



DBS SCID/AME PCR

Instrução de uso

REF K352

Revisão: Julho/2025

Bioclin · QUIBASA

ÍNDICE

Finalidade	4
Analito	4
Princípio de Ação	4
Composição do kit	5
Apresentação	5
Acessórios	6
Equipamentos e Insumos Operacionais	6
A. Materiais contidos no kit.....	6
B. Materiais Necessários, mas não contidos no kit	6
Condições de Armazenamento e Transporte	7
Cuidados Especiais	7
Amostras	8
Procedimento	9
A.Extração do DNA Genômico	9
B. Preparo da PCR	10
Equipamentos	12
A. Software.....	12
B. Configurações	12
Controles	13
A. Validação dos Controles	13
Interpretação dos Resultados	14
Limitações do Processo	18
Desempenho do Produto E Controle de Qualidade	19
A. Exatidão	19

B. Precisão	19
C. Sensibilidade Clínica	21
D. Sensibilidade Analítica	21
E. Linearidade	22
Segurança	22
Significado Diagnóstico	22
Referências Bibliográficas	23
Atendimento ao Consumidor	25
Simbologia Universal	26

FINALIDADE

Os kits da FAMÍLIA BIO GENE DBS SCID/AME PCR foram desenvolvidos para detecção quantitativa de Círculo de Excisão do Receptor de Células T (*T-cell receptor excision circle* [TREC]), Círculos de Excisão de Recombinação por Deleção de Kappa (*Kappa-deleting recombination excision circle* [KREC]), bem como para detecção qualitativa do gene *SMN1* em amostras de sangue seco coletadas em papel filtro (DBS), como auxílio na triagem da Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) e da Atrofia Muscular Espinhal (AME), em neonatos, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

ANALITO

Por meio dos kits da FAMÍLIA BIO GENE DBS SCID / AME PCR são realizadas as determinações quantitativas de TREC, KREC, e qualitativa de *SMN1*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Os kits da FAMÍLIA BIO GENE DBS SCID/AME PCR possui metodologia dividida em 2 etapas: obtenção do material genético através da extração do DNA genômico (gDNA) e posterior amplificação para detecção dos alvos TREC, KREC, *SMN1* e RNase P (controle endógeno).

1. O método de extração do DNA se baseia na adição de uma amostra de sangue coletado em papel de filtro (DBS) de 3.2mm em tubo/placa de PCR (não óptica), adição do reagente **Solução de Lavagem DBS (R1)**, centrifugação por 1 minuto a 2400 rpm, e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação de 1500 rpm. Em seguida a amostra deve ser centrifugada brevemente (*spindown*), o sobrenadante descartado e o reagente **Água (R5)** deve ser adicionado para completa lavagem da amostra. O novo sobrenadante formado deve ser descartado. Deve-se realizar uma centrifugação breve (*spindown*) e adicionar o reagente **Solução de Extração Rápida (R3)**. Após a adição do **R3**, deve-se incubar a 95°C por 5 minutos para ruptura de membranas, desnaturação de proteínas, carboidratos e lipídeos. Após a incubação, seguir com a adição de solução estabilizadora.

2. A amplificação será realizada por meio de um termociclador de PCR em

Tempo Real para amplificar e detectar as sondas fluorescentes específicas para cada alvo (FAM, VIC, JUN e Cy5). O software do aparelho detecta os alvos TREC, KREC, *SMN1* e RNase P (controle endógeno).

COMPOSIÇÃO DO KIT

A Família Bio Gene DBS SCID/AME PCR é composta pelo kit K352 que contém reagentes para extração e amplificação.

R1 - Solução de Lavagem DBS: PBS1x, Surfactante Não Iônico - 0,5% (p/v). Conservar entre 2 e 8 °C.

R2 - Solução Estabilizadora: Surfactante Não Iônico - 10%, Tris-HCL (pH 8,0) \leq 10mM, EDTA \leq 1mM. Conservar entre 2 e 8 °C.

R3 - Solução de Extração Rápida: Tween-20, Tris-HCl (pH 7,5–9,0), NaCl ou KCl, EDTA, Proteinase K, DTT (dithiothreitol), e estabilizantes. Conservar entre 2 e 8 °C.

R4 - Mix Taq: Polimerase (TAQ DNA Polimerase \leq 1,0 U/mL), dNTPs (\leq 50mM), MgCl₂ (\leq 50 mM), estabilizantes (Glicerol 10% (v/v), KCl \leq 500mM). Conservar entre 2 e 8 °C.

R5 - Água: Água livre de DNase e RNase. Conservar entre 2 e 8 °C.

R6 - Solução PCR: Primers \leq 500 pmol/mL, Sondas (FAM™/MGB-NFQ, VIC™/QSY™, JUN™/QSY™, CY5™/QSY2™ - Oligonucleotídeos \leq 100 pmol/ μ L), TRIS-HCl (pH 8,0) \leq 500mM. Conservar a -20 °C.

APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação	
	BIO GENE DBS SCID/AME PCR	
	96 Testes	384 Testes
R1	1 x 16 mL	1 x 60mL
R2	1 x 4,0 mL	1 x 16 mL
R3	1 x 500 μ L	1 x 2 mL
R4	1 x 1,0 mL	1 x 2,9 mL

R5	1 x 15 mL	1 x 60 mL
R6	1 x 100 µL	1 x 300 µL

ACESSÓRIOS

Os kits da FAMÍLIA BIO GENE DBS SCID/AME PCR podem ser comercializados com ou sem acessórios (placas para extração).

Todos os reagentes são fornecidos na forma líquida. Proceda da seguinte forma:

1. Antes do uso, verifique a integridade dos reagentes, atentando-se às condições de armazenamento recomendadas.
2. Homogeneização: Caso necessário, agite suavemente cada frasco para garantir a homogeneidade da solução. Após a homogeneização, realize uma centrifugação rápida para remover possíveis resíduos aderidos às paredes do frasco.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

A. Materiais contidos no kit:

- Reagentes conforme descrito no item Composição do Kit.
- Instrução de uso (manual).

B. Materiais necessários, mas não contidos no kit:

São necessários os seguintes itens para a realização do ensaio, que não acompanham o kit:

- 1- Termociclador de PCR em tempo real: com sistema ótico programável (compatível com os fluoróforos FAM, VIC, JUN e Cy5)
- 2- Capela de fluxo laminar: Para manipulação segura das amostras e reagentes.
- 3- Centrifuga com adaptador para placas: Compatível com placas de 96 ou 384 poços.
- 4- Vórtex ou shaker de microplaca.
- 5- Microcentrifuga: Capaz de operar entre 3.000 e 12.000 rpm.
- 6- Micropipetas e ponteiras estéreis com filtro: Para os volumes necessários (0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL).
- 7- Placas para PCR: Placas de 96 ou 384 poços, juntamente com selos óticos compatíveis.
- 8- Materiais plásticos e consumíveis: Tubos de polipropileno, reservatórios etc.
- 9- Controles DBS contidos no kit K356.
- 10- Calibradores contidos no kit K357.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

Transporte:

O kit deve ser transportado em temperatura entre 2°C e 8°C, por um período máximo de 72 horas, protegido da luz direta e da umidade.

Armazenamento:

Para manter a integridade dos reagentes, ao receber o kit armazene os itens abaixo conforme as especificações indicadas:

R1, R2, R3, R4 e R5 – armazenar entre 2°C e 8°C

R6 – armazenar a -20°C

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. Evitar contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossóis. 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 nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção, requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.
5. É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos amplificados. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos para amplificação.
6. Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiras com filtro. As ponteiras 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 sejam 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 FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site 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

A. Tipo de Amostra: Sangue Seco coletado em papel filtro (DBS) – punção de calcanhar em neonatos

B. Coleta e preparo: As amostras de sangue seco em papel-filtro (DBS) destinadas à detecção de TREC, KREC e *SMN1* em triagem neonatal requerem condições específicas de preparo e armazenamento e transporte para garantir a estabilidade do DNA e a precisão dos resultados.

Após a coleta, por punção de calcanhar em neonatos em papel de filtro, as amostras devem ser secas em temperatura ambiente (entre 15 °C e 30 °C) por um período mínimo de 3 horas, posicionadas horizontalmente para assegurar uma distribuição homogênea do sangue.

C. Estabilidade: Para o armazenamento a curto prazo (para períodos de até um mês), as amostras de DBS podem ser mantidas em temperatura ambiente controlada (entre 15°C e 30°C), desde que protegidas da luz direta e da umidade^{1,2,3}.

Para armazenamentos a longo prazo (por até aproximadamente 20 anos), recomenda-se acondicioná-las em sacos plásticos hermeticamente fechados, contendo dessecantes, e armazená-las em temperaturas entre 0°C e -30°C^{1,4,5,6,7,8}.

D. Transporte: O transporte das amostras também deve ser levado em consideração pois é crucial proteger as amostras de condições adversas, como calor excessivo e umidade elevada, que podem comprometer a qualidade do DNA. O uso de embalagens térmicas adequadas e a

manutenção das amostras em temperaturas controladas são práticas recomendadas para assegurar a estabilidade das amostras até a chegada ao laboratório^{2,7}.

Ao seguir essas diretrizes, é possível garantir a confiabilidade dos resultados na triagem neonatal para TREC, KREC e *SMN1*.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA genômico

O procedimento de extração do DNA genômico segue o protocolo descrito abaixo:

1) Obter do *punch/spot* de 3.2 mm de sangue seco colhido em papel de filtro (DBS);

2) Transferir cada *punch* para cada *well* de uma placa de PCR (não óptica), onde será realizada o procedimento de extração;

3) Adicionar 150 µL da **Solução de Lavagem DBS (R1)**, selar e centrifugar a placa por 1 minuto a 2400 rpm;

4) Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação de 1500 rpm;

5) Centrifugar brevemente, descartar o sobrenadante e adicionar 150 µL de **Água (R5)** para uma segunda lavagem do DBS;

6) Centrifugar e descartar o sobrenadante;

7) Adicionar 5 µL da **Solução de Extração Rápida (R3)** e incubar por 5 minutos a 95°C;

8) Centrifugar brevemente e adicionar 35 µL da **Solução Estabilizadora (R2)** para obter o produto da extração.

ATENÇÃO:

1 - A amostra após a realização da etapa descrita no passo 4 deve apresentar uma coloração rosa claro. Caso não apresente, deve centrifugar e adicionar 150 µL **R1** (passo 3) e todas as etapas subsequentes.

2 - Nas etapas em que é realizado o descarte dos sobrenadantes deve evitar que se forme volumes residuais junto ao *punch*, pois sobras de

lavagens podem afetar o produto final da extração.

3 – Após a incubação a 95°C descrita na etapa 7, deve-se aguardar que a placa retorne a temperatura ambiente. Caso necessário é possível colocar a placa selada em cima do gelo de modo que a temperatura volte a temperatura ambiente.

B. Preparo da PCR

Placa de 96 poços

- 1) Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostra, controles e calibradores 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 (R4)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R6)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL

* 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 11 µL da solução de PCR final (**R4 + R6**) nos tubos ou poços determinados para as reações.

4) Adicionar amostras; controles e calibradores nos respectivos poços conforme abaixo:

- 9 µL do DNA extraído das amostras de DBS neonatos em duplicata;
- 9 µL do Controle Negativo (NTC);
- 9 µL de cada calibrador (ponto 1 - 4) em duplicata nos respectivos poços.
- 9 µL do DNA do extraído do Controle 1 Negativo – RNase P;
- 9 µL do DNA do extraído do Controle 2 Positivo – alta concentração;
- 9 µL do DNA do extraído do Controle 3 Positivo – baixa concentração;

Nota: os controles e calibradores podem ser adquiridos separadamente

- 5) Proceder com a homogeneização de modo a evitar a formação de bolhas.
- 6) Observar que o volume total da reação é de 20 µL. Recomenda-se que todas as reações de PCR em tempo real incluam os controles relevantes (NTC, Controles DBS e/ou Calibradores) em duplicata para garantir a validade do ensaio.
- 7) Transportar os tubos/placa para o termociclador.

Placa 384 poços

- 1) Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostra, controles e calibradores 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 (R4)	7,5 µL	187,5 µL	375 µL	750 µL
Solução PCR (R6)	0,75 µL	18,75 µL	37,5 µL	75 µL

* 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 8,25 µL da solução de PCR final (**R4 + R6**) nos tubos ou poços determinados para as reações.

4) Adicionar amostras; controles e calibradores nos respectivos poços conforme abaixo:

- 6,75 µL do DNA extraído das amostras de DBS neonatos;
- 6,75 µL do Controle Negativo (NTC);
- 6,75 µL de cada calibrador (ponto 1 - 4) em duplicata nos respectivos poços.
- 6,75 µL do DNA do extraído do Controle 1 Negativo – RNase P;
- 6,75 µL do DNA do extraído do Controle 2 Positivo – alta concentração;
- 6,75 µL do DNA do extraído do Controle 3 Positivo – baixa concentração;

Nota: os controles e calibradores podem ser adquiridos separadamente

- 5) Proceder com a homogeneização de modo a evitar a formação de bolhas.
- 6) Observar que o volume total da reação é de 15 µL. Recomenda-se que todas as reações de PCR em tempo real incluam os controlos relevantes (NTC, Controlos DBS e/ou Calibradores) em duplicata para garantir a validade do ensaio.
- 7) Transportar os tubos/placa para o termociclador.

Nota 1: Os controlos (1-3), 1 - Negativo, 2 e 3 Positivos, estão presentes no K356 e podem ser adquiridos separadamente.

Nota 2: Os calibradores (1-4), estão presentes no K357 e podem ser adquiridos separadamente.

EQUIPAMENTOS

Para a realização da técnica é necessário um equipamento termociclador em Tempo Real com capacidade de leitura para as sondas FAM, VIC, JUN e Cy5.

A. Software

Os kits da FAMÍLIA BIO GENE DBS SCID/AME PCR podem ser usados em termocicladores de marcas e modelos diferentes como por exemplo Quantstudio 5, Gentier 96 E, desde que contenham capacidade de leitura para as sondas FAM, VIC, JUN e Cy5. Portanto, os *softwares* das análises são variáveis de acordo com as marcas e modelos dos equipamentos termocicladores utilizados.

B. Configurações

As configurações dos ensaios devem ser inseridas nos *softwares* dos equipamentos/termocicladores conforme descrições abaixo:

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo para os alvos TREC, KREC e Qualitativo para o alvo *SMN1* e RNase P (controle interno).

2-Definição dos detectores (sondas) fluorescentes:

Alvo	Detector	Quencher
------	----------	----------

SMN1	FAM	MGB-NFQ
TREC	JUN	QSY
KREC	VIC	QSY
RNase P	Cy5	QSY2

3 - Defina as condições dos ciclos:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	40
3	60°C*	30 segundos	

*Defina "Data Collection" como "stage 3" (60°C - 0:30)".

CONTROLES:

A. Validação dos Controles

Controles	Faixa permitida/CT	Amplificação/ Detecção
TREC Positivo KREC Positivo SMN1 Positivo	*Verificar desvio permitido lote a lote	Válida
NTC	Indeterminado	Válida
RNase P (Controle Endógeno)	Cy5 = $\geq 20 \leq 30$	Válida

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados de cada alvo devem ser interpretados de acordo com as tabelas a seguir:

- Parâmetros de avaliação da amostra	- Parâmetros de avaliação dos resultados obtidos para o alvo RNase P (Cont. Endógeno Cy5) - Valores de CT do alvo RNase P
Amostras que não atendem aos parâmetros podem gerar resultados anômalos ou falsos. Problemas incluem: preenchimento irregular do DBS, coleta/secagem inadequada, corte próximo à borda, eluição deficiente por degradação térmica/umidade e armazenamento inadequado (sem sachê dessecante ou fora da faixa de -10°C a -20°C), que pode gerar contaminação microbiológica;	As curvas de amplificação do alvo RNase P devem seguir um padrão sigmoidal bem definido, com amplificação logarítmica na fase exponencial até o platô. Os valores de Ct devem estar entre 20 e 30.

<ul style="list-style-type: none"> - Parâmetros de avaliação dos resultados obtidos para o alvo SMN1 (FAM) - Valores de Ct do alvo SMN1 - Interpretação do Resultado SMN1 (FAM) 	<ul style="list-style-type: none"> - Parâmetros de avaliação dos resultados obtidos para o alvo KREC (VIC) - Valores de Ct do Alvo KREC - Interpretação do Resultado KREC (VIC) 	<ul style="list-style-type: none"> - Parâmetros de avaliação dos resultados obtidos para o alvo TREC (JUN) - Valores de Ct do Alvo TREC - Interpretação do Resultado TREC (JUN)
<p>Determinação qualitativa Determinação qualitativa através de controle positivo.</p> <p>Parâmetros de amplificação 1. Curvas de amplificação devem seguir um padrão sigmoidal bem definido. 2. Amplificação logarítmica na fase exponencial até o platô. 3. Linha de base estabelecida nos ciclos iniciais, sem aumento significativo de sinal.</p>	<p>Quantificação do alvo KREC Feita por quantificação absoluta com calibradores de 4 pontos ($10^4 - 10^1$ cp/μL), no mínimo em duplicata.</p> <p>Parâmetros de amplificação 1. Curvas de amplificação devem seguir um padrão sigmoidal bem definido. 2. Amplificação logarítmica na fase exponencial até o platô. 3. Linha de base estabelecida nos ciclos iniciais, sem aumento significativo de sinal.</p> <p>Critérios de qualidade da reação 1. Eficiência entre 90-110%, garantindo duplicação correta do DNA a cada ciclo.</p>	<p>Quantificação do alvo TREC Feita por quantificação absoluta com calibradores de 4 pontos ($10^4 - 10^1$ cp/μL), no mínimo em duplicata.</p> <p>Parâmetros de amplificação 1. Curvas de amplificação devem seguir um padrão sigmoidal bem definido. 2. Amplificação logarítmica na fase exponencial até o platô. 3. Linha de base estabelecida nos ciclos iniciais, sem aumento significativo de sinal.</p>

<p>Interpretação dos resultados</p> <p>1. Para o alvo SMN1, é necessário avaliar a ocorrência de uma curva de amplificação com padrão sigmoidal claramente definido ou sua ausência.</p>	<p>2. Coeficiente de correlação (R^2) $\geq 0,98$, indicando alta linearidade e precisão.</p> <p>Interpretação dos resultados</p> <p>1. Cada laboratório deverá definir os seus valores de referência baseado na testagem de um n amostral de neonatos que seja suficiente para estabelecer a distribuição normal do número de cópias/μL de KREC presente na população.</p> <p>2. Os valores de cópias obtidos na validação do BIO GENE DBS SCID / AME PCR para o alvo KREC foi de ≤ 25 cópias/μL. Esse valor (≤ 25 cópias/μL) irá auxiliar na interpretação do resultado obtido pelo laboratório com base no valor de corte estabelecido, conforme descrito no item 1.</p>	<p>Critérios de qualidade da reação</p> <p>1. Eficiência entre 90-110%, garantindo duplicação correta do DNA a cada ciclo.</p> <p>2. Coeficiente de correlação* (R^2) $\geq 0,98$, indicando alta linearidade e precisão.</p> <p>Interpretação dos resultados</p> <p>1. Cada laboratório deverá definir os seus valores de referência baseado na testagem de um n amostral de neonatos que seja suficiente para estabelecer a distribuição normal do número de cópias/μL de TREC presente na população.</p>
---	--	---

		<p>2. Os valores de cópias obtidos na validação do BIO GENE DBS SCID / AME PCR para o alvo TREC foi de ≤ 25 cópias/μL. Esse valor (≤ 25 cópias/μL) irá auxiliar na interpretação do resultado obtido pelo laboratório com base no valor de corte estabelecido, conforme descrito no item 1.</p>
<p>Causa de detecção de baixo número de cópias de KREC não relacionadas a SCID¹¹</p>		
<p>1- Neonatos expostos de forma transversal durante o desenvolvimento intrauterino a fármacos da classe de imunossupressores. 2- Agamaglobulinemia</p>		
<p>Causa de detecção de baixo número de cópias de TREC não relacionadas a SCID^{12,13,14,15}</p>		
<p>1-Neonatos expostos de forma transversal durante o desenvolvimento intrauterino a fármacos da classe de imunossupressores 2- Síndrome de DiGeorge, 3- Síndrome de Omenn, 4- SCID de vazamento, 5- SCID deficiente de ADA, 6- Neonatos prematuros</p>		
<p>Homologia entre <i>SMN1</i> e <i>SMN2</i>¹⁶</p>		

1-Devido à alta homologia de *SMN1* e *SMN2*, o kit Bio Gene DBS SCID/ AME PCR foi desenvolvido com um bloqueador para *SMN2* a fim de aumentar a especificidade e precisão na detecção do *SMN1*.

2-Amostras que apresentem deleção homozigótica para *SMN1* e na presença de um número elevado de cópias de *SMN2* (maior que o que seria biologicamente esperado), o ensaio ainda é capaz de detectar a presença de um homozigoto *SMN1*.

Controle Negativo – NTC (No Template Control)

1-Ausência de amplificação e CT para o Controle Negativo NTC

2-Se houver amplificação no NTC, pode indicar contaminação e o teste deve ser refeito.

Eficiência da Reação (E) e Coeficiente de Correlação (R²)

1-A eficiência da reação deve estar entre 90-110%, o que demonstra que a amplificação está eficiente e que a quantidade de DNA está sendo duplicado a de a cada ciclo;

Considerações Importantes

- Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com dados clínicos e laboratoriais adicionais.
- A confirmação diagnóstica deve ser feita por testes complementares específicos e avaliação médica especializada, visto que o kit BIO GENE DBS SCID/AME PCR é um kit de triagem, e não confirmatório.
- Resultados inconclusivos ou duvidosos podem exigir repetição do teste ou coleta de nova amostra.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Interferências:

Contaminantes presentes na amostra ou reagentes podem inibir a amplificação, ocasionando falsos-negativos (hemoglobina, heparina, detergentes na amostra, dentre outros).

Contaminação Cruzada:

A manipulação inadequada ou o fluxo incorreto entre áreas “limpas” e “sujas” pode comprometer os resultados.

Qualidade do DNA:

Amostras com quantidade insuficiente ou degradadas podem resultar em testes inválidos (insuficiência de sangue no papel-filtro, secagem inadequada do papel-filtro).

DESEMPENHO DO PRODUTO E CONTROLE DE QUALIDADE

O Kit BIO GENE DBS SCID / AME PCR foi validado para a detecção de TREC, KREC e *SMN1* em amostras de sangue seco em papel-filtro (DBS), utilizando PCR em tempo real. Abaixo estão os parâmetros de desempenho avaliados durante os estudos de validação.

A. EXATIDÃO

A exatidão do ensaio foi determinada comparando os resultados obtidos com este kit em relação a um método de referência ou a um painel de amostras previamente caracterizadas.

- Concordância com o método de referência (%): >99,9%
- Número total de amostras testadas: 200 amostras

B. PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada analisando amostras em replicatas dentro da mesma corrida, em condições idênticas de reagentes, equipamentos e operadores.

Conclusão

Coefficiente de Variação (CV%) e desvio-padrão intra-ensaio

Coeficiente de Variação			
Amostra	TREC	KREC	<i>SMN1</i>
Amostra65	1,20%	0,54%	0,96%
Amostra90	1,14%	1,01%	1,26%
Amostra193	0,97%	0,81%	1,09%

Desvio-padrão			
Amostra	TREC	KREC	SMN1
Amostra65	0,364	0,157	0,251
Amostra90	0,350	0,292	0,331
Amostra193	0,341	0,295	0,287

Média			
Amostra	TREC	KREC	SMN1
Amostra65	30,34	28,83	26,09
Amostra90	30,62	28,73	26,31
Amostra193	35,26	36,26	26,26

Os valores de CV e desvio-padrão atendem ao critério estabelecido, indicando boa repetibilidade do experimento.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada considerando a variação entre diferentes dias, lotes de reagentes e operadores.

Conclusão

Coefficiente de variação (CV%) inter-ensaio:

Amostra	Amostra 65			Amostra 90		
	Desvio Padrão	Média	CV	Desvio Padrão	Média	CV
Desvio Padrão	0,31	28,92	1,01%	0,36	28,73	1,14%
Média	30,25	26,31	1,20%	0,33	26,22	1,54%
CV	1,03%	26,31	1,20%	0,40	26,22	1,54%

Amostra	Amostra 90		
Desvio Padrão	0,36	0,33	0,40
Média	30,41	28,73	26,22
CV	1,17%	1,14%	1,54%

Os resultados indicam que o kit atende aos critérios, com coeficiente de variação menor que 5% e o desvio-padrão de todos os genes em todas as amostras são menores que 0,5 Ct.

C. Sensibilidade Clínica

A sensibilidade clínica foi determinada com base na detecção de amostras previamente classificadas como positivas para SCID e AME, avaliando a taxa de detecção correta pelo ensaio.

Estatística	Valor	IC de 95%
Sensibilidade	100,00%	92,89% a 100,00%
Especificidade	100,00%	97,57% a 100,00%
Valor Preditivo Positivo (*)	100,00%	92,89% a 100,00%
Valor Preditivo Negativo (*)	100,00%	97,57% a 100,00%
Precisão (*)	100,00%	98,17% a 100,00%

- Sensibilidade clínica para SCID (%): >99,9%
- Sensibilidade clínica para AME (%): >99,9%
- Número de amostras clínicas testadas: 200

D. Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica foi determinada com base no limite de detecção

(LoD), definido como a menor quantidade de cópias detectáveis com alta reprodutibilidade.

- LoD para TREC: 1 cópia/ μ L
- LoD para KREC: 2 cópias/ μ L
- LoD para *SMN1*: 1 cópia/ μ L

E. Linearidade

A linearidade do ensaio foi determinada por meio de diluições seriadas do padrão quantitativo, avaliando a relação entre a concentração do alvo e os valores de Ct obtidos.

- TREC: 18 cópias/ μ L
- KREC: 6 cópias/ μ L
- *SMN1*: Linearidade não se aplica para teste qualitativo.

SEGURANÇA

Cuidados Gerais e Químicos

Manuseio dos Reagentes:

- Leia a Ficha com Dados de Segurança (FDS) antes do uso.
- Utilize Equipamentos de Proteção Individual (luvas, avental, proteção ocular).

Armazenamento:

Mantenha os reagentes sob condições ideais, evitando exposição à luz intensa e variações de temperatura.

Biossegurança

Amostras Biológicas:

- Trate todas as amostras como potencialmente infecciosas.
- Realize a extração e manipulação dos DBS em capela de fluxo laminar.
- Descarte:

Descarte resíduos (amostras, ponteiros, tubos) de acordo com as normas locais e internacionais de biossegurança.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Imunodeficiência Combinada Grave (SCID):

As imunodeficiências primárias incluem um grupo de doenças genéticas raras que comprometem o desenvolvimento e a função do sistema imunológico. A triagem neonatal para essas condições utiliza a quantificação de TREC (Círculos de Excisão do Receptor de Células T) e KREC (Círculos de Excisão de Recombinação por Deleção de Kappa), que refletem a produção recente de linfócitos T e B, respectivamente.

TREC:

- Representa a formação de células T no timo.
- Níveis reduzidos de TREC indicam deficiência grave de células T, sendo um marcador crucial para a detecção da Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) e outras síndromes de linfopenia T.

KREC:

- Reflete a maturação de células B na medula óssea.
- Níveis baixos de KREC sugerem deficiência na produção de linfócitos B, como ocorre na agamaglobulinemia ligada ao X (XLA) e em outras desordens que afetam a imunidade humoral.

A avaliação simultânea de TREC e KREC permite diferenciar SCID clássico (que pode afetar tanto células T quanto B e NK) de outras imunodeficiências primárias que impactam seletivamente a produção de linfócitos B.

Esse teste de triagem neonatal possibilita a identificação precoce dessas condições, permitindo intervenção médica imediata e aumentando as chances de um melhor prognóstico.

Atrofia Muscular Espinhal (AME):

A Atrofia Muscular Espinhal (AME) é uma doença neuromuscular genética autossômica recessiva caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores na medula espinhal, resultando em fraqueza muscular severa e, nos casos mais graves, insuficiência respiratória precoce.

A principal causa da AME é a deleção homozigótica do éxon 7 do gene *SMN1* (Survival Motor Neuron 1). Esse gene é responsável pela produção da proteína *SMN1*, essencial para a sobrevivência dos neurônios motores. A não detecção ou Ct elevado para *SMN1* sugere deleção do éxon 7, sendo compatível com AME.

A detecção precoce de SCID e AME por triagem neonatal possibilita a intervenção terapêutica antecipada com tratamentos modificadores da doença como transplante de medula óssea e terapia gênica, melhorando significativamente o prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLSI (2020): Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13 2nd Edition. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute

2. Chaisomchit, S. et al. (2005): Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *SEA J Trop Med PH.* 36(1), 270-273.
3. Dissing, J. et al. (2010): Exploring the limits for survival of DNA in blood stains. *J Forensic Leg Med* 17, 392–396.
4. Hollegaard, M.V. et al. (2011): Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spot samples as a DNA source. *BMC Genetics.* 12(58), 1-7.
5. CLSI (2013): Newborn Blood Spot Screening for Severe Combined Immunodeficiency by Measurement of T-cell Receptor Excision Circles; Approved Guideline. CLSI document NBS06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. (amostras DBS armazenamento).
6. CLSI (2021): Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening, 7th Edition – 7th Edition. CLSI document NBS01. Clinical and Laboratory Standards Institute
7. Hollegaard M.V. et al. (2013): Archived neonatal dried blood spot samples can be used for accurate whole genome and exome-targeted next-generation sequencing. *Mol Genet Metab.* 110(1-2), 65–72.
8. Grauholm J. et al. (2015): Gene expression profiling of archived dried blood spot samples from the Danish Neonatal Screening Biobank. *Mol Genet Metab.* 116(3), 119– 124.
9. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA.* 2014;312(7):729-38.
10. <https://iname.org.br/>
11. Triagem neonatal de imunodeficiências graves combinadas por meio de TRECS e KRECS: segundo estudo piloto no Brasil. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2017;35;1;00013>
12. Chan, K. & Puck, J. (2005): Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Allergy Clin Immunol* 115, 391–398.
13. Dissing, J. et al. (2010): Exploring the limits for survival of DNA in blood stains. *J. Forensic Leg Med* 17, 392–396.
14. Comeau, A.M. et al. (2010): Guidelines for implementation of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Inherit Metab Dis.* 33(Suppl 2): S273–281.
15. Verbsky, J.W. et al. (2012): Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008-2011). *J Clin Immunol.* 32(1):82–88.
16. EFinkel, RS, et al. (2017). "The role of SMN2 copy number in spinal muscular atrophy: implications for therapy." *American Journal of Human Genetics.* 100(5), 837-847. DOI: [10.1016/j.ajhg.2017.03.016].

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Para esclarecimentos, suporte técnico e informações adicionais, entre em contato com:

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Site: <https://www.bioclin.com.br/>

Número de registro do kit BIO GENE DBS SCID/AME PCR na ANVISA:
10269360472

Esta bula deve ser lida atentamente antes de iniciar qualquer procedimento. O não cumprimento das instruções contidas pode comprometer a acurácia do ensaio e a segurança do paciente. Em caso de dúvidas, contate o suporte técnico.

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> TESTE		INFLÁMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO



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
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira