

RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975



1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in-vitro*. O RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* é uma PCR em tempo real multiplex para a detecção direta e qualitativa de *Trichomonas vaginalis* de esfregaços vaginais e urina humanos.

A PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* destina-se ao uso como auxílio em diagnósticos de Tricomoniase causada por *Trichomonas vaginalis*.

2. Sumário e explicação do teste

Trichomonas vaginalis é um parasita patogênico humano que infecta a área genital. Pode levar à tricomoníase, onde os órgãos sexuais e também o trato urinário podem ser afetados. A tricomoníase é transmitida por relações sexuais e é transmitida por secreção vaginal ou esperma, indicando o potencial de infecção tanto para homens como mulheres. Em todo o mundo, 120 milhões de casos são descritos anualmente, enquanto a taxa de prevalência mais alta é conhecida em mulheres.¹

De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), cerca de 3,7 milhões de pessoas estão infectadas com *Trichomonas vaginalis* nos EUA. No entanto, apenas 30% dos infectados apresentam sintomas.² Os sintomas atingem desde desconforto na área vaginal com micção até ao corrimento. Durante a infecção por *Trichomonas vaginalis* em mulheres, também é observada uma miscolonização da flora vaginal com outros patógenos. Por exemplo, *Gardnerella vaginalis* ou vários patógenos nas fezes geralmente acompanham uma infecção por *Trichomonas vaginalis*. Nas mulheres grávidas, uma infecção por *Trichomonas vaginalis* pode levar a complicações adicionais, como parto prematuro ou ruptura prematura da membrana.³ As complicações nos homens são, entre outras, infertilidade ou prostatite.

Além da miscolonização da flora vaginal, o *Trichomonas vaginalis* também desempenha um papel importante como cofator durante a transmissão do HIV.² O padrão ouro para o diagnóstico ainda é cultura, porém a sensibilidade é de apenas 80% e com tempo de resultado de até 7 dias não é adequado para diagnóstico oportuno.

3. Princípio do teste

O RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* é uma PCR em tempo real para a detecção direta e qualitativa de *Trichomonas vaginalis* de esfregaços vaginais e também da urina.

Depois do isolamento do DNA, ocorre a ampliação do fragmento do gene (ITS1, se presente) específico para *Trichomonas vaginalis*.

Os alvos amplificados para *Trichomonas vaginalis* são detectados com sondas de hidrólise, que estão marcadas em uma extremidade com um supressor e na outra extremidade com um corante repórter fluorescente (fluoróforo). Na presença de um alvo, as sondas hibridizam para os fragmentos amplificados. Durante a fase de extensão, a **Taq-Polymerase** quebra a proximidade entre o repórter e o supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade ótica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* contém um **Internal Control DNA** (ICD) como um monitoramento interno do procedimento de preparação de amostra a fim de determinar a eventual inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tab. 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarelo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	vermelho
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	laranja
N	No Template Control	1x	450 µl	branco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instruções de armazenamento

- Proteja todos os reagentes da luz e armazene a -20 °C. Todos os reagentes podem ser usados até ao fim do prazo de validade. Depois de vencido o prazo, a garantia da qualidade já não é válida.
- Descongele cuidadosa e completamente os reagentes antes do uso (por ex., em um refrigerador a 2 - 8 °C).
- Os reagentes podem sustentar até 5 ciclos de congelamento sem influenciar o desempenho do teste (por ex., após o primeiro descongelamento, separe-os em alíquotas e congele-os imediatamente).
- Durante a preparação da PCR, todos os reagentes devem ser conservados a frio de forma adequada (2 - 8 °C).

6. Reagentes adicionais e equipamentos necessários

O teste de PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Trichomonas vaginalis é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

Tab. 2: Equipamento necessário

Plataformas de extração	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Instrumentos de PCR em tempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Indicação: No Rotor-Gene Q (QIAGEN), use apenas tubos de 0,1 ml.

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em mdx@r-biopharm.de.

- Cotonetes estéreis livres de meio em rayon ou nylon flocculado (p. ex., Copan Diagnostic Inc., catálogo n.º 155C ou 552C)

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para ser usado com o LightCycler® 480II

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para ser usado com o LightCycler® 2.0

- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, película)

- Centrífuga com um rotor para tubos de ensaio

- Vortexer

- Pipetas (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

- Ponteiros de filtro

- Luvas descartáveis sem pó

- Água de PCR (água tratada DEPC de grau BioScience, livre de nuclease)

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para utilização em diagnóstico *in-vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

- A extração, a preparação da PCR e a execução da PCR devem ser separadas em salas diferentes para evitar contaminações cruzadas.

- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais expostos às amostras, devendo ser manuseados conforme os regulamentos nacionais de segurança.

- Não use o kit após o prazo de validade.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Para obter mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em www.r-biopharm.com.

8. Coleta e armazenamento

8.1 Preparação do DNA

Para isolamento de DNA de cotonetes secos, use o kit de isolamento de DNA disponível (por ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de DNA (por ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante.

No isolamento de DNA de cotonetes secos, é recomendado o seguinte procedimento: adicione 400 µl de água PCR em um tubo de preparação; insira o cotonete na água, esprema e corte ou quebre a haste do cotonete; tampe o tubo de preparação firmemente, agite no vórtex rapidamente e continue de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração de DNA ou sistema de extração de DNA (consulte também [Maxwell® RSC Application ER101](#)).

Para isolamento de DNA da urina, use o kit de isolamento de DNA disponível comercialmente (por ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de DNA (por ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o DNA de acordo com as instruções do fabricante (consulte também [Maxwell® RSC Application ER100](#)).

O teste RIDA®GENE Trichomonas vaginalis contém um [Internal Control DNA](#) que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O [Internal Control DNA](#) pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o [Internal Control DNA](#) for usado apenas como controle de inibição de PCR, deve ser adicionado 1 µl de [Internal Control DNA](#) à mistura principal (consulte a Tab.4).

Se o [Internal Control DNA](#) for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µl do [Internal Control DNA](#). O [Internal Control DNA](#) deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µl do [Internal Control DNA](#) à mistura de PCR do controle negativo e positivo.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

Calcule o número total de reações PCR (reações de amostra e de controle) necessárias. Em cada ensaio realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomendamos calcular um volume adicional de 10 % para compensar pipetagens imprecisas (ver Tab. 3. Tab. 4). Antes de usar, descongele, misture cuidadosamente e centrifugue brevemente a **Reaction Mix**, a **Taq-Polymerase**, e **Positive Control**, o **No Template Control** e o **Internal Control DNA**. Mantenha os reagentes frios o suficiente durante a etapa (2 a 8 °C).

Tab. 3: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD como extração e controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

Tab. 4: Cálculo e exemplo de pipetagem para 10 reações da mistura principal (ICD apenas como controle de inibição da PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifugue brevemente.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (tubo ou placa).

Controle negativo: Adicione 5 µl de **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle negativo.

Amostra: Adicione 5 µl de extrato de DNA à mistura principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl do **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control DNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control DNA** à mistura de PCR do controle positivo.

Cubra os tubos ou a placa. Centrifugue e coloque no instrumento de PCR em tempo real. A reação de PCR deve ser iniciada de acordo com as definições do instrumento de PCR (consulte Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab.8).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

Tab. 5: Perfil de PCR em tempo real para LightCycler® series e Rotor-Gene Q

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 6: Perfil de PCR em tempo real para Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

9.3.2 Perfil de PCR em tempo real universal

Indicação: O perfil de PCR em tempo real universal deve ser utilizado apenas em testes de DNA quando houver a combinação dos testes de PCR em tempo real RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA em uma execução.

Tab. 7: Perfil de PCR em tempo real universal para LightCycler® series

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 8: Perfil de PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

9.4 Configuração dos canais de detecção

Tab. 9: Seleção dos canais de detecção adequados

PCR em tempo real Gerät	Deteccção	Canal de deteccção	Indicação
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	Necessário RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	Necessário RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Verifique se a opção de referência passiva ROX está em nenhum
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Verifique se há corante de referência passiva
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas em 5
	ICD	Amarelo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Controle de qualidade

A análise das amostras é realizada pelo software do instrumento de PCR em tempo real usado, de acordo com as instruções do fabricante. O controle negativo e o controle positivo devem mostrar resultados corretos (consulte a Tab 10, Fig. 1) para determinar uma execução válida.

O **Positive Control** tem uma concentração de 10^3 cópias/ μ l. Em cada execução da PCR, ele é usado em um valor total de 5×10^3 cópias.

Tab. 10: Para uma execução válida, é necessário preencher as seguintes condições:

Amostra	Resultado do ensaio	ICD Ct	Ct Alvo
Controle positivo	Positivo	NA *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 Não é necessário um valor de Ct para o ICD para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não for positivo dentro do intervalo de Ct especificado, mas o Controle negativo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se os critérios exigidos não forem preenchidos, os itens a seguir devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade da instrumentação utilizada
- Desempenho correto de realização do teste

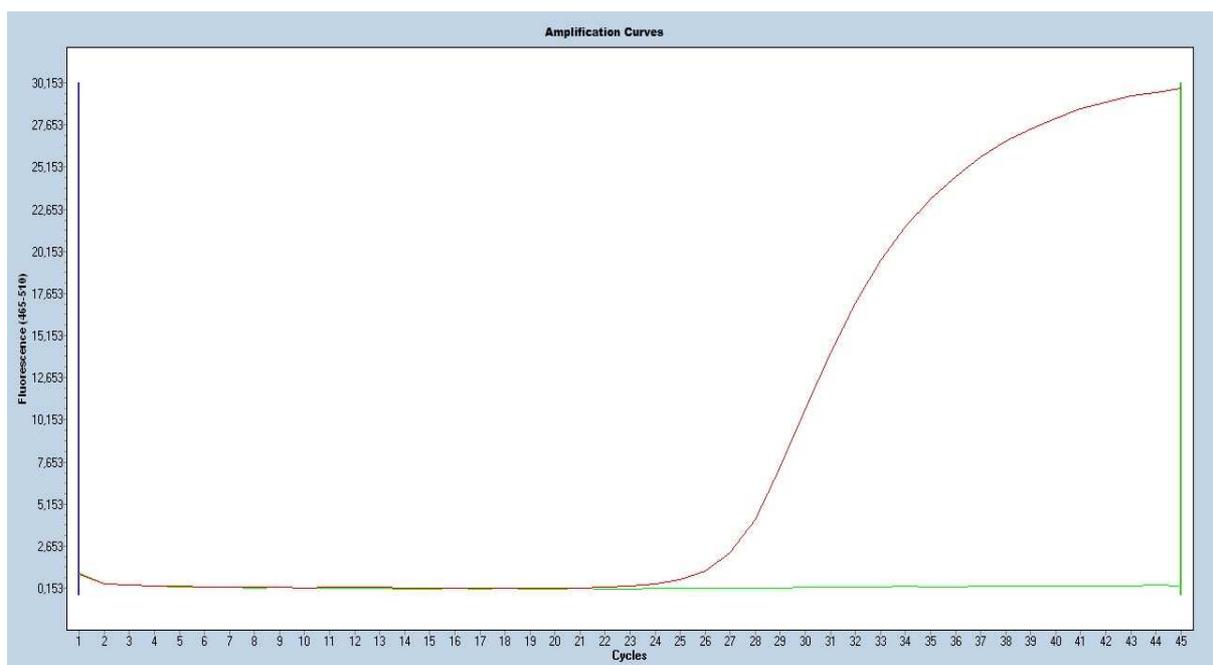


Fig.1: Execução correta dos controles positivo e negativo (*Trichomonas vaginalis*) no LightCycler® 480II

11. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tab. 11.

Tab.11: Interpretação das amostras

Genes alvo		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>Trichomonas vaginalis</i> detectada
negativo	positivo	Gene alvo não detectado
negativo	negativo	Inválido

O *Trichomonas vaginalis* é detectado se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

O *Trichomonas vaginalis* também é detectado se a amostra de DNA apresentar um sinal de amplificação, mas nenhum no **Internal Control DNA** no sistema de detecção. A detecção do controle de amplificação interno não é necessária, porque as altas concentrações do fragmento amplificado podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control DNA**.

O *Trichomonas vaginalis* não é detectado se a amostra de DNA não apresentar um sinal de amplificação, mas sim um sinal de amplificação no

Internal Control DNA no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção no **Internal Control DNA**.

Uma amostra é inválida, se a amostra de DNA e o **Internal Control DNA** não apresentarem nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção. A amostra contém um inibidor PCR ou ocorreu uma falha no procedimento de extração. A amostra extraída precisa ser diluída adicionalmente com água PCR (1:10) e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. O resultado da análise molecular não deve levar ao diagnóstico, mas sim ser sempre considerado no contexto do histórico médico e dos sintomas do paciente.
2. Este teste é validado apenas para esfregaços genitais e amostras de urina.
3. A coleta, o transporte, o armazenamento e o processamento inadequados da amostra ou uma carga patogênica na amostra inferior à sensibilidade analítica podem resultar em resultados falso negativos.
4. A presença de inibidores de PCR pode causar resultados inválidos.
5. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem afetar a detecção de novas variantes, acarretando em um resultado falso negativo com o teste RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis*.
6. Do mesmo modo que em todos os testes de diagnóstico *in vitro* com base em PCR, é possível detectar os níveis de alvo extremamente baixos, inferiores ao limite de detecção (LoD), mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
7. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo indica a presença do gene alvo (ITS1).

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade analítica

A PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* tem um limite de detecção de ≥ 10 cópias de DNA por reação. A seguinte figura 2 mostra uma série de diluição do *Trichomonas vaginalis* (10^5 - 10^1 cópias de DNA por μl) no LightCycler® 480II.

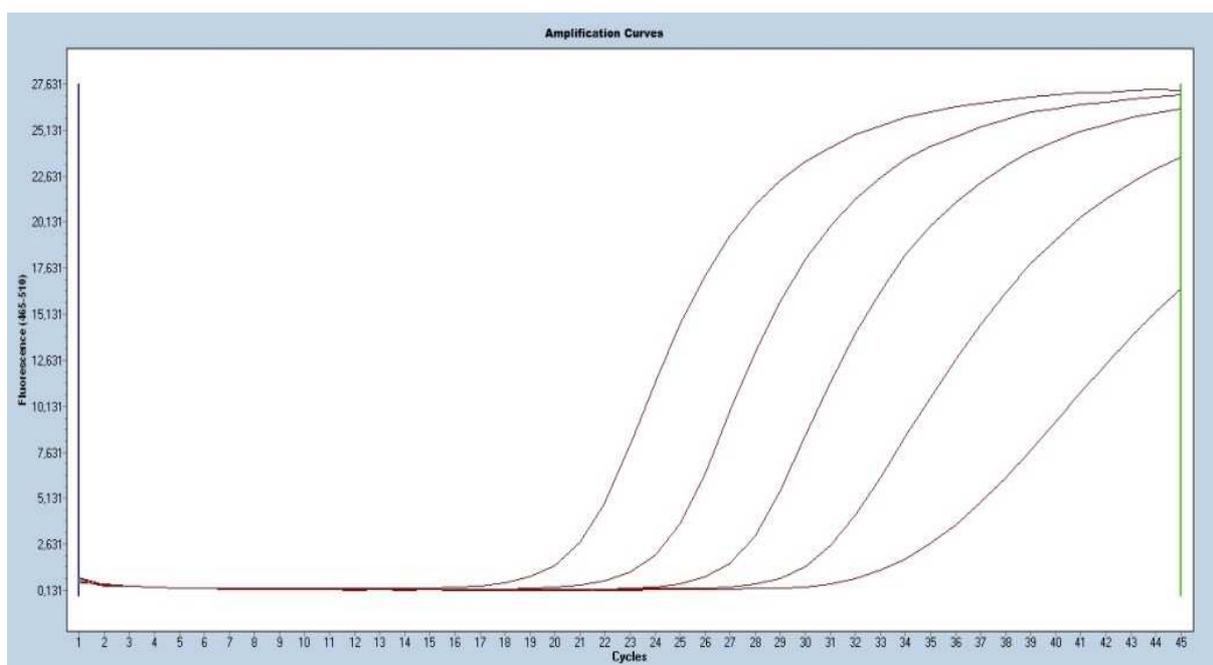


Fig. 2: Série de diluição de *Trichomonas vaginalis* (10^5 - 10^1 cópias de DNA por μl) no LightCycler® 480II

O limite de detecção de todo o procedimento depende da matriz da amostra, da extração de DNA e da concentração de DNA.

13.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica do PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* é específica para *Trichomonas vaginalis*. Não foi detectada nenhuma reação cruzada em relação às seguintes espécies (ver Tab. 12):

Tab. 12: Testes de reatividade cruzada

Adenovírus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovírus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovírus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovírus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	HSV 1	-	Rotavírus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	HSV 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	HPV 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovírus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	HPV 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	HPV 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovírus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovírus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação
2014-11-09	Versão da edição
2018-04-18	Revisão geral
2018-04-18	4. Reagentes fornecidos 6. Reagentes adicionais e equipamentos necessários 8. Coleta e armazenamento 9. Realização do teste 13. Características de desempenho 14. Histórico de versões 15. Explicação dos símbolos

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Não aplicável

16. Literatura

1. Sutton M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> accessed 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:281-290.