

INSTRUÇÕES DE USO

KIT XGEN MULTI IST CNM

KIT PARA DETECÇÃO MULTIPLEX DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, *NEISSERIA GONORRHOEAE* E *MYCOPLASMA GENITALIUM* POR PCR EM TEMPO REAL

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MULTI IST CNM é um kit de diagnóstico *in vitro* para detecção qualitativa do DNA dos organismos patogênicos causadores de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em humanos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium*, a partir do DNA extraído das amostras clínicas de diferentes origens, como urina e sêmen; swabs uretrais, endocervicais, anais, faríngeos e citologia líquida. É baseado em uma técnica de PCR multiplex de tempo real, utilizando primers e sondas fluorescentes para os genes alvo de plasmídeo críptico, Opal e MgPa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium*, respectivamente.

Primers específicos e sondas fluorescentes também são incluídos para detecção simultânea dos genes RNaseP humano, como controle interno da qualidade do material de partida e de amplificação.

O teste deve ser realizado a nível hospitalar em laboratórios de microbiologia clínica aos pacientes que apresentem sintomas compatíveis com uma infecção sexualmente transmissível. O uso final pretendido é auxiliar no diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis em combinação com fatores de risco clínico e epidemiológicos.

Para uso em diagnóstico *in vitro*.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN MULTI IST CNM deve ser transportado e armazenado entre -10 e -30°C. No entanto, o transporte em temperatura refrigerada (2°C a 8°C) também é possível, desde que o tempo de transporte não exceda um máximo de 10 dias e o kit seja armazenado a uma temperatura entre -10 e -30°C após o recebimento.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Esse kit realiza a detecção através de um ensaio multiplex, baseado na reação em cadeia de polimerase em tempo real.

O master mix contém três conjuntos de primers e sondas direcionadas para detecção do DNA bacteriano de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium*. Também é incluído primers e sondas para detecção do gene humano da RNaseP em amostras clínicas e amostras de controle. Os oligonucleotídeos usados como primers e sondas foram selecionados nas regiões evolutivamente conservadas.

Na presença de qualquer uma dessas bactérias em amostras clínicas, o DNA bacteriano é amplificado por uma reação em cadeia polimerase em tempo real (qPCR). A detecção de amplicons é baseada no uso de sondas duplamente marcadas com uma combinação reporter-quencher que permite a hibridização da sonda com as moléculas de DNA em dupla hélice, produzidas em cada ciclo de amplificação e hidrólise da sonda em ciclos sucessivos. Dessa forma, enquanto ocorre a fase de extensão da PCR, a atividade 5' nuclease do DNA da polimerase degrada as sondas ligadas especificamente aos seus alvos, causando a separação entre o reporter e o quencher, e um sinal fluorescente será gerado. As sondas específicas para cada bactéria irão gerar um sinal fluorescente em diferentes comprimentos de onda, permitindo que o instrumento PCR em tempo real diferencie os sinais. A cada ciclo de desnaturação-extensão ocorre a divisão de novas moléculas de reporter e, conseqüentemente,

a intensidade do sinal fluorescente aumenta. A intensidade da fluorescência é monitorada nos instrumentos de PCR em tempo real em cada um dos ciclos e os dados são analisados com um software de análise específico para cada plataforma.

A detecção de DNA bacteriano é de grande utilidade no diagnóstico e monitoramento de infecções causadas por esses microrganismos.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O kit XGEN MULTI IST CNM foi validado para uso a partir de um material genético purificado de diferentes amostras clínicas, como urina, sêmen, swabs uretrais, endocervicais, anais, faríngeos e citologia líquida.

As condições de coleta, manipulação e preparação das amostras dependerá do tipo de amostra.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

4.2.1 AMOSTRAS CITOLÓGICAS

Amostras citológicas podem ser coletadas com um pequeno swab ou uma escova estéril. O swab com as células coletadas deve ser colocado em um recipiente estéril com um meio de transporte adequado (por exemplo, PBS 1X, solução fisiológica/isotônica, meio de citologia líquida).

4.2.2 SÊMEN

O fluido seminal deve ser coletado em um recipiente estéril e pode ser armazenado entre 2°C e 8°C durante várias horas (no máximo durante uma noite).

4.3.3 URINA

Em geral, para detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium* é utilizada em amostras da primeira urina da manhã. Ao coletar a amostra deve descartar a primeira parte da urina e coletar apenas a segunda parte. Utilize um recipiente esterilizado.

4.3 MANUSEIO

Este kit foi validado com material genético inicial obtido dos seguintes kits de purificação de DNA/RNA e kits de extração*, a partir de 200 µl de amostra clínica e eluindo em 100 µl de tampão de eluição (para purificação com Opentrans, comece com 92 µl de amostra clínica e elua em 60 µl de solução de eluição):

KITS DE EXTRAÇÃO	EQUIPAMENTOS DE EXTRAÇÃO
Kit de Isolamento de Ácido Nucleico Total <i>MagNA LC I (Roche Diagnostics)</i>	Instrumento compacto <i>MagNA Pure</i> . Versão 1.1.2 (<i>Roche Diagnostics</i>)
Kit de purificação de tecido <i>LEV ADN Maxwell® 16 FFPE (Promega)</i>	<i>Maxwell® 16 (Promega)</i>
NX48S - Kit de DNA de Urina/Cotonete (<i>Genolution</i>)	<i>Nextractor NX-48S (Genolution)</i>
Kit de patógeno RNA/DNA (<i>Opentrans Robot (Vitro, ref. MAD- 003955M)</i>)	<i>Opentrans OT-2</i>

NOTA: O kit não foi validado com outros sistemas de extração de DNA/RNA. Portanto, se qualquer outro sistema de purificação for usado, isso deve ser verificado previamente.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

4.4.1 AMOSTRAS CITOLÓGICAS

As amostras podem ser armazenadas entre 2°C e 8°C se os ácidos nucleicos forem extraídos dentro de uma semana. Se a extração não for viável dentro de uma semana, armazene as amostras entre -30°C e -20°C.

Caso o número de células em uma amostra seja muito baixo, centrifugue repetidamente antes de iniciar a extração. Após cada etapa de centrifugação, ressuspender em PBS estéril. Os ciclos de centrifugação/ressuspensão também podem ser usados para remover muco, glóbulos vermelhos ou outro material.

4.2.2 SÊMEN

O fluido seminal pode ser armazenado entre 2°C e 8°C durante várias horas (no máximo durante uma noite). Alternativamente, congele a amostra depois da adição de um meio que seja compatível com o método de extração de DNA.

4.3.3 URINA

Se as amostras clínicas não forem processadas imediatamente após o recebimento, recomenda-se armazená-las a 4°C por um período máximo de 1 semana. Realizar extração do material genético com técnica previamente validada.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O kit XGEN MULTI IST CNM é comercializado com Master Mix pronto para uso que inclui todos os reagentes necessários para realizar a PCR em tempo real.

Além disso, para evitar a contaminação com produtos de PCR anteriores, o Mix contém a enzima Uracil-DNA Glicosilase (Cod-UNG), que degrada produtos de PCR contendo dUTP.

Um controle positivo (CP) e água tratada com DEPC livre de DNase/RNase para incluir nos controles negativos (NTC) são fornecidos juntamente com a mistura de PCR.

Componentes do kit para 100 testes:

COMPONENTE	XG-CNM-MB CONTEÚDO	QUANTIDADE
IST CNM MMIX	Polimerase Hot Start (125 U/ml), Uracil DNA glicosilase (50 U/mL), iniciadores 0,1-0,4 μM, 0,05-0,4 sonda fluorescente, 2x tampão de reação, 1 mM dUTP, 1,3 mM dNTPs (A, G, C, T)	2 frascos com 50 testes/frasco
ÁGUA LIVRE DE DNASE/ RNASE	---	1 frasco (200 μl)
CONTROLE POSITIVO IST CNM	DNA sintético não infeccioso contendo parte do genoma de <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Nesseria gonorrhoeae</i> e <i>Mycoplasma genitalium</i> (12,5 cópias/ml) e DNA humano (0,625 ng/μl)	1 frasco (100 μl)

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Kit de extração de DNA;
- ✓ Micropipetas (0,5 μL < volume < 1.000 μL);
- ✓ **IMPORTANTE:** Devem estar calibradas para distribuir o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a regulares descontaminações das partes que podem

acidentalmente entrar em contato com a amostra. Elas devem ser certificadas e devem estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e exatidão de $\pm 5\%$.

- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Agitador tipo vortex ou similar;
- ✓ Racks para tubos;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livre de nuclease;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Cabine de fluxo laminar.
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor.

7. ESTABILIDADE EM USO

A mistura da reação IST CNM MMix é sensível a mudanças de estado físico e foi comprovado que suporta até sete ciclos de congelamento/descongelamento. Se uma execução for realizada com um número baixo de amostras, recomenda-se a alíquota do reagente com antecedência. Deve ser mantido longe da luz direta por conter moléculas fluorescentes.

O Controle Positivo é sensível a mudanças físicas e não deve passar por mais de oito ciclos de congelamento/descongelamento. É aconselhável manusear separadamente das amostras clínicas para evitar a contaminação potencial que pode gerar falsos positivos.

Se conservado na temperatura recomendada, os reagentes de PCR são estáveis até a data de validade especificada no rótulo do produto. Os reagentes de PCR devem ser conservados em zonas livres de contaminação de DNA ou produtos de PCR.

8. ORIENTAÇÕES GERAIS

- O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e treinado na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
- Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- Os responsáveis pelo manuseio de amostras devem ser vacinados contra tétano, difteria, hepatite B e os estabelecidos no PCMSO, de acordo com a Norma Regulamentadora 32.
- Os resíduos gerados durante a utilização do kit devem ser descartados de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

9. RECOMENDAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE

- Não utilizar reagentes ou materiais fora da data de validade.
- Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
- Ligar o termociclador e verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio correto.
- Seguir estritamente o manual do equipamento fornecido pelo fabricante para a correta configuração do termociclador em Tempo Real.
- Não trocar os componentes entre diferentes lotes do produto. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.

- O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes.
- Utilizar ponteiros descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiros após a manipulação de cada amostra.
- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, iniciando com o preparo dos reagentes (pré-PCR), passando para a extração de amostras (pré-PCR) e finalizando com as de amplificação e de análises de dados (pós-PCR). Não compartilhar reagentes e equipamentos entre as diferentes áreas.
- **IMPORTANTE:** A circulação de pessoas e equipamentos provenientes da área de amplificação para a área de preparo de reagentes deve ser evitada fortemente, para evitar a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.
- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.

10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

10.1 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de Controle Negativo (CN) e Controle Positivo (CP).

10.2 PREPARAÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO

A reação de PCR em tempo real é realizada em um volume final de 20 µl. Prepare o Master Mix conforme indicado abaixo:

- Descongelar e homogeneizar IST CNM MMix (não usar vortex). Depois de descongelado, centrifugue brevemente.
- Misture em cada tubo de PCR os seguintes volumes para cada amostra:

REAGENTE	VOLUME/TESTE
IST CNM MMIX	12 µl
AMOSTRA	8 µl

- Inclua um controle negativo adicionando 8 µl da água inclusa no kit.
- Inclua um controle positivo adicionando 8 µl do controle de DNA positivo IST CNM CP incluso no kit.
- Centrifugue brevemente para certificar-se de que não há bolhas de ar nos poços.

NOTA: Recomenda-se manter o MMix em rack termoestável durante o preparo das amostras e não descongelar o frasco mais de cinco vezes.

10.3 PROGRAMAÇÃO DA PCR

No software do instrumento insira os diferentes alvos e canais de detecção para cada um deles. Configure as amostras, o controle positivo (CP), os alvos de PCR (NTC) e aloque as posições das amostras na placa de PCR.

Configure o instrumento de PCR em tempo real seguindo as etapas abaixo:

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Hold</i>	25 °C	5 min.	1
<i>Hold</i>	95 °C	5 min.	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	15 seg.	45
	56 °C (*)	40 seg.	

10.4 SELEÇÃO DE DETECTORES

Os canais de detecção dos diferentes alvos são:

DETECÇÃO	REPORTER
<i>Chlamydia trachomatis</i>	ROX
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	FAM
<i>Mycoplasma genitalium</i>	JOE/VIC
RNaseP	Cy5

Antes da interpretação dos resultados para as amostras clínicas, é necessário seguir o guia de interpretação do controle positivo e negativo citados na tabela a seguir:

	RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
CONTROLE POSITIVO IST CNM	Sinal para os canais FAM, ROX, Cy5 e JOE/VIC*	O controle/reação está correto.
	Sem sinal para FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE/VIC	Problema na amplificação, repetir a análise.
CONTROLE NEGATIVO	Sinal para os canais FAM e/ou ROX e/ou Cy5 e/ou JOE/VIC	Contaminação, repetir a análise.
	Sem sinal	O controle/reação está correto.

*O sinal de amplificação deve ser determinado por um aumento rápido e constante dos valores de fluorescência e não por fenômenos de pico ou aumento gradual de background (fundo irregular ou ruído de fundo aumentado) (Figura 1).

A corrida é considerada válida quando forem obtidos resultados adequados para todos os controles de reação e os valores de Cts obtidos no controle positivo para os diferentes alvos estiverem dentro da faixa de valores esperados, sendo estes:

ALVO	FAIXA DE ACEITE
NG (FAM)	24±2
CT (ROX)	21±2
MG (JOE/VIC)	23±2
RNaseP (Cy5)	26±2

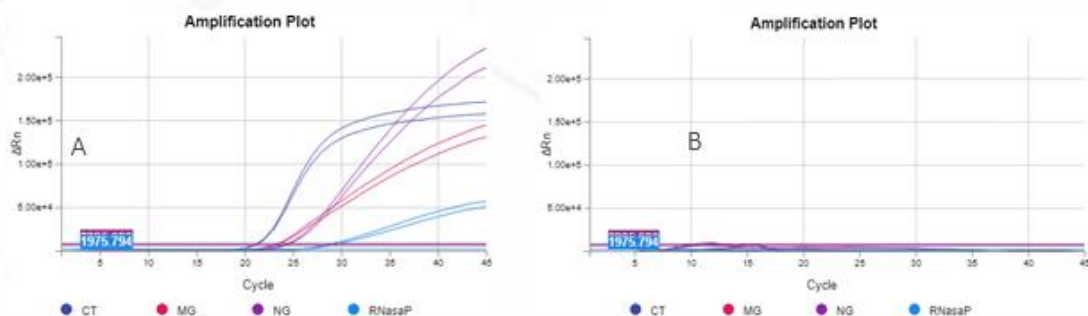


Figura 1: Gráficos de amplificação do controle positivo CP (A) e um controle negativo com solução de reconstituição NTC (B). (Valores esperados realizados de Cts para o PC: NG (FAM) 24±2; CT (ROX) 21±2; MG (JOE/VIC) 23±2, RNaseP (Cy5) 26±2. Realizado em Applied Biosystems QuantStudio™ 5 - Equipamento de PCR de tempo Real.

Se a execução foi validada, interprete os resultados das amostras clínicas de acordo com a tabela a seguir:

XGEN MULTI IST CNM				INTERPRETAÇÃO
NG (FAM)	CT (ROX)	MG (JOE/VIC)	RNaseP (Cy5)	
Sinal positivo	Sem sinal	Sem sinal	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
			Sem sinal	
Sem sinal	Sinal positivo	Sem sinal	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Chlamydia trachomatis</i>
			Sem sinal	
Sem sinal	Sem sinal	Sinal positivo	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Sem sinal	
Sem sinal	Sinal positivo	Sinal positivo	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Sem sinal	
Sinal positivo	Sinal positivo	Sem sinal	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i>
			Sem sinal	
Sinal positivo	Sem sinal	Sinal positivo	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Sem sinal	
Sinal positivo	Sinal positivo	Sinal positivo	Sinal positivo	Amostra positiva para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Mycoplasma genitalium</i>
			Sem sinal	
Sem sinal	Sem sinal	Sem sinal	Sinal positivo	Resultado negativo (1)
			Sem sinal	Inválido (2): Problema na extração ou amplificação

(1) Negativo ou abaixo do limite de detecção do kit.

(2) Recomenda-se repetir a PCR a partir de uma nova extração de DNA.

Recomenda-se usar o ajuste automático de threshold feito pelo software padrão de cada instrumento e, se necessário, o threshold pode ser ajustado manualmente garantindo que esteja dentro da fase exponencial da curva de fluorescência e que o ruído de fundo esteja abaixo da linha de limiar.

Uma amostra é positiva se o valor de Ct obtido for ≤ 38 , embora o controle interno não mostre um gráfico de amplificação. Às vezes, pode ocorrer que o controle interno não seja amplificado corretamente devido à presença de um número inicial elevado de cópias do ácido nucleico bacteriano alvo, o que pode causar uma amplificação preferencial deste último.

IMPORTANTE: Amostras com Ct maiores que 38 devem ser analisadas criticamente em relação ao formato da curva e a clínica do paciente.

Uma amostra é negativa se uma curva de amplificação não for detectada e o controle interno mostrar isso. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controle interno.

11. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

Para o usuário deste kit recomenda-se a leitura cuidadosa e a compreensão da instrução de uso. A adesão estrita ao protocolo é necessária para a obtenção de resultados confiáveis.

Em particular, a veracidade da amostra, a pipetagem de reagentes, a aplicação do fluxo de trabalho correto, juntamente com a etapa da programação cuidadosa do termociclador, é essencial para resultados precisos e reprodutíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os tipos de amostras clínicas validadas são: urina, sêmen, citologias em meio líquido; e swabs uretrais, endocervicais, anais e faríngeos. O método foi validado com base no material genético delas purificado. A análise de qualquer outro tipo de amostra não indicada pode levar a resultados errados ou inconclusivos devido à inibição da reação de PCR por agentes químicos inibidores.

O desempenho correto do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico deve ser devidamente extraído das amostras clínicas. A coleta, armazenamento e/ou transporte inadequados de amostras podem resultar em falsos negativos.

Um número baixo de cópias de (abaixo do limite de detecção) pode ser detectado, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.

Um teste positivo para IST CNM não exclui a possibilidade de que outros patógenos estejam presentes na amostra clínica.

Um resultado negativo do teste não exclui que haja uma infecção com IST CNM e não deve ser usado como o único método de diagnóstico para estabelecer um tratamento ou regime de manejo do paciente. O resultado negativo do teste deve ser analisado de acordo o histórico médico do paciente e epidemiologia.

Os resultados obtidos com o kit XGEN MULTI IST CNM devem ser interpretados pelos responsáveis do laboratório levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes e outros parâmetros de laboratório relacionados às condições do paciente.

É recomendado que a confidencialidade, aconselhamento apropriado e avaliação médica sejam considerados aspectos essenciais na sequência de testes.

12. DESEMPENHO ANALÍTICO

12.1 SENSIBILIDADE

A sensibilidade analítica do kit XGEN MULTI IST CNM foi determinada realizando três réplicas de diluições em série de fragmentos sintéticos de cada um dos alvos de 10^7 cópias/reação a 10^1 cópias/reação.

Foi estabelecido que o kit XGEN MULTI IST CNM tem um limite de detecção de 10 cópias/reação para *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium*.

A eficiência de amplificação para cada um dos alvos foi avaliada com seis diluições seriadas de um padrão de IST de 10^7 cópias/reação a 10^1 cópias/reação. Ajustando os dados de Cts a uma linha, a eficiência de amplificação, R^2 e o slope foram determinados para cada um dos genes.

O plasmídeo críptico *Chlamydia trachomatis* apresentou uma eficiência de 139,08%, um R^2 de 0,974 e um slope de -2,64. O gene Opal de *Neisseria gonorrhoeae* apresentou eficiência de 119,04%, R^2 de 0,986 e slope de -2,93. O gene MgPa do *Mycoplasma genitalium* apresentou eficiência de 155,30%, R^2 de 0,98 e slope de -2,457.

12.2 ESPECIFICIDADE

A especificidade do teste IST CNM foi confirmada testando amostras clínicas positivas para outros patógenos relacionados a doenças sexualmente transmissíveis que estão incluídos no kit

MULTI IST DNA Flow Chip. Além disso, testes de especificidade também foram realizados com genótipos de alto e baixo risco de papilomavírus humano e outras bactérias que compartilham o nicho ecológico. A lista completa de organismos testados para reatividade cruzada é mostrada na tabela a seguir.

PROVA DE REATIVIDADE CRUZADA	
MICROORGANISMO	RESULTADO
HSV-1	Negativo
HSV-2	Negativo
<i>T. pallidum</i>	Negativo
<i>H. ducreyi</i>	Negativo
<i>T. vaginalis</i>	Negativo
<i>M. hominis</i>	Negativo
<i>U. urealyticum</i>	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecium</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negativo
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Negativo
<i>Streptococcus penumoniae</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
HPV genotipo HR 16	Negativo
HPV genotipo HR 18	Negativo
HPV genotipo HR 26	Negativo
HPV genotipo HR 31	Negativo
HPV genotipo HR 35	Negativo
HPV genotipo HR 35	Negativo
HPV genotipo HR 51	Negativo
HPV genotipo HR 52	Negativo
HPV genotipo HR 53	Negativo
HPV genotipo HR 56	Negativo
HPV genotipo HR 59	Negativo
HPV genotipo HR 68	Negativo
HPV genotipo HR 73	Negativo
HPV genotipo HR 82	Negativo
HPV genotipo LR 6	Negativo
HPV genotipo LR 11	Negativo
HPV genotipo LR 42	Negativo
HPV genotipo LR 43	Negativo
HPV genotipo LR 54	Negativo
HPV genotipo LR 61	Negativo
HPV genotipo LR 62	Negativo
HPV genotipo LR 81	Negativo

HPV genotipo LR 67	Negativo
HPV genotipo LR 70	Negativo
HPV genotipo LR 71	Negativo
HPV genotipo LR 72	Negativo
HPV genotipo LR 84	Negativo

Nenhuma reação cruzada foi detectada com qualquer um dos seguintes patógenos testados.

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

12.4 PRECISÃO

12.4.1 REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi analisada testando o método 5 vezes para cada um dos alvos incluídos no painel. Para isso, foi utilizada uma concentração conhecida de fragmentos de DNA sintético que mimetizam cada um dos alvos a serem amplificados. O teste foi realizado pelo mesmo operador, em um único local e utilizando o mesmo lote de reagentes e a mesma plataforma. A plataforma utilizada foi o Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e os resultados foram analisados com a versão v. 2.4.3. A variabilidade entre os testes foi determinado a partir dos valores de Cts obtidos das repetições. O coeficiente de variação (CV) foi calculado como desvio padrão dividido pela média dos Cts, sendo 1,03% para *Chlamydia trachomatis*, 5,67% para *Neisseria gonorrhoeae* e 4,31% para *Mycoplasma genitalium*.

12.4.2 REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade do método foi analisada simulando a variabilidade inter-ensaios, alterando o operador, o equipamento utilizado no processo e os lotes de PCR mix. Trinta e cinco amostras de DNA purificado foram testadas usando o sistema de extração Maxwell (Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit) das quais 25 foram positivas para CT, NG ou MG (presença de 4 coinfeções) e 10 amostras foram negativas.

A concordância foi calculada com um coeficiente kappa de 0,815, erro padrão de 0,1 e um IC de 95% de 0,6141,016, mostrando uma força de concordância muito boa para o kit XGEN MULTI IST CNM.

LABORATÓRIO 2	LABORATÓRIO 1		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	26	1	27
NEGATIVO	2	10	12
TOTAL	28	11	39

12.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit XGEN MULTI IST CNM foi validado a partir de DNA purificado por qualquer um dos métodos de extração acima mencionados. A capacidade diagnóstica do kit XGEN MULTI IST CNM (CT-NG-MG) foi avaliada por meio do estudo de sua sensibilidade e especificidade diagnóstica. Esses dois parâmetros são definidos e calculados da seguinte forma:

- A especificidade diagnóstica é expressa como uma porcentagem (fração numérica multiplicada por 100), calculada como $100 \times \frac{\text{valores verdadeiros negativos (TN)}}{\text{valores verdadeiros negativos (TN)} + \text{valores falsos positivos (FP)}}$.

- A sensibilidade diagnóstica é expressa em porcentagem (fração numérica multiplicada por 100), calculada como $100 \times \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$, onde TP é o número de valores verdadeiros positivos e FN é o número de valores falsos negativos.

Um total de 238 amostras clínicas de diferentes origens de diferentes hospitais foram analisadas em um estudo retrospectivo: Hospital de La Princesa (Madri), Hospital Clínico San Cecilio (Granada), Hospital de Valme (Sevilha) e Hospital Universitario de Son Espases (Palma) e Hospital Infanta Elena (Huelva). Destas amostras, 227 foram positivas e 11 negativas. O estudo comparativo foi realizado utilizando como método de referência o STD Direct DNA Flow Chip Kit (Vitro. S.A.) com marcação CE-IVD.

ORGANISMO	TN	FP	TP	FN	ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA	CI 95%	SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA	CI 95%
<i>N. gonorrhoeae</i>	172	0	65	1	100.00%	97,27-100%	98,48%	90,73-99,92%
<i>M. genitalium</i>	188	0	50	0	100.00%	97,50-100%	100%	91,11-100%
<i>C. trachomatis</i>	112	0	125	1	100.00%	95,86-100%	99,2%	95-100%

13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

15. REQUISITOS

Profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Não aplicável.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Leia as instruções de uso antes de utilizar o produto.

- O kit deve ser manuseado por profissionais qualificados em técnicas de biologia molecular aplicadas em diagnóstico.
- Não use nenhum componente do kit depois da data de validade.
- O controle positivo deve ser descongelado a temperatura ambiente, misturado bem e centrifugado brevemente antes do uso.
- As precauções de segurança e descarte de resíduos vem descritas na Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) do produto. O produto é destinado unicamente para uso profissional em laboratório, e não como fármaco, para uso doméstico ou outros fins.
- O kit XGEN MULTI IST CNM utiliza como material de partida ácidos nucleicos previamente extraídos e purificados. É responsabilidade do cliente incluir os controles necessários para verificar o que o sistema de extração de material genético utilizado funciona adequadamente.

18. GARANTIA

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos.

O produto XGEN MULTI IST CNM é garantido contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

18.1 EXCEÇÕES NA GARANTIA

Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

18.2 EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.
- A Mobius não se responsabiliza por resultados/diagnósticos que sejam obtidos através da utilização de equipamentos e amostras não previstas na instrução de uso.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

FABRICANTE:

Vitro S.A.

Calle Luís Fuentes Bejarano nº 60. Ed. Nudo Norte Local 3. 41020 Sevilla (Spain).

Tel: +34 954 933 200.

vitro@vitro.bio; www.vitro.bio

IMPORTADO POR:

Mobius Life Science Indústria e Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda

Rua Jandaia do Sul 441 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-440

Telefone: (41) 3401-1850 | 0800-7101850

E-mail: suporte@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070107