fabricante.

Equipamento necessário	Equipamento Sugerido
Suporte para tubo de 15 mL e 2 mL	VWR International, catálogo nº 211-0200,ou equivalente
Rotor	VWR International, catálogo nº 445-2102; Carl Roth GmbH + Co. KG, Catálogo nº Y549.1, ou equivalente
Vórtex	VWR International, catálogo nº 444-1372, ou equivalente
Termobloco com agitação para tubos de 2 mL	ThermoMixer® C, Eppendorf, catálogo nº 5382 000.015, com bloco de aquecimento a seco de 2 ml, Eppendorf, catálogo nº 5362 000.019, ou equivalente (Precisão da temperatura do Termobloco: ± 2 ° C a 23 a 80 ° C).
Pipetas com volumes ajustáveis para os seguintes intervalos: 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf Reference®, volume de pipeta ajustável, Eppendorf, catálogo nº 4910 000.042 e 4910 000.069, ou equivalente
Pipeta de repetição, capaz de dispensar volumes de forma repetida e num intervalo ajustável	Eppendorf Multipette® plus, Eppendorf, catálogo nº 4981 000.019, ou HandyStep® electronic, Brand, catálogo nº 705000/705001, ou equivalente
Centrífuga de bancada com rotor para tubos de 1,5/2,0 mL	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, catálogo nº 5407 000.317 com rotor F-45-30-11, Eppendorf, catálogo nº 5490 015.002, ou equivalente
Pipeta multicanal	Eppendorf Research® plus 8-Channel, 10 - 100 µL, Eppendorf, catálogo nº 3122 000.035, ou equivalente
Centrífuga de placas para placas de PCR	Centrifuge 5804 R, Eppendorf, catálogo nº 5804 000.013, com rotor A-2-DWP, Eppendorf, catálogo nº 5804 740.009,ou equivalente
Proveta graduada de 100 mL ou pipeta serológica de 50 mL	Carl Roth, catálogo nº C177.2, ou equivalente, ou Fisher Scientific, catálogo nº 10212581, ou equivalente

6.2. Consumíveis e reagentes gerais de laboratório

Consumíveis e reagentes	Consumíveis e reagentes sugeridos
Etanol absoluto para biologia molecular (99,5 %)	Merck KGaA, catálogo nº 1.08543.0250, ou equivalente
Tubos de centrífuga de 15 mL em polipropileno com fundo cónico, PP/estéril	Sarstedt, catálogo nº 62.554.502, ou equivalente
Microtubos de 2 mL com fundo cónico e com tampa em PP e com mecanismo de fecho	Sarstedt SafeSeal, catalog no. 72.695.400 ou Eppendorf Safe-LockTM, catalog no. 0030 120.094, ou equivalente
Pontas de pipeta com filtro	ep Dualfilter T.I.P.S.®, Eppendorf: • 2 – 100 µL, catálogo nº 0030 077.547, ou equivalente • 50 – 1000 µL, catálogo nº 0030 077.571, ou equivalente
Pontas para pipetas de repetição e para os volumes de 0,5 mL, 1 mL, 10 mL, 25 mL	Combitips plus®, Eppendorf: • 0,5 mL, catálogo nº 0030 069.226, ou equivalente • 1 mL, catálogo nº 0030 069.234, ou equivalente • 10 mL, catálogo nº 0030 069.269, ou equivalente • 25 mL, catálogo nº 0030 069.293, ou equivalente
Pipetas de transferência descartáveis, embaladas a granel e não-estéreis, com 15 cm de comprimento (cerca de 6 polegadas), com um diâmetro de 5 mm, cerca de 5 mL de capacidade	VWR Disposable Transfer Pipettes with Reference Lines Non-sterile, catálogo nº 612-4520, ou equivalente
Pipetas de transferência dispensáveis, embaladas a granel e não-estéreis, 25 cm de comprimento (cerca de 9 polegadas), com um diâmetro de 5 mm, cerca de 5 mL de capacidade	Pipeta de transferência descartável, graduado, Carl Roth, catálogo nº EA61.1, ou equivalente
Placa de reação de PCR em tempo real de 96 poços	MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, Applied Biosystems (Life Technologies Co.), catálogo nº 4346906, ou equivalente
Película ou folha adesiva para as placa de armazenamento de ADN	VWR Thermalseal PCR Sealing Film, catálogo nº 391-1254 ou Eppendorf Storage Foil (self-adhesive), catálogo nº 0030 127.889, ou equivalente
Aplicador para auxiliar a selagem entre a película adesiva e a microplaca	MicroAmp® Adhesive Film Applicator, Applied Biosystems, catálogo nº 4333183
Sacos de plásticos com fecho hermético, 10 X 15 cm para dispensar as placas de PCR usadas	Carl Roth, catálogo nº P279.2, ou equivalente
Criotubos de 5 mL com base de suporte	VWR, catálogo nº 479-1218, ou equivalente
Tubos de colheita de sangue	• Tubos de colheita de sangue BD Vacutainer®K2EDTA (Becton Dickinson, catalog nº 367525) ou • S-Monovette® 9 mL K3E (Sarstedt catálogo nº 02.1066.001) ou • S-Monovette® 8.5 mL CPDA (Sarstedt catálogo nº 01.1610.001)

6.3. Equipamentos e consumíveis especiais necessários

Os seguintes equipamentos e consumíveis especiais são necessários para realizar o teste Epi proColon 2.0 CE e não podem ser substituídos por outro equipamento.

Quando se realiza o teste Epi proColon 2.0 CE nos instrumentos **Applied Biosystems 7500 Fast ou 7500 Fast Dx PCR**:

- "Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument" com "Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Module" para o Windows XP ou com "Sequence Detection Software v1.4.1 21 CFR Part 11 Module" para o Windows 7 (Life Technologies Co., catálogo nº 4406984 or 4406985)
- "Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Instrument" (Life Technologies Co., catálogo nº 4351106 ou 4351107) com "Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Module" (Life Technologies Co., catálogo nº 4377355)
- "MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 mL" (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 placas, catálogo nº 4346906; 200 placas, catálogo nº 4366932)
- "MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive Film" (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 películas, catálogo nº 4360954 ou 100 películas, catálogo nº 4311971)

Quando se realiza o teste Epi proColon 2.0 CE nos **Roche LightCycler 480 instruments I e II**:

- "LightCycler 480 Instrument I" com termobloco de 96 poços (Roche, catálogo nº 05015278001) e com Software versão 1.5.x ou

"LightCycler 480 Instrument II" com termobloco de 96 poços (Roche, catálogo nº 05015278001) e com Software versão 1.5.x
- "LightCycler 480 Multiwell Plate 96" com películas de isolamento (Roche, catálogo nº 04729692001)
- "LightCycler 480 Sealing Foil" (Roche, catálogo nº 04729757001)

Equipamento adicional necessário, compatível com todas as configurações dos instrumentos de PCR em tempo real:

- Extractor magnético: DynaMag™-15 magnet (Invitrogen, catálogo nº 123.01D)
- Extractor magnético: DynaMag™-2 magnet (Invitrogen, catálogo nº 123.21D)

6.4. Requisitos de instalação

A instalação, calibração, verificação do desempenho e manutenção dos instrumentos Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR, Applied Biosystems 7500 Fast PCR ou Roche LightCycler 480 Instrument I ou II devem ser realizadas segundo as instruções dos fabricantes.

Nota: As calibrações mensais do ruído de fundo, tal com descrito no procedimento de manutenção do fabricante, são obrigatórias, para os instrumentos Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR e Applied Biosystems 7500 Fast PCR.

As manutenções semi-anuais são necessárias para os sistemas Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR Instrument e 7500 Fast PCR Instrument, de acordo com as instruções do fabricante, incluindo a calibração dos marcadores FAM™, JOE™, TAMRA™.

7. Avisos e precauções

7.1. Precauções laboratoriais

O cumprimento das boas práticas laboratoriais é essencial para minimizar o risco de contaminação cruzada entre amostras durante e após a extração, durante a conversão por bissulfito e nos passos de purificação.

Previna a introdução de nucleases nas amostras durante o método de extração. Nós recomendamos a utilização de pipetas e pontas para pipetas de utilização única, de forma a prevenir a contaminação cruzada das amostras. Este teste destina-se apenas a ser utilizado em laboratórios profissionais e familiarizados com os métodos de extração de ADN e ensaios de PCR em tempo real.

Para prevenir a contaminação por amplicões gerados em PCRs anteriores, nós recomendamos uma estrita separação das atividades pré-PCR e pós-PCR (ex. extração e purificação de ADN do plasma, preparação do PCR) e pós-PCR (ex. PCR em tempo real). Adicionalmente, nós recomendamos que as placas de PCR usadas sejam descartadas de forma que o produto de PCR não seja libertado. Ex. as placas de PCR utilizadas devem ser colocadas num saco de plástico selado imediatamente após a remoção do aparelho de PCR; o saco deve ser selado e colocado num contentor do lixo para esse efeito. Nunca guarde placa de PCR fora do equipamento de PCR. Nunca abra uma placa de PCR usada.

7.2. Estado microbiológico e infecioso

O produto não contém nenhuma substância infeciosa ou agentes que provocam doenças em humanos ou em animais.

As amostras de sangue e plasma humano analisadas com este ensaio devem ser manuseadas como potencialmente infeciosas, utilizando procedimentos de segurança laboratorial, tal como os delineados em "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" - Diretiva 2000/54/EC para a proteção dos trabalhadores dos riscos associados à exposição a agentes biológicos no trabalho, ou com outras práticas apropriadas de biossegurança.

8. Colheita e manuseamento de amostras

8.1. Colheita e armazenamento de sangue

A colheita e armazenamento de sangue pode ser realizada de acordo com as seguintes condições:

- Utilizar BD Vacutainer® K_2EDTA ou S-Monovette® 9 mL K3E para colher sangue. Siga as instruções do fabricante para realizar a colheita. O sangue deve ser processado imediatamente. No máximo, o sangue pode ser armazenado a uma temperatura entre 2 a 8 °C, até 24 horas, antes da separação do plasma. **Não congele a amostra de sangue**!
- Em alternativa, o tubo de 8,5 mL S-Monovette® CPDA pode ser usado para colher o sangue. Siga as instruções do fabricante para realizar a colheita. O sangue deve ser processado imediatamente. No máximo, o sangue pode ser armazenado no tubo de 8,5 ml S-Monovette® CPDA a uma temperatura entre 15 a 25 °C, até 48 horas, antes da separação do plasma. **Não congele a amostra de sangue.**

8.2. Preparação e armazenamento de amostras de plasma

- Desligue a função de travagem da centrífuga para prevenir a rutura da camada de células.
- Centrifugue o sangue no tubo de colheita durante 12 min a 1350 ±150 rcf. Para fazer a conversão de rotações por minuto (rpm) para rcf, consulte o manual da centrífuga.
- Remova o tubo de colheita de sangue da centrífuga.
- Use uma pipeta descartável, nova, de 15 cm para transferir o plasma do tubo de colheita para um tubo de centrífuga, de polipropileno, de 15 mL, com fundo cónico.
- Centrifugue o plasma no tubo de centrífuga de 15 mL, durante 12 min a 1350±150 rcf.
- Utilizando uma nova pipeta de transferência descartável extra longa (22,5 cm) ou uma pipeta serológica, transfira 3,5 mL de plasma para um criotubo ou um tubo de centrífuga, previamente etiquetado.
- As amostras de plasma podem ser armazenadas a uma temperatura entre -15 e -25 °C, até 4 semanas.
- Quando se utiliza BD Vacutainer® K_2EDTA, o plasma pode também ser armazenado a uma temperatura entre 2 a 8 °C, até 18 horas.

Nota: Tenha atenção para não desagregar ou transferir a camada de glóbulos brancos que está localizada acima da camada de glóbulos vermelhos, depois da primeira centrifugação, ou sedimentada no fundo do tubo de centrífuga, após a segunda centrifugação.

9. Método

É recomendada a utilização de uma pipeta de repetição para a dispensa repetitiva dos seguintes reagentes:

- (Epi proColon) Lysis Binding Buffer
- (Epi proColon) Magnetic Beads Suspension
- Etanol no passo de ligação ao ADN (Passo 9.2.3)
- (Epi proColon) Wash A Buffer
- (Epi proColon) Wash B Buffer
- (Epi proColon) Elution Buffer
- (Epi proColon) Bisulfite Solution
- (Epi proColon) Protection Buffer e PCR Master Mix.

Adicionalmente, nós recomendamos fortemente um agitador rotativo do tipo circular e não uma plataforma de agitação, e o uso de pipetas de referência para a extração de ADN e para o tratamento com bissulfito.

9.1. Preparação das soluções de trabalho.

9.1.1. Preparação de (Epi proColon) Wash A Buffer

- Adicione 60,0 mL de etanol absoluto (para biologia molecular, ≥99,5%) ao concentrado de (Epi proColon) Wash A Buffer, usando uma proveta graduada ou uma pipeta serológica.
- Feche a tampa, misture bem, 5 vezes por inversão, evitando a formação de espuma. Coloque uma etiqueta no frasco com a data da dissolução e marque a caixa “Ethanol added”.

- Armazene o (Epi proColon) Wash A Buffer a uma temperatura entre 15 a 30 °C, até 6 semanas.

9.1.2. Preparação de (Epi proColon) Wash B Buffer

- Adicione 40,0 mL de etanol absoluto (para biologia molecular, ≥99,5%) ao concentrado de (Epi proColon) Wash B Buffer usando uma proveta graduada ou uma pipeta serológica.
- Feche a tampa, misture bem, 5 vezes por inversão, evitando a formação de espuma. Coloque uma etiqueta no frasco com a data da dissolução e marque a caixa "Ethanol added".
- Armazene o (Epi proColon) Wash B Buffer a uma temperatura entre 15 a 30 °C, até 6 semanas.

9.2. Extração de ADN e conversão de bissulfito a partir do plasma dos pacientes

O Epi proColon 2.0 CE contém reagentes suficientes para analisar até 32 amostras, incluindo controlos. Um Epi proColon Positive Control e um Epi proColon Negative Control devem ser incluídos em cada ensaio independente. Uma vez que há 4 tubos de utilização única de (Epi proColon) Bisulfite Solution nós recomendamos a realização de um máximo de 4 ensaios independentes (ex. 4 ensaios de 8 amostras cada).

Nota: Uma breve centrifugação dos microtubos (posteriormente indicada como "faça um breve *spin down* dos tubos") é necessária em vários passos do protocolo para remover gotas da tampa ou recolher o líquido remanescente. É recomendado centrifugar durante 10 a 20 seg a 1000 ± 150 rcf usando uma centrífuga de bancada. Evite centrifugações mais fortes para prevenir a compactação das partículas esféricas magnéticas em passos específicos.

Nota: É necessário agitar os tubos e recipientes em certos passos deste protocolo para assegurar uma mistura homogénea do líquido. É recomendado o uso de um vórtex ajustado à velocidade média, durante 5 a 10 sec.

9.2.1. Descongelar o plasma e os controlos (Epi proColon Positive e Negative Control)

- Descongele um Epi proColon Positive Control e um Epi proColon Negative Control durante cerca de 30 min a um temperatura entre 15 e 30 °C.
- Se for utilizada uma amostra de plasma congelado, descongele a amostra durante 30 min a uma temperatura entre 15 e 30 °C.
- Comece a lise até 60 min após o descongelamento.

9.2.2. Lise

Nota: Antes de utilizar, agite brevemente o (Epi proColon) Lysis Binding Buffer e verifique se ocorreu formação de precipitados. Se existirem precipitados, aqueça o (Epi proColon) Lysis Binding Buffer num banho térmico a 37 °C, durante 60 min, e agite gentilmente até o precipitado se encontrar completamente dissolvido. Equilibre o (Epi proColon) Lysis Binding Buffer à temperatura ambiente antes de utilizar.

- Adicione os seguintes reagentes a um tubo de centrífuga de 15 mL:
  - 3,5 mL de amostra de plasma, ou Epi proColon Positive Control ou Epi proColon Negative Control.
  - 3,5 mL (Epi proColon) Lysis Binding Buffer
- Feche o tubo e misture no vórtex durante 5 a 10 segundos.
- Incube o tubo na bancada a uma temperatura entre 15 a 30 °C, durante 10 ± 1 min.

9.2.3. Ligação ao ADN

Nota: Uma suspensão homogénea da solução (Epi proColon) Magnelic Beads é essencial para uma boa performance do teste. Desvios na quantidade indicada de partículas magnéticas podem levar a falsos resultados. Para assegurar uma concentração adequada de partículas magnéticas, o frasco deve ser agitado minuciosamente mesmo antes de pipetar, até que nenhum sedimento seja visível no fundo do frasco. Assegure também a homogeneidade da suspensão entre os vários passos de pipetagem.

- Adicione ao tubo de 15 mL de centrífuga na ordem seguinte:
  - 90 µL (Epi proColon) Magnetic Beads (recém suspensas)
  - 2,5 mL de etanol absoluto (para biologia molecular, ≥99,5%)
- Feche o tubo e misture invertendo o tubo 5 a 6 vezes.
- Coloque o tubo no agitador rotativo circular.
- Ligue o agitador rotativo a uma velocidade média (aprox. 10 – 20 rpm), durante 45 ± 5 min, à temperatura ambiente. Ajuste o ângulo do agitador para aproximadamente 35 a 45 graus.

9.2.4. Lavagem do ADN

Nota: Antes de começar o procedimento de lavagem, coloque o termobloco a uma temperatura de 80 °C, para utilizar mais tarde nos passos de eluição e conversão por bissulfito.

- Coloque o tubo de 15 mL no suporte magnético DynaMag™-15 durante 5 a 10 min.

Nota: Se for observada uma captação incompleta das partículas magnéticas após este passo, deve incubar novamente o tubo afectada a 56°C até um máximo de 10 minutos (ex. banho de térmico) e voltar a colocar o tubo no suporte magnético DynaMag™-15 durante 5-10 min.

- Enquanto o tubo está no suporte magnético DynaMag™-15, retire o sobrenadante com cuidado, de forma a não remover as partículas magnéticas.
- Adicione 1,5 mL de (Epi proColon) Wash A Buffer.
- Ressuspenda completamente as partículas magnéticas no vórtex (aproximadamente 5 a 10 segundos).
- Transfira a suspensão de partículas magnéticas para um microtubo de 2,0 mL, previamente etiquetado, usando uma pipeta de transferência extralonga descartável (22,5 cm).
- Repita o procedimento anterior, usando a mesma pipeta de transferência, de forma a recolher todas as partículas magnéticas remanescentes no tubo de 15mL para o microtubo de 2,0 mL
- Coloque o microtubo de 2,0mL no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo está no suporte magnético DynaMag™-2, remova o máximo possível de sobrenadante utilizando uma pipeta de transferência descartável com 15 cm. Tenha atenção para não remover as partículas magnéticas.
- Retire o microtubo do suporte e faça um breve *spin down*.
- Coloque o tubo de 2,0 mL no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético DynaMag™-2, remova o máximo possível de sobrenandante residual utilizando uma pipeta de referência de 10-100 µL .

9.2.5. Eluição

- Transfira o microtubo de 2,0mL para um suporte não magnético.
- Misture o (Epi proColon) Elution Buffer no vórtex durante 5 a 10 segundos.
- Adicione 100 µL (Epi proColon) Elution Buffer a cada microtubo.
- Feche o microtubo.
- Ressuspenda as esferas magnéticas usando o vórtex (5 a 10 segundos).
- Coloque o microtubo no termobloco a 1000 ± 100 rpm e incube a 80 °C, durante 10 ± 1 min.
- Faça um breve *spin down* do microtubo.
- Coloque o microtubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético, transfira completamente o eluído, (~100 µL de solução de ADN) para um novo microtubo de 2,0 mL.
- Descarte o microtubo de 2,0 mL que contém as partículas magnéticas.

9.2.6. Armazenamento do ADN extraído

Nota: Se o ADN extraído não for usado imediatamente, armazene-o a uma temperatura entre 2 a 8 °C até 24 horas. Não congele o ADN extraído.

9.2.7. Conversão por Bissulfito

Nota: (Epi proColon) Bisulfite Solution é sensível ao contato com o oxigénio. Use apenas tubos que não foram abertos de (Epi proColon) Bisulfite Solution. Não guarde os restos das soluções!

- Adicione os reagentes seguintes ao microtubo de 2,0 mL que contém o eluído (~100 µL ADN em solução).
  - 150 µL (Epi proColon) Bisulfite Solution.
  - 25 µL (Epi proColon) Protection Buffer.

Nota: A cor do reagente (Epi proColon) Protection Buffer pode variar entre castanho claro e castanho escuro.Feche o microtubo e misture a reação de bissulfito no vórtex (5 a 10 segundos).

- Faça um breve *spin down*.

- Coloque o microtubo no termobloco e incube durante 45 ± 5 min, a 80 °C, **sem agitação**.
- Retire o tubo do termobloco imediatamente após 45 ± 5 min.
- Coloque o termobloco à temperatura de 23 °C, ou utilize um segundo termobloco a uma à temperatura de 23 °C para usar mais tarde.

9.2.8. Passo de ligação

Nota: Uma suspensão homogénea da solução (Epi proColon) Magnelic Beads é essencial para uma boa performance do teste. Desvios na quantidade indicada de partículas magnéticas podem levar a falsos resultados. Para assegurar uma concentração adequada de partículas magnéticas, o frasco deve ser agitado minuciosamente mesmo antes de pipetar, até que nenhum sedimento seja visível no fundo do frasco. Assegure também a homogeneidade da suspensão entre os vários passos de pipetagem.

- Faça um breve *spin down* do microtubo de 2,0 mL que contém a reação de bissulfito.
- Adicione os seguintes componentes ao microtubo:
  - 1000 µL (Epi proColon) Wash A Buffer.
  - 20 µL (Epi proColon) Magnetic Beads (recém suspensos).
- Misture no vórtex durante 5 a 10 segundos.
- Aguarde até o termobloco atingir os 23 °C.
- Coloque o microtubo no termobloco a 1000 ± 100 rpm e incube durante 45 ± 5 min a 23 °C.
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o tubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético: remova o máximo de líquido possível usando uma nova pipeta de transferência descartável de 15 cm, tendo o cuidado para não remover as partículas magnéticas.

9.2.9. Primeira lavagem

- Remova o suporte que contém as amostras do íman, para lavar e vortexar as amostras, e adicione:
  - 800 µL (Epi proColon) Wash A Buffer.
- Ressuspenda no vórtex (5 a 10 segundos).
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o microtuubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético, remova o máximo de líquido possível usando uma nova pipeta de transferência descartável de 15 cm, tendo o cuidado para não remover as partículas magnéticas.

9.2.10. Segunda lavagem

- Remova o suporte que contém as amostras do íman, para lavar e vortexar as amostras, e adicione:
  - 800 µL (Epi proColon) Wash B Buffer.
- Ressuspenda no vórtex (5 a 10 segundos).
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o microtubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético, remova o máximo de líquido possível usando uma nova pipeta de transferência descartável de 15 cm, tendo o cuidado para não remover as partículas magnéticas.

9.2.11. Terceira lavagem

- Remova o suporte que contém as amostras do íman, para lavar e vortexar as amostras, e adicione:
  - 400 µL (Epi proColon) Wash B Buffer.
- Ressuspenda no vórtex (5 a 10 segundos).
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o microtubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Enquanto o tubo está no suporte magnético, remova o máximo de líquido possível usando uma nova pipeta de transferência descartável de 15 cm, tendo o cuidado para não remover as partículas magnéticas.
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o tubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.

- Enquanto o tubo ainda está no suporte magnético, remova o máximo de líquido possível usando uma pipeta de transferência de 10 a 100 ul, tendo o cuidado para não remover as partículas magnéticas.

Nota: Este passo é muito importante. Se as gotas restantes não forem removidas das partículas magnéticas, as sobras de (Epi proColon) Wash B Buffer podem causar problemas de performance do teste na PCR final.

9.2.12. Secagem

Nota: Não aumente o tempo de secagem ou a temperatura de secagem. A secagem excessiva pode diminuir a recuperação de bisADN!

- Abra a tampa do microtubo.
- Coloque o tubo aberto no termobloco.
- Permita que o pellet seque durante 10 ± 1 min, a 23 °C, **sem agitação**.

9.2.13. Eluição

- Transfira o microtubo para um suporte não magnético e adicione 60 µL (Epi proColon) Elution Buffer.
- Feche o microtubo.
- Ressuspenda as partículas magnéticas no vórtex (5 a 10 segundos).
- Coloque o microtubo no termobloco e incube durante 10 ± 1 min a uma temperatura de 23 °C, a 1000 ± 100 rpm.
- Faça um breve *spin down*.
- Coloque o tubo no suporte magnético DynaMag™-2 durante 2 a 6 min.
- Transfira completamente o eluído (~60 µL de ADN em solução) para uma placa de 96 poços, usando uma pipeta de referência 10 – 100 µL, e sele a placa com uma película adesiva e utilizando um aplicador.
- Prepare a placa de armazenamento de bisADN de acordo com a disposição recomendada na Tabela 4.

Tabela 4 - Disposição recomendada para a placa de armazenamento de bisADN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC[#]	S7										
B	NC[$]	S8										
C	S1	S9										
D	S2	S10										
E	S3	S11										
F	S4	S12										
G	S5	S13										
H	S6	S14										

[#]Epi proColon Positive Control, [$]Epi proColon Negative Control

9.2.14. Armazenamento do ADN convertido por bissulfito

Se o ADN extraído e tratado com bissulfito não for usado imediatamente, guarde o material a uma temperatura entre 2 a 8 °C, até 24 horas, ou a uma temperatura entre -25 e -15 °C, até 72 horas.

9.3. Preparação do PCR

Nota: Cada amostra de ADN convertida por bissulfito (bisADN) (i.e amostra do paciente, Epi proColon Positive Control, ou Epi proColon Negative Control) deve ser testada em triplicado.

Nota: Antes de utilizar, faça um *spin down* à Epi proColon Polymerase durante 10 a 15 sec, a 1000 ± 150 rcf, usando uma centrífuga de bancada, para remover as gotas da tampa.

9.3.1. Preparação da solução master mix de PCR

- Descongele 1 ou 2 tubos de Epi proColon PCR Mix, dependendo do número de amostras de pacientes e amostras controlo (ver Tabela 5).
- Faça um vórtex ao(s) tubo(s) de Epi proColon PCR Mix durante 10 a 15 se e depois um breve *spin down*.

- Transfira o volume correspondente de Epi proColon PCR Mix e Epi proColon Polymerase para um microtubo de 2,0 mL, tal como indicado na Tabela 5.
- Misture a solução **master mix de PCR** no vórtex, durante 5 a 10 segundos.
- Faça um breve *spin down* para remover as gotas da tampa.

Nota: Não armazene a **solução master mix de PCR**, use imediatamente. Congele novamente a Epi proColon PCR Mix e Epi proColon Polymerase logo após a utilização.

Nota: Para um PCR individual, são necessários 16 µL de Epi proColon PCR Mix e 0,8 µL de Epi proColon Polymerase. Estes volumes já incluem as margem de pipetagem.

Tabela 5 - Preparação da **solução master mix de PCR** com margem de pipetagem.

Componente	**Volume para 8 determinações (24 PCRs)**	**Volume para 16 determinações (48 PCRs)**	**Volume para 24 determinações (72 PCRs)**	**Volume para 32 determinações (96 PCRs)**
Epi proColon PCR Mix	384 µL	768 µL	1152 µL	1536 µL
Epi proColon Polymerase	19,2 µL	38,4 µL	57,6 µL	76,8 µL

Tabela 6 - Disposição recomendada para a placa de PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC[#]	PC[#]	PC[#]	S7	S7	S7						
B	NC[$]	NC[$]	NC[$]	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S10	S10	S10						
E	S3	S3	S3	S11	S11	S11						
F	S4	S4	S4	S12	S12	S12						
G	S5	S5	S5	S13	S13	S13						
H	S6	S6	S6	S14	S14	S14						

[#]Epi proColon Positive Control, [$]Epi proColon Negative Control

Nota: Se o PCR for realizado com o equipamento Applied Biosystems 7500 Fast PCR Instrument ou 7500 Fast Dx PCR Instruments, siga as instruções presentes nas secções 10 e 13.

Se o PCR for realizado no equipamento Roche LightCycler 480 Instrument I siga as instruções contidas nas secções 11 e 13.

Se o PCR for realizado no equipamento Roche LightCycler 480 Instrument II siga as instruções contidas nas secções 12 e 13.

10. Análise com os equipamentos Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx PCR Instruments

10.1. Requisitos de software

Este produto foi validado usando o software SDS v1.4 com 21 PFR Part 11 Module.

10.2. Preparação da placa de PCR (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx)

- Prepare a placa de PCR. Recomendamos a disposição apresentada na Tabela 6.
- Transfira 15 µL da **solução master mix de PCR** para os poços selecionados na placa MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate.
- Se necessário, centrifugue brevemente a placa de armazenamento de bisADN, preparada na secção 9.2.13, durante 1 min a 1000 ± 100 rcf, usando uma centrífuga de placa.
- Adicione 15 µL da solução de bisADN nos respetivos poços da placa de PCR.
- Sele a placa com a película adesiva MicroAmp® Optical Adhesive Film.

- Faça um breve *spin down* à placa, usando a centrífuga de placas, durante 1 min a 1000 ± 100 rcf.

Nota: Esta placa de PCR pode ser guardada no frigorífico a uma temperatura entre 2 e 8 °C, até 4 horas.

10.3. Carregamento da placa (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx)

Nota: A **solução master mix de PCR** não contém ROX ou qualquer outro corante de referência. Desta forma, no software, a referência passiva ("passive reference") deverá ser definida com "none".

Nota: É recomendado guardar um ficheiro modelo (template file) (*.sdt) com as definições dos ciclos e configurações de análise.

- Inicie o Software.
- Carregue o ficheiro modelo ou crie um novo documento para a placa.
- Clique em "Create New Document".
- Defina o seguinte documento para a placa:
  - Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (or select respective Epi proColon 2.0 CE Template file)
  - Run Mode: Standard 7500.
- Clique "Next".
- Clique "New Detector…"
- Crie um novo detetor usando as seguintes propriedades:
  - Name: Septina 9
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter Dye: FAM
  - Quencher Dye: (none)
  - Color: Red.
- Clique em "Create Another" e defina as seguintes propriedades:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter Dye: JOE
  - Quencher Dye: (none)
  - Color: Green.
- Clique em "ok".
- Selecione os dois detetores e clique em "Add>>" para associar os detectores ao documento da placa.
- Selecione "(none)" no menu de "Passive Reference".
- Clique em "Done".
- Vá para o separador "Setup" e "Plate".
- Selecione todos os 96 poços da placa.
- Vá para o menu "View" e abra "Well Inspector".
- Selecione o detetor "Septina 9" e "ACTB".
- Marque a configuração de "Passive Reference" como "(none)" (ver Figura 1).
- Clique em "Close".
- Vá ao separador "Instrument" para programar as condições de ciclo como descritas na Tabela 7.
- Altere as seguintes configurações:
  - Sample Volume: 30 µL
  - Run Mode: Sandard 7500
  - Data Collection: Stage 2, Step2.
- Crie um "Thermal Profile" com 3 etapas.
- Crie um "Stage 2" com 3 passos, e um "Stage 1" e "Stage 3" com um passo.
- Introduza repetições, temperatura alvo, e tempo de "holding" de acordo com a Tabela 7.
- Altere a "Ramp Rate" de acordo com a Tabela 7.
- Defina "Data Collection" para "Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)".
- Confirme as configurações do 2Thermo Cycler Protocol", de acordo com a Tabela 7 (ver Figura 2).

- Guarde o documento da placa com o nome apropriado. Abre a gaveta do equipamento.
- Coloque a placa de PCR no suporte (a posição A1 corresponde ao canto superior esquerdo), assegure que a placa encaixa perfeitamente no suporte. Feche a gaveta.
- Comece a corrida carregando no botão “Start”.

Tabela 7 – “Thermal Cycle Program” para Applied Biossystems 7500 Fast / Fast Dx.

Parâmetro do programa	**Desnaturação**	**Cycling**			**Holding**
Etapa	“Stage 1”	“Stage 2”			“Stage 3”
Repetições	1	45			1
Passo	1	1	2	3	1
Alvo [°C]	94	62	55.5	93	40
Hold [mm:ss]	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Auto Increment		0	0	0	
Ramp Rate [%]	40	80	80	80	80
Data Collection	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				

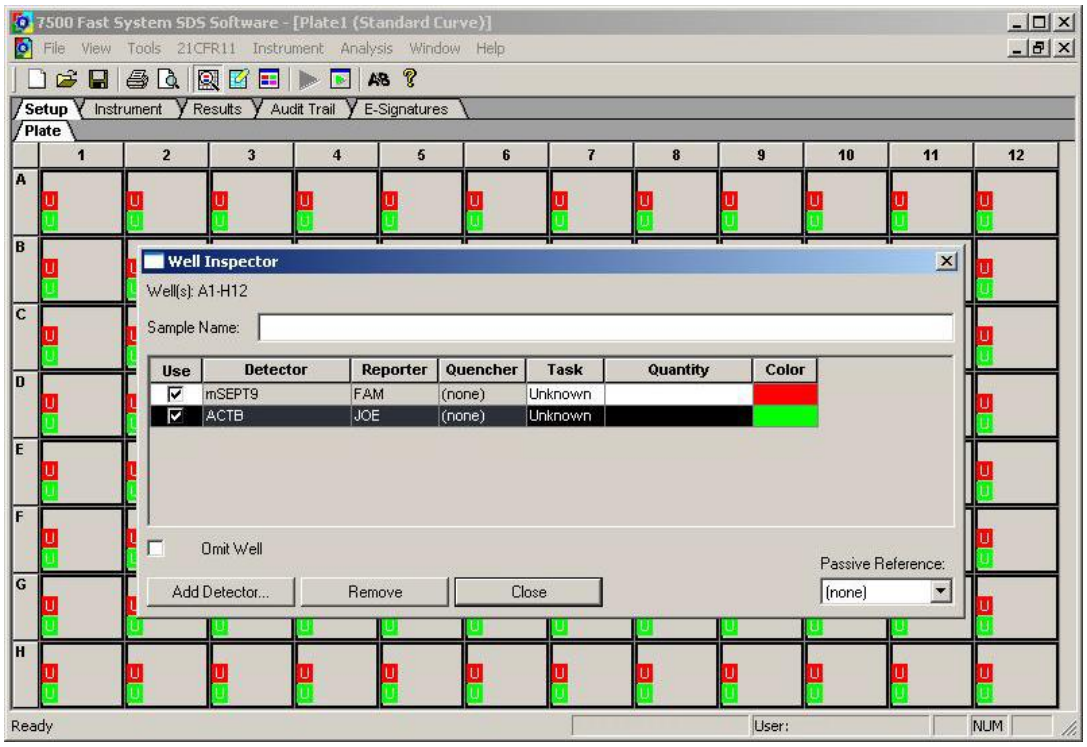


Figura 1 - Captura de ecrã, após confirmar as definições na janela "Well Inspector".

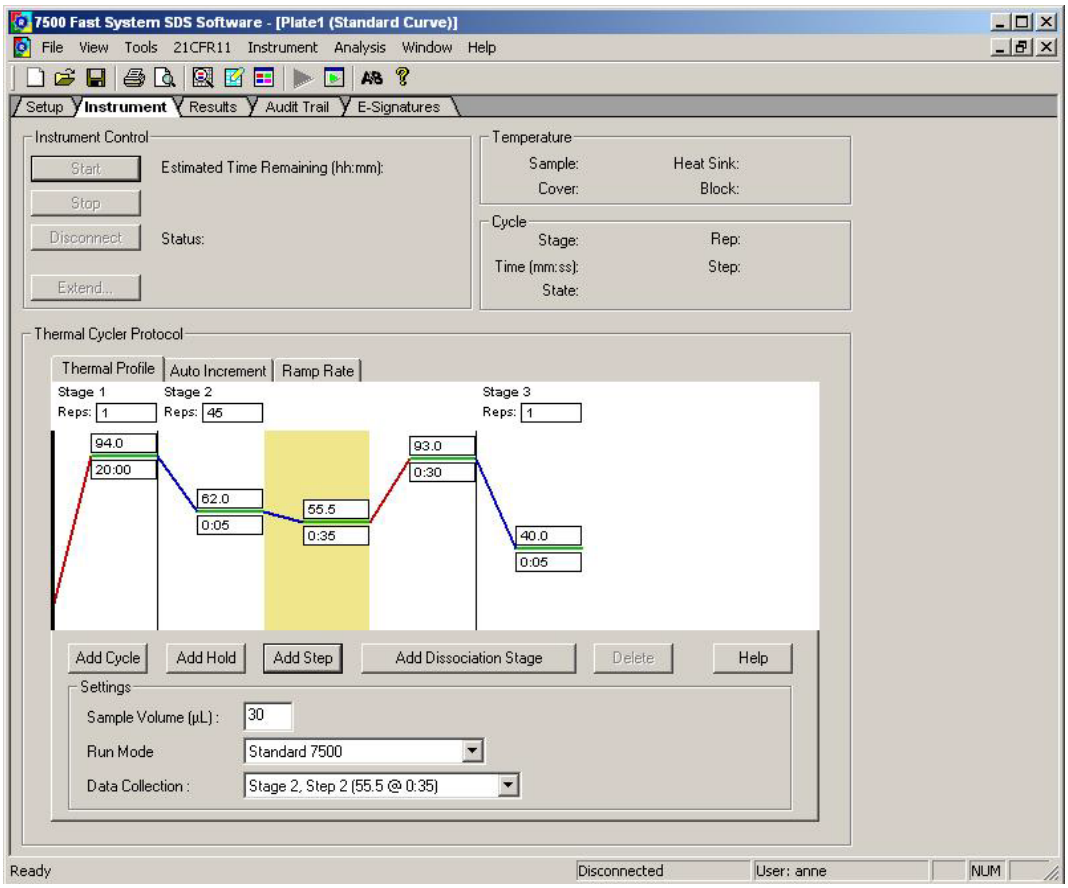


Figura 2 - Captura de ecrã, após a definição do programa de ciclos e modo de deteção.

10.4. Definições da análise (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx)

Nota: A análise das corridas de PCR deve ser feita apenas com a versão de software SDS v1.4 ou SDS v1.4.1.

Nota: Não devem ser analisadas corridas incompletas ou corridas onde ocorrem mensagens de erro. O documento de corrida deve conter dados de fluorescência para os 45 ciclos. Após o fim do programa de ciclos de PCR clique "ok".

- Selecione o separador "Results", e depois selecione o separador "Amplification Plot".
- Defina "Analysis Settings" para o detetor Septina 9 da seguinte forma:
  - Data: "Delta Rn vs Cycle"
  - Detector: "Septina 9"
  - Line color: "Detector Color"
  - Manual Ct, Threshold: "50000" (appears as "5.0e+004")
  - Manual baseline, Start (cycle): "10"
  - Manual baseline, End (cycle): "22"
- Defina "Analysis Settins" para o detetor de ACTB da seguinte forma:
  - Data: "Delta Rn vs Cycle"
  - Detector: "ACTB"
  - Line color: "Detector Color"
  - Manual Ct, Threshold: "25000" (appears as "2.5e+004")
  - Manual baseline, Start (cycle): "10"
  - Manual baseline, End (cycle): "22"
- Clique em "Analyze".
- Clique em "Guardar".
- Os valores de Ct para a Septina 9 e ACTB são calculados automaticamente.

- Selecione os poço para serem analisados.
- As curvas de amplificação são apresentadas no separador “Amplification Plot”.
- Os valores de Ct são apresentados no separador “Report”.

Nota: Cada curva de amplificação deve ser visualmente inspecionada. Curvas de amplificação que atravessem a linha “threshold” devido a dados inconsistentes (ruído de fundo) ou a uma curva com forma linear, devem ser consideradas negativas. São apresentados exemplos na figura 3.

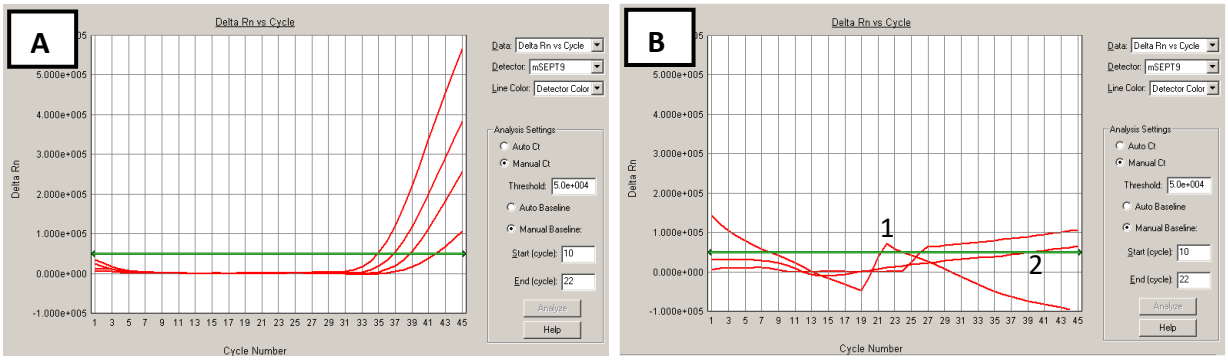


Figura 3 - Capturas de ecrã de curvas de amplificação de Septina 9 usando o instrumento Applied Biosystems 7500 Fast.
A: Exemplos de curvas positivas válidas. B: Exemplos de curvas negativas, devido a dados inconsistentes (1) ou a curvas com forma linear (2).

10.5. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (Applied Biosystems 7500 Fast e 7500 Fast Dx)

Qualquer corrida de uma ou mais amostras de pacientes, processadas em conjunto com os controlos Epi proColon Positive Contro e Epi proColon Negative Control, são consideradas válidas quando os critérios indicados na Tabela 8 são observados **NAS TRÊS (3)** repetições de PCR por controlo.

Se o controlo Epi proColon Positive Control ou o controlo Epi proColon Negative Control, ou ambos, apresentarem resultados inválidos, os dados das amostras de pacientes processados em conjuntos com esses controlos não podem ser interpretados. O teste deverá, por isso, ser repetido para todas as amostras de pacientes incluídas nesse ensaio.

Tabela 8 - Limites da validação dos controlos Epi proColon analizados com os instrumentos Applied Biosystems 7500 Fast / 7500 Fast Dx.

Resultados do controlo	Determinação	Resultado Septina 9	Resultado ACTB
Controlo positivo válido	PCR1 PCR2 PCR3	Ct* ≤ 41.1 Ct* ≤ 41.1 Ct* ≤ 41.1	Ct* ≤ 29.8 Ct* ≤ 29.8 Ct* ≤ 29.8
Controlo negativo válido	PCR1 PCR2 PCR3	Sem Ct* detectado (“indeterminado”)	Ct* ≤ 37.2 Ct* ≤ 37.2 Ct* ≤ 37.2

*Cycle threshold

10.6. Interpretação dos resultados para um PCR individual (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

A interpretação de um PCR individual é feita de acordo com a Tabela 9. Tendo em consideração que o resultado do controlo interno ACTB indica a presença de bisADN suficiente no PCR individual (Ct de ACTB especificado na Tabela 9), o resultado do PCR Septina 9 define o resultado para este PCR individual (ver seção 13). Um valor de ACTB superior ao *cycle threshold* especificado na Tabela 9, determina o resultado do PCR individual como “inválido”.

Tabela 9 - Interpretação dos resultados para um PCR individual (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx).

Resultado do PCR individual	Resultado Septina 9	Resultado ACTB
Septina 9 Positivo	Ct* < 45	Ct* ≤ 32.1
Septina 9 Negativo	Sem Ct* detetado (“indeterminado”)	Ct* ≤ 32.1
Inválido	Qualquer resultado	Ct* > 32.1 Ou “indeterminado”

*Cycle threshold

11. Análise com o instrumento Roche LightCycler 480 Instrument I

11.1. Preparação da placa (LightCycler 480 Instrument I)

- Prepare a placa de PCR. A disposição da placa é a recomendada na Tabela 6.
- Transfira 15 µL da **solução master mix de PCR** para os poços selecionados da LightCycler 480 Multiwell Plate 96 Reaction Plate.
- Faça uma breve centrifugação da placa de armazenamento de bisADN criada na secção 9.2.13, durante 1 min a 1000 ± 100 rcf, usando a centrífuga de placas.
- Adicione 15 µL da solução de bisADN nos respetivos poços da placa de PCR.
- Sele a placa de PCR com a película LightCycler 480 Sealing Foil.
- Faça um breve *spin down* à placa de PCR durante 1 min a 1000 ± 100 rcf usando a centrífuga de placas.

Nota: A placa de PCR pode ser guardada a uma temperatura de 2 a 8 °C, até 4 horas.

11.2. Carregamento da placa (LightCycler 480 Instrument I)

Nota: É recomendado guardar um ficheiro modelo (template file) (*.ixo) com as definições dos ciclos e configurações de análise.

- Iniciar o *software* versão 1.5x.
- Criar uma nova experiência, clique em “New experiment”.
- Carregar o ficheiro “template” específico para a experiência ou definir uma nova experiência, de acordo com parâmetros do programa de PCR detalhados na Tabela 10.
- Abra a gaveta do equipamento.
- Coloque a placa de PCR no suporte (a posição A1 corresponde ao canto superior esquerdo), assegure que a placa encaixa perfeitamente no suporte. Feche a gaveta.
- Clique em “Start Run” para iniciar.

Tabela 10 - Programa de PCR padrão para o instrumento LightCycler 480 Instrument I.

Parâmetro do programa	Desnaturação	Cycling			Arrefecimento
Modo de análise	None	Modo de Quantificação			None
Ciclos	1	50			1
Passo	1	1	2	3	1
Alvo [°C]	94	62	56	93	40
Hold [mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Modo de aquisição	None	None	Single	None	None

* LightCycler 480 Instrument I: selecione “Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe” como formato de deteção; ative a combinação de filtros 483 – 533 nm e 523 – 568 nm e defina o “Reaction Volume” para “30”.

11.3. Definições da análise (LightCycler 480 Instrument I)

Nota: Utilizadores do LightCycler 480 Instrument I precisam de selecionar *Color Compensation* "ON" e carregar a respectivo ficheiro "Epi proColon Compensation" para combinações de filtros "Filter Comb 483 – 533" e Filter Comb 523 – 568".

Nota: Faça a análise dos dados apenas para os poços em uso, criando para tal um respetivo conjunto de amostras, tal como descrito no manual do LightCycler 480 Instrument I.

- Clique em "Analysis", na barra "LightCycler 480 Basic Software Module", abrindo a janela "Analysis Orverview".
- Selecione "Abs Quant/Fit Points" para todas as amostras.
- Active "Epi proColon Color Compensation".
- Active o "Filter Comb 483 – 533".
- Define o "First Cycle" como "1" e "Last Cycle" como "50".
- Defina o ruído de fundo (clique no botão azul de background) como "5 – 22", definindo "Min Offset" como "4" e "Max Offset" como "21" na janela "Cycle Range".
- Defina a faixa de ruído (Noise band) como "Noise Band (Fluoresc)" e defina a Noise band manualmente para "1,6" na janela "Noise Band".
- Após selecionar "Threshold (Manual)", na janela "analysis", defina o threshold para "1,6".
- Defina o número de "Fit Points" como "2" na janela "Analysis".
- Clique em "Calculate"
  "Septin 9 Crossing Point" ("CP") é calculado automaticamente para cada amostra e apresentado na "Sample Table".
- Exporte os valores de CP clicando com o Botão do lado direito na "Sample Table". Selecione "Export". Guarde o ficheiro com um nome único e significativo.
- Active o "Filter Comb 523 – 568".
- Defina o "Fist cycle" como "1" e o "Last Cycle" como "50".
- Defina o valor de background (clique no botão azul de background) como "5 – 22", definindo Min Offset como "4" e Max Offset como "21" na janela "Cycle Range".
- Defina a "Noise band" como "Noise ban (Fluorec)" e defina a "Noise band" manualmente como "0,8" na janela "Noise band".
- Após selecionar "Threshold (Manual)" na janela "Analysis", defina o threshold para "0,8".
- Defina o número de "Fit Points" como ""2" na Janela de "Analysis".
- Clique em "Calculate".
  Os "**ACTB CP values"** são calculados automaticamente para cada amostra e apresentados na "Sample Table".
- Exporte os valores de CP clicando com o botão do lado direito, na "Sample Table". Escolha "Export". Guarde o ficheiro com um nome único e significativo.

Nota: Ajuste a "Noise band" e o "Threshold", de tal forma que este fique situado ligeiramente acima do background e que atravesse as curvas de amplificação no início da fase exponencial. As curvas de amplificação sem um aumento exponencial significativo devem ser avaliadas como negativas.

11.4. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument I)

Qualquer corrida de uma ou mais amostras de pacientes, processadas em conjunto com os controlos Epi proColon Positive Control e Epi proColon Negative Control, são consideradas válidas quando os critérios indicados na Tabela 11 são observados **NAS TRÊS (3)** repetições de PCR por controlo.

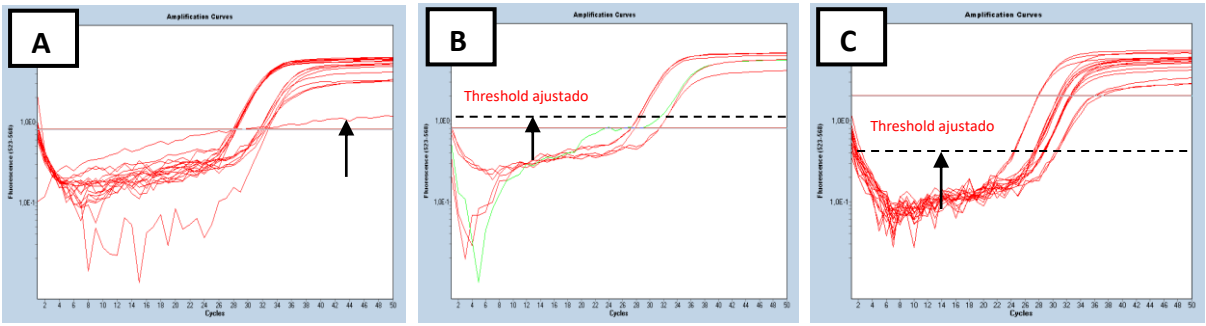


Figura 3 - Captura de ecrã das curvas de amplificação de Septina 9 utilizando o LightCycler 480. A: Curva de amplificação sem um aumento exponencial significativo deve ser avaliada com negativa. B: O Threshold deve ser ajustado para que fique ligeiramente acima do background. C: O Threshold deve ser ajustado para que atravesse as curvas de amplificação no início do aumento exponencial.

Se o controlo Epi proColon Positive Control ou o controlo Epi proColon Negative Control, ou ambos, apresentarem resultados inválidos, os dados das amostras de pacientes processados em conjuntos com esses controlos não podem ser interpretados. O teste deverá, por isso, ser repetido para todas as amostras de pacientes incluídas nesse ensaio.

Tabela 11 - Limites da validação dos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument I).

Resultados do controlo	Determinação	Resultado Septina 9	Resultado ACTB
Controlo positivo válido	PCR1	CP* ≤ 40.6	CP* ≤ 29.5
	PCR2	CP* ≤ 40.6	CP* ≤ 29.5
	PCR3	CP* ≤ 40.6	CP* ≤ 29.5
Controlo negativo válido	PCR1	Sem CP* definido	CP* ≤ 36.5
	PCR2		CP* ≤ 36.5
	PCR3		CP* ≤ 36.5

*Crossing Point

11.5. Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument I)

Se o resultado do controlo interno ACTB indicar a presença de quantidade suficiente de ADN no PCR individual (ACTB *cycle threshold* especificado na Tabela 12), o resultado do PCR de Septina 9 define o resultado deste PCR individual (ver secção 13). Um valor de ACTB acima do *crossing point* especificado na Tabela 12 determina os resultados do PCR individual como "inválido".

Tabela 12 - Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument I).

Resultado do PCR Individual	Resultado da Septina 9	Resultado ACTB
Positivo para Septina 9	CP* < 50	CP* ≤ 33.1
Negativo para Septina 9	Sem CP* definido	CP* ≤ 33.1
Inválido	Qualquer resultado	CP* > 33.1

*Crossing Point

12. Análise com o instrumentoRoche LightCycler 480 Instrument II

12.1. Preparação da placa (LightCycler 480 Instrument II)

- Prepare a placa de PCR. A disposição da placa é a recomendada na Tabela 6.
- Transfira 15 µL da **solução master mix de PCR** para os poços selecionados da LightCycler 480 Multiwell Plate 96 Reaction Plate.
- Faça uma breve centrifugação da placa de armazenamento de bisADN criada na secção 9.2.13 durante 1 min a 1000 ± 100 rcf usando a centrífuga de placas.
- Adicione 15 µL da solução de bisADN nos respetivos poços da placa de PCR.

- Sele a placa de PCR com a película LightCycler 480 Sealing Foil.
- Faça um breve *spin down* à placa de PCR durante 1 min a 1000 ± 100 rcf usando a centrífuga de placas.

Nota: A placa de PCR pode ser guardada a uma temperatura de 2 a 8 °C, até 4 horas.

12.2. Carregamento da placa (LightCycler 480 Instrument II)

Nota: É recomendado guardar um ficheiro modelo (template file) (*.ixo) com as definições dos ciclos e configurações de análise.

- Iniciar o software versão 1.5x.
- Criar uma nova experiência, clique em "New experiment".
- Carregar o ficheiro template específico para a experiência ou defina uma nova experiência de acordo com parâmetros do programa de PCR detalhados na Tabela 13.
- Abra a gaveta do equipamento.
- Coloque a placa de PCR no suporte (a posição A1 corresponde ao canto superior esquerdo), assegure que a placa encaixa perfeitamente no suporte. Feche a gaveta.
- Clique em "Start Run" para iniciar.

Tabela 13 - Programa de PCR padrão para o instrumento LightCycler 480 Instrument II.

Parâmetro do programa	Desnaturação	Cycling			Arrefecimento
Modo de análise	None	Modo de Quantificação			None
Ciclos	1	50			1
Passo	1	1	2	3	1
Alvo [°C]	94	62	56	93	40
Hold [mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Modo de aquisição	None	None	Single	None	None

* LightCycler 480 Instrument II: selecione "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe" como formato de deteção; ative a combinação de filtros 465 – 510 nm e 533 – 580 nm e defina o "Reaction Volume" para "30".

12.3. Definições da análise (LightCycler 480 Instrument II)

Nota: Faça a análise dos dados apenas para os poços em uso, criando para tal um respetivo conjunto de amostras, tal como descrito no manual do LightCycler 480 Instrument I.

- Clique em "Analysis" na barra LightCycler 480 Basic Software Module, abrindo a janela "Analysis Orverview".
- Selecione "Abs Quant/Fit Points" para todas as amostras.
- Active o "Filter Comb 465 – 510".
- Define o "First Cycle" como "1" e "Last Cycle" como "50".
- Defina o background (ruído de fundo) (clique no botão azul de background) como "5 – 22", definindo "Min Offset" como "4" e "Max Offset" como "21" na janela "Cycle Range".
- Defina a faixa de ruído (Noise band) como "Noise Band (Fluoresc)" e defina a "Noise band" manualmente para "2,0" na janela "Noise Band".
- Após selecionar "Threshold (Manual)" na janela "Analysis", defina o threshold para "2,0".
- Defina o número de Fit Points como "2" na janela de "Analysis".
- Clique em "Calculate"
  Septina 9 Crossing Point ("CP") é calculado automaticamente para cada amostra e apresentado na "Sample Table".
- Exporte os valores de CP clicando com o Botão do lado direito na "Sample Table". Selecione "Export". Guarde o ficheiro com um nome único e significativo.
- Active o "Filter Comb 533 – 580".
- Defina o "First cycle" como "1" e o "Last Cycle" como "50".

- Defina o valor de background (clique no botão azul de background) como “5 – 22”, definindo Min Offset como “4” e Max Offset como “21” na janela “Cycle Range”.
- Defina a Noise band como “Noise ban (Fluorec)” e defina a Noise band manualmente como “2,0” na janela “Noise band”.
- Após selecionar “Threshold (Manual)” na janela “Analysis”, defina o threshold para “2,0”.
- Defina o número de Fit Points como “”2” na Janela de “Analysis”.
- Clique em “Calculate”.
  Os **ACTB CP values** são calculados automaticamente para cada amostra e apresentados na “Sample Table”.
  Exporte os valores de CP clicando com o botão do lado direito na “Sample Table”. Escolha “Export”.
  Guarde o ficheiro com um nome único e significativo.

Nota: Ajuste a “Noise band” e “Threshold” de tal forma que o último fique situado ligeiramente acima do background e que atravesse as curvas de amplificação no início do aumento exponencial. As curvas de amplificação sem um aumento exponencial significativo devem ser avaliadas como negativas.

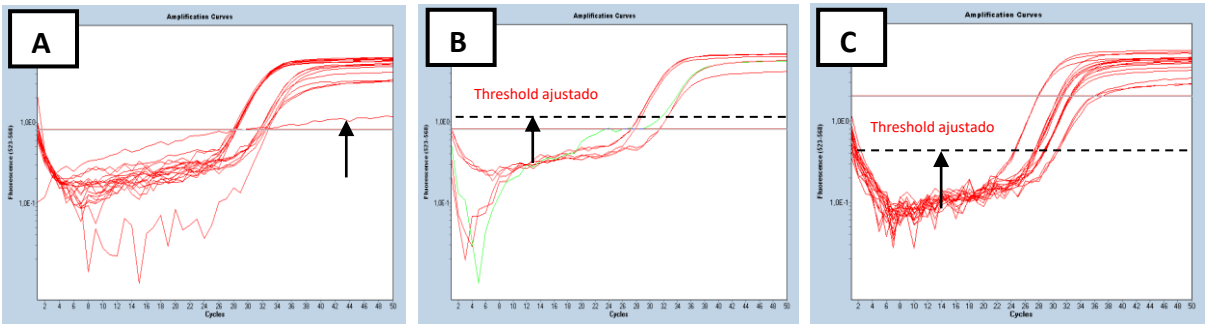


Figura 4 - Captura de ecrã das curvas de amplificação de Septina 9 utilizando o LightCycler 480. A: Curva de amplificação sem um aumento exponencial significativo devem ser avaliadas com negativas. B: O Threshold deve ser ajustado para que fique ligeiramente acima do background. C: O Threshold deve ser ajustado para que atravesse as curvas de amplificação mesmo no início do aumento exponencial.

12.4. Validação da corrida pelos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument II)

Qualquer corrida de uma ou mais amostras de pacientes, processadas em conjunto com os controlos Epi proColon Positive Control e Epi proColon Negative Control, são consideradas válidas quando os critérios indicados na Tabela 14 são observados **NAS TRÊS (3)** repetições de PCR por controlo.

Se o controlo Epi proColon Positive Control ou o controlo Epi proColon Negative Control, ou ambos, apresentarem resultados inválidos, os dados das amostras de pacientes processados em conjuntos com esses controlos não podem ser interpretados. O teste deverá, por isso, ser repetido para todas as amostras de pacientes incluídas nesse ensaio.

Tabela 14 - Limites da validação dos controlos Epi proColon (LightCycler 480 Instrument II).

Resultados do controlo	Determinação	Resultado Septina 9	Resultado ACTB
Controlo positivo válido	PCR1	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR2	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR3	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
Controlo negativo válido	PCR1	Sem CP* definido	CP* ≤ 37.1
	PCR2		CP* ≤ 37.1
	PCR3		CP* ≤ 37.1

*Crossing Point

12.5. Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument II)

Se o resultado do controlo interno ACTB indicar a presença de quantidade suficiente de ADN no PCR individual (ACTB cycle threshold especificado na Tabela 15), o resultado do PCR de Septina 9 define o resultado deste PCR individual (ver secção 13). Um valor de ACTB acima do crossing point especificado na Tabela 15 determina os resultados do PCR individual como "inválido".

Tabela 15 - Interpretação dos resultados para um PCR individual (LightCycler 480 Instrument II).

Resultado do PCR Individual	Resultado da Septina 9	Resultado ACTB
Positivo para Septina 9	CP* < 50	CP* ≤ 33.7
Negativo para Septina 9	Sem CP* definido	CP* ≤ 33.7
Inválido	Qualquer resultado	CP* > 33.7

*Crossing Point

13. Interpretação dos resultados para a amostra de um paciente

O resultado final do teste para a amostra de um paciente é interpretado de acordo coma Tabela 16. O resultado do teste é "POSITIVO", se pelo menos duas das três repetições do PCR forem positivas para "Septina 9". O resultado do teste é "NEGATIVO", se pelo menos duas das três repetições do PCR forem negativos para "Septina 9". Os resultados do teste é "INVÁLIDO" em todos os outros casos.

Tabela 16 - Interpretação dos resultados do teste Epi proColon 2.0 CE.

Resultado do teste	Controlo Positivo e Controlo Negativo	Resultados do PCR Individual
POSITIVO	Válido	Pelo menos dois positivos para Septina 9
NEGATIVO	Válido	Pelo menos dois negativos para Septina 9
INVALIDO	Válido	Todos os outros casos
INVÁLIDO	Inválido	n/a

14. Controlo de qualidade

14.1. Controlos externos

O Epi proColon 2.0 CE contém os controlos Epi proColon Positive e Epi proColon Negative (M5-02-003). Estes controlos devem ser incluídos em todas as corridas para monitorizar o sucesso da execução do fluxo de trabalho e para assegurar a viabilidade dos resultados do teste. Os valores dos controlos Epi proColon Positive e Negative devem estar dentro dos limites de validação (ver Tabela 8, ou Tabela 11, ou Tabela 14). Se um controlo se encontra fora da sua variação específica, os resultados do teste associados são inválidos, não devem ser reportados e o teste deve ser repetido.

Se os procedimentos do controlo de qualidade requerem um uso mais frequente dos controlos para verificar os resultados dos testes, siga esses procedimentos.

14.2. Controlos internos

O controlo interno permite a deteção do ADN do gene ACTB (β-actina) convertido por bissulfito. Esta co-amplificação do controlo interno monitoriza a qualidade, a preparação e a adequada concentração de ADN da amostra.

O resultado de PCR para o gene Septina 9 está associado ao valor de Ct ou CP do PCR ACTB (ver Tabela 9, ou Tabela 12, ou Tabela 15). Os Valores de Ct ou CP do PCR ACTB que estão fora do intervalo normal de amplificação invalidam, por isso, o resultado do PCR individual; como tal, valores elevados estão associados a um conteúdo muito baixo de bisADN ou inibição do PCR.

15. Limitações do método

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Este produto foi validado para a combinação dos kits: Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001) ou Epi BiSKit (M7-01-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), e Epi proColon Control Kit (M5-02-003). Estes não podem ser substituídos por outros métodos de extração de ADN ou *kits* de PCR.
- Este produto foi validado para o uso em plasma derivado de sangue colhido com seguintes tubos: BD Vacutainer® K_2EDTA, S-Monovette® 9 ml Potassium-EDTA and S-Monovette® 8.5 ml CPDA tubes. O uso de outros tipos de amostra e outros tubos de colheita não foram validados.
- O armazenamento do sangue em tubos S-Monovette® 8.5 ml CPDA a temperatura que excedam os 25 °C pode levar a resultados falsos positivos.
- O uso deste produto está limitado a pessoal experiente e com formação em técnicas de PCR.
- A deteção do cancro colorectal é dependente da quantidade de ADN tumoral circulante no espécime, e pode ser afetado pelos métodos de colheita e armazenamento da amostra, fatores do paciente (ex. idade, outras doenças) e estado do tumor.
- Os resultados não são uma prova confirmativa da presença ou ausência do cancro colorectal. Qualquer teste Epi proColon 2.0 CE com resultado positivo deve ser confirmado por colonoscopia ou sigmoidoscopia.
- Testes com resultados positivos foram observados em doentes clinicamente diagnosticados com as seguintes doenças: gastrite crónica, esofagite, arterite não-reumatóide, cancro do pulmão, cancro da mama e cancro da próstata.
- Testes com resultados positivos foram observados em mulheres grávidas.
- Os resultados do teste Epi proColon 2.0 CE devem ser avaliados em conjunto com outros parâmetros clínicos.

16. Caraterísticas do desempenho

16.1. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi avaliada por 3 operadores, cada um realizando 4 corridas independentes com um conjunto de 2 x 7 amostras para limites de deteção técnico (LoD samples) com as seguintes concentrações de ADN de células HeLa (positivo para Septina 9): 0, 6, 12, 18, 25, 35 e 50 pg/mL, resultando em 168 determinações de Septina 9. Todas as determinações obtidas no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Dx (software SDS v1.4) foram válidas. Das 144 amostras "LoD" com o ADN de HeLa ("spiked DNA") 133 foram positivas e 24 das 24 amostras sem o ADN de HeLa foram negativas. O LoD_{95} estimado foi determinado por um modelo de regressão logística como sendo 14 pg/ml (CI 95%: 9 pg/mL – 19 pg/mL) para Epi proColon 2.0 CE.

Uma experiência semelhante foi realizada para determinar a sensibilidade analítica utilizando o instrumento LightCycler 480 Instrument I. O LoD_{95} estimado foi equivalente.

16.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade deste procedimento foi testada pelo processamento de alíquotas de plasma de 9 conjuntos de amostras de plasma humano. Seis conjuntos incluem plasma de pacientes diagnosticados com carcinoma colorectal. Três conjuntos incluem plasma de individuos sem qualquer doença aparente. Todos os conjuntos foram processados com 6 repetições, por três operadores diferentes e utilizando diferentes lotes de kits de Epi proColon Plasma Quick (M5-02-001), assim como diferentes lotes do kit Epi proColon Sensitive PCR (M5-02-002). Em 54 das 54 determinações, o resultado esperado (i.e pacientes com cancro, positivos para Septina 9 ; indivíduos sem doença, negativos para Septina 9) foi consistentemente obtido.

16.3. Sensibilidade clínica e específica

O desempenho clínico de Epi proColon 2.0 CE foi determinado com 149 amostras clínicas sem evidências de doença, colhidas numa amostra populacional de risco médio e com 197 espécimes clínicos, num estudo caso controlo, composto por amostras de pacientes com carcinoma colorectal histologicamente confirmado, em todos os estadios, e amostras negativas de indivíduos verificados por colonoscopia, sem evidências da doença.

O ADN convertido por bissulfito foi preparado através de plasma derivado de sangue processado até quatro horas após a colheita com tubos Vacutainer® K_2EDTA (Becton Dickinson). Foram obtidas medições válidas para 346 de 346 espécimes (100 %).

Na amostra populacional, uma das 149 amostras analisadas apresentou um resultado positivo. A taxa estimada de falsos positivos neste grupo de paciente é 1 % (CI 95 %: 0 % - 4 %). Estes números traduzem-se numa especificidade clínica de 99 % (CI 95 %: 96 % - 100 %).

Dos 99 sujeitos do estudo caso controlo sem evidência de doença (controlos), 96 espécimes foram negativos para a presença de metilação do gene Septina 9, resultando numa especificidade clínica estimada de 97 % (CI 95 %: 91 - 99 %), ver a tabela 17.

Dos 98 sujeitos diagnosticados com carcinoma colorectal, 79 espécimes foram positivos para a presença de metilação do gene Septina 9, resultando numa sensibilidade clínica estimada de 81% (CI 95 %: 72 % - 87 %). No caso particular do cancro colorectal precoce e localizado, o teste Epi proColon 2.0 CE foi positivo em 43 (18 estado I, 25 estado II) dos 56 pacientes (77 %).

A tabela abaixo sumariza os dados obtidos.

Tabela 17 - Sumário dos dados do desempenho clínico do teste Epi proColon 2.0 CE.

	Controlos (grupo de rastreio)	**Controlos (caso controlo)**	**Todos os carcinomas colorectais**	**Carcinoma colorectal localizado**
Resultados válidos	149	99	98	56
Positivos para Septina 9	1	3	79	43
Negativos para Septina 9	148	96	19	13
Positividade	1 %	3 %	81 %	77%

16.4. Concordância dos dois instrumentos de PCR em tempo real

A concordância do teste Epi proColon 2.0 CE nos equipamentos Applied Biosystems 7500 Fast Dx System e LightCycler 480 Instrument I foi determinada com medições lado a lado, utilizando 48 amostras de plasma de doentes com carcinoma colorectal, histologicamente confirmado em todos os estados, e 52 amostras de indivíduos sem aparente doença do cólon, verificado por colonoscopia. Em 93% (93/100) dos casos, os dois sistemas de medição originaram resultados concordantes para a Septina 9.

16.5. Interferência

Não foi observada qualquer interferência dentro dos controlos experimentais e amostras reativas ou não reativas testadas com níveis elevados de ADN genómico não metilado (100 ng/mL), bilirrubina (0,20 mg/mL), hemoglobina (1 mg/mL), triglicéridos (12 mg/mL), proteína (albumina de soro humano) (40 mg/mL), glóbulos vermelhos (0,4% v/v), K_2EDTA (20 mg/mL9, colesterol (5mg/mL), ácido úrico (0,235 mg/mL), e glucose (10mg/mL).

17. Significado dos símbolos

	Consulte a instruções de utilização
REF	Número do pedido
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
LOT	Número de lote
	Data de validade
CONTROL -	Controlo Negativo
CONTROL +	Controlo Positivo
	Fabricante
	Armazene à temperatura indicada
Σ	Número de testes
	Uso único
	Código de Identificação Única do Dispositivo UDI (Unique Device Identifier)
Rx Only	Restrito apenas aos EUA: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner."

18. Referências

1. deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clinical Chemistry 55:7, 1337-46 (2009).
2. Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood- based colorectal cancer screening. Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008).
3. Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007).
4. Eads, C.A. et al. MethyLight: a high- throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

19. Contactos

Epi proColon 2.0 CE é fabricado por:

Epigenomics AG
Geneststr. 5
10829 Berlim, Alemanha

Para mais informações envie um e-mail ou ligue para:

support@products.epigenomics.com
Telefone: +49 30 24345 222
Fax: +49 30 24345 555

Notice to Purchaser

Epi proColon (Epi proColon®) e Epi BiSKit™ estamos uma marca registada da Epigenomics AG. Todas as outras marcas registadas, logótipos e nomes comerciais referenciados são propriedade dos respetivos titulares.
LightCycler® 480 System é uma marca registada da F. Hoffmann-La Roche Ltd.
Applied Biosystems®, MicroAmp® são marcas registadas da Life Technologies Corporation; DynaMag™ é uma marca da Life Technologies Corporation.
FAM™, JOE™ and TAMRA™ são marcas da Applera Corporation.
BD Vacutainer® é uma marca registada da Becton Dickinson Inc./Corporation.
S-Monovette® é uma marca registada da Sarstedt AG & Co.
ThermoMixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips advanced® são marcas registadas da Eppendorf AG; Safe LockTM é uma marca da Eppendorf AG.
HandyStep® é uma marca registada da Brand GmbH + Co KG.

A compra deste produto concede ao comprador direitos sobre determinadas patentes da Roche, mas para uso exclusivo de fornecimento de serviços de diagnóstico *in vitro* em humanos. Nenhuma patente geral ou outra licença de qualquer tipo, diferente do direito específico de uso pela compra, é concedida por este meio.