

## INSTRUÇÕES DE USO

### RUO XGEN MULTI NEURO 11

KIT RUO XGEN MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE VÍRUS CAUSADORES DE MENINGITE E ENCEFALITE

#### 1. FINALIDADE E MODO DE USO

O Kit RUO XGEN MULTI N11 é um teste para a detecção qualitativa de ácido nucleico viral em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), como auxílio para a avaliação de infecções por Adenovírus humano, Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-Zoster, Parechovírus humano, Eritrovírus B19, vírus herpes humano tipo 6 e 7 e Enterovírus.

O kit foi otimizado para uso em aparelhos de PCR em Tempo Real.

Produto exclusivo para uso em pesquisa (RUO).

##### 1.1 INTRODUÇÃO

A Encefalite é uma inflamação do parênquima encefálico e, muitas vezes, pode se apresentar como disfunção neuropsicológica focal ou difusa.

Diversos agentes podem atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) e desencadear uma resposta inflamatória no parênquima encefálico. Geralmente, os vírus são os agentes mais comuns nas encefalites agudas e dentre esses, pode-se destacar Adenovírus humano, Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-Zoster, Parechovírus humano, Eritrovírus B19, vírus herpes humano tipo 6 e 7 e Enterovírus.

A fisiopatologia da infecção varia segundo a família do vírus envolvido. A apresentação clássica de encefalite viral é sob a forma de febre alta, cefaleia, náusea, vômitos e alteração da consciência, frequentemente associada a crises e sinais neurológicos focais. As alterações da função mental superior incluem letargia, sonolência, confusão, desorientação e coma.

Os **Herpesvírus** são vírus grandes, de cadeia dupla de DNA. Existem vários tipos de vírus humanos: vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1), vírus herpes simplex tipo 2 (HSV2), vírus Varicela-Zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV), vírus herpes humano tipo 6 (HHV6), vírus herpes humano tipo 7 (HHV7), entre outros. A principal característica desses vírus é que após a infecção primária o patógeno fica latente nos gânglios do sistema nervoso ou tecido linfóide. Os **Enterovírus (EV)** são pequenos, contêm cadeia simples de RNA e não possuem envelope. O EV é associado normalmente a quadros de meningite, mas pode causar encefalite focal ou difusa. Clinicamente ocorre quadro de infecção viral sistêmica como erupção cutânea e diarreia associado à alteração neurológica.

O **Eritrovírus B19 (B19)** é um vírus de cadeia simples de DNA e não possui envelope. A infecção por B19 em pacientes saudáveis geralmente evolui sem sintomas clínicos. Em fetos, gestantes e pacientes imunodeprimidos a encefalite está entre as manifestações clínicas relacionadas à maior morbimortalidade.

O **Parechovírus humano (HPeV)** pertence a uma grande família de vírus não-envelopados de cadeia simples de RNA. A infecção por HPeV em recém-nascidos pode causar encefalite, com quadro clínico associado à febre e convulsões.

O **Adenovírus humano (HAdV)** é um vírus de cadeia dupla de DNA não-envelopado. Diversas

síndromes neurológicas têm sido atribuídas ao HAdV, entre elas a encefalite, condição clínica causada pela infecção generalizada severa. Essas condições clínicas acometem principalmente pacientes transplantados e crianças.

O tratamento mais adequado e chance de recuperação do paciente dependem do vírus envolvido e da gravidade da inflamação, por isso, é essencial que seja realizada a diferenciação do patógeno causador da doença o mais breve possível.

## 2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 deve ser armazenado na embalagem original à temperatura entre  $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  e são estáveis até à data de vencimento indicada no rótulo. Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser evitado o congelamento e o descongelamento dos reagentes por mais de nove vezes, pois pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Recomenda-se realizar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

## 3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 foi desenvolvido para a identificação de Adenovírus humano, Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-Zoster, Parechovírus humano, Eritrovírus B19, vírus herpes humano tipo 6 e 7 e Enterovírus em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR).

O RNA viral é transcrito em cDNA utilizando um primer específico através da etapa de transcrição reversa seguida por uma reação de PCR, em um único tubo. A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, e é relatado como o valor limiar de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real.

## 4. AMOSTRA

### 4.1 TIPOS

O Kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 foi validado para uso a partir de ácido nucleico extraído de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR).

### 4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

#### 4.2.1 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

- Evitar qualquer adição de conservantes nas amostras.
- As amostras devem ser claramente identificadas com códigos ou nomes, a fim de evitar resultados com erros de interpretação.
- As amostras clínicas devem ser coletadas e armazenadas em recipientes limpos e processadas o mais rapidamente possível para garantir a qualidade do teste. É recomendada a utilização de amostras frescas.

### 4.3 MANUSEIO

Recomenda-se o uso de amostras frescas para o teste. Para longos períodos de armazenamento, recomenda-se que todas as amostras fiquem a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou, idealmente, a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração.

#### 4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

Para um armazenamento a longo prazo, as amostras devem ser congeladas a -20°C. Nesse caso, a amostra deverá ser totalmente descongelada e levada à temperatura ambiente antes do teste. Homogeneizar bem a amostra antes da preparação. Ciclos de congelamento e descongelamento não são recomendados.

Prossiga a preparação da amostra de acordo com as recomendações que aparecem nas instruções de uso do kit de extração utilizado.

#### 5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão do kit contém os seguintes materiais e reagentes para 25, 50 e 75 testes:

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE		
		25 TESTES	50 TESTES	75 TESTES
<b>MIX</b>	Mistura pronta para uso otimizada para ensaio RT-qPCR	2 x 750 µL	3 x 1 mL	2 x 1.5 mL
<b>PS MIX 1</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para: EBV, RNase P, HadV	1 x 125 µL	1 x 250 µL	1 x 375 µL
<b>PS MIX 2</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para: CMV, EV, HpeV, VZV	1 x 125 µL	1 x 250 µL	1 x 375 µL
<b>PS MIX 3</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para: HSV1 e HSV2	1 x 125 µL	1 x 250 µL	1 x 375 µL
<b>PS MIX 4</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para: HHV6, HHV7 e B19	1 x 125 µL	1 x 250 µL	1 x 375 µL
<b>CONTROLE POSITIVO 1</b>	Controle Positivo para detecção de: EBV, RNase P, HadV	1 x 100 µL	1 x 100 µL	1 x 100 µL
<b>CONTROLE POSITIVO 2</b>	Controle Positivo para detecção de: CMV, EV, HpeV, VZV	1 x 100 µL	1 x 100 µL	1 x 100 µL
<b>CONTROLE POSITIVO 3</b>	Controle Positivo para detecção de: HSV1 e HSV2	1 x 100 µL	1 x 100 µL	1 x 100 µL
<b>CONTROLE POSITIVO 4</b>	Controle Positivo para detecção de: HHV6, HHV7 e B19	1 x 100 µL	1 x 100 µL	1 x 100 µL
<b>CONTROLE NEGATIVO</b>	Controle Negativo	1 x 1 mL	1 x 1 mL	1 x 1 mL

	(Água Livre de Nuclease)			
<b>Guia rápido</b>	Guia rápido	1 unidade	1 unidade	1 unidade

## 5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

### 5.1.1 CONTROLE POSITIVO

O Controle Positivo contém uma grande quantidade de cópias alvo, sendo recomendável abri-lo e manipulá-lo em área separada do laboratório, longe dos demais componentes. O Controle Positivo é em formato líquido e pronto para uso. O armazenamento do componente deve ser a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Recomenda-se separá-lo em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

### 5.1.2 MIX

Determinar o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles (um controle positivo e um negativo devem ser incluídos em cada corrida).

Abri e manipular os tubos de Mix na área de pré-PCR do laboratório. Descongele a mix e abra o tubo com cuidado. Misture suavemente pipetando para cima e para baixo. Centrifugue brevemente para remover as bolhas geradas durante a mistura.

A recomendação é separá-lo em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

Nota: O tubo de Mix pode ser mantido a  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  ou  $2-8^{\circ}\text{C}$  por até 4 horas.

### 5.1.3 Oligo Mix (PS)

Solução pronta para uso. Determinar o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles (um controle positivo e um negativo devem ser incluídos em cada corrida).

Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar suavemente pipetando para cima e para baixo e centrifugar brevemente (pulso) para remover as bolhas geradas durante a mistura.

### 5.1.4 Controle Negativo (CN)

Solução pronta para uso. Descongelar o Controle Negativo. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar e centrifugar brevemente (pulso).

## 6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Kit de extração de DNA/RNA
- ✓ Micropipetas ( $0,5 \mu\text{L} < \text{volume} < 1.000 \mu\text{L}$ );

**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 para tubos de 1,5 mL e tiras de poços de PCR ou placa de 96 poços (se disponível);
- ✓ 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 Mix é sensível a mudanças de estado físico e foi comprovado que suporta até sete ciclos de congelamento/descongelamento. Se uma corrida for realizada com um número baixo de amostras, recomenda-se a alíquota do reagente com antecedência. A Mix deve ser mantida 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.
- Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes.
- 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

- O kit de detecção de PCR em tempo real Neuro 11 contém um controle positivo e um negativo que devem ser incluídos em cada execução para interpretar corretamente os resultados.
- 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, verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio está 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 nas áreas de amplificação e de análises de dados (pós-PCR). Não compartilhar reagentes e equipamentos entre as diferentes áreas.

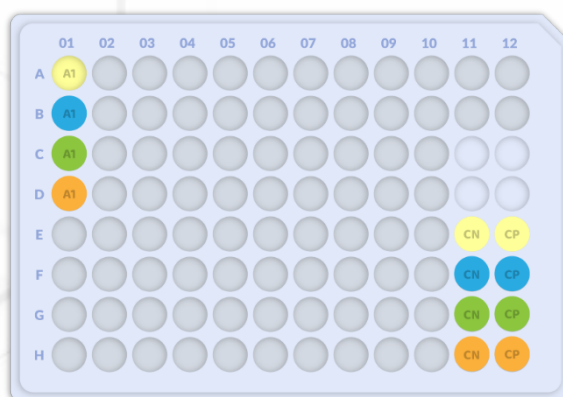
**IMPORTANTE:** A circulação de pessoas e equipamentos provenientes da área de amplificação para a área de preparo de reagentes deve ser evitada fortemente, para que não haja a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.

- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.
- Não misture reagentes de diferentes kits e/ou lotes e/ou de outro fornecedor.
- Proteger os reagentes contra umidade. A exposição prolongada à umidade pode afetar o desempenho do produto.

## 10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

### 10.1 PROTOCOLO DE PCR

- 1) Separar um microtubo de 1,5 mL (não fornecido) para preparar cada mistura de amplificação. Preparar uma mistura para cada frasco de Oligo Mix - PS (1, 2, 3 e 4).
- 2) Adicionar 10 µL da Mix e 5 µL da Oligo Mix de acordo com o número de reações desejado. Homogeneizar cuidadosamente.
- 3) Adicionar 15 µL da mistura de amplificação acima em cada poço de acordo com o número de reações necessárias.
- 4) Adicionar 5 µL de DNA/RNA extraído de cada amostra, Controle Positivo (frasco amarelo) e Controle Negativo (azul) em poços diferentes e fechar a placa.
- 5) Centrifugar brevemente a placa.
- 6) Colocar a placa no equipamento.
- 7) Após configurar a programação como descrito no subitem 12.3 - “PROGRAMAÇÃO DE PCR”, iniciar a corrida no termociclador.



### 10.2 PROGRAMAÇÃO DA PCR

Programe o termociclador seguindo as condições descritas abaixo:

CICLOS	ETAPAS	TEMPO	TEMPERATURA
1	Transcrição reversa	5 min	52 °C
1	Pré-incubação	10 seg	95 °C
12 Ciclos Touch Down	Desnaturação	1 seg	95 °C
Decréscimo de 1 °C em	Anelamento e extensão	30 seg	67 °C a 56 °C

<i>temperatura por ciclo</i>			
<b>35 ciclos</b>	Desnaturação	1 seg	95 °C
	Anelamento e extensão	30 seg	55 °C

### 10.3 SELEÇÃO DE DETECTORES

Selecionar os detectores informados na tabela abaixo, conforme o manual de instrução do equipamento a ser utilizado:

	PATÓGENO	REPORTER
PS 1	Vírus Epstein-Barr (EBV)	FAM
	RNase P (CI)	VIC
	Adenovírus (AdV)	Cy5
PS 2	Citomegalovírus (CMV)	FAM
	Enterovírus (EV)	VIC
	Parechovírus humano (HPeV)	ROX
	Vírus Varicela Zoster (VZV)	Cy5
PS 3	Vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1)	FAM
	Vírus herpes simplex tipo 2 (HSV2)	Cy5
PS 4	Vírus herpes humano tipo 6 (HHV6)	FAM
	Vírus herpes humano tipo 7 (HHV7)	ROX
	Eritrovírus B19	Cy5

**IMPORTANTE:** Retirar referência passiva do equipamento.

### 10.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O primeiro passo para a validação da corrida é a realização do correto ajuste manual do *threshold* que deve ser definido no início da fase exponencial (ponto de inflexão da curva em análise linear) de forma a excluir o ruído (*background*). O *baseline* poderá ser utilizado de forma automática.

Após a configuração de *threshold* e *baseline*, deve-se avaliar o formato das curvas de amplificação (padrão sigmoide) e os valores de amplificação (*Ct*) dos alvos do Controle Positivo, Negativo e Interno. O uso de controles positivos e negativos em cada execução, valida a reação verificando a ausência de sinal no poço do controle negativo e a presença de sinal para os patógenos de interesse no poço do controle positivo. Verifique o sinal de controle interno (CI) - Rnase P, para certificar o funcionamento correto da mix de amplificação. A análise das amostras é feita pelo *software* do próprio equipamento de PCR em tempo real utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Usando a tabela a seguir, leia e analise os resultados:

Alvo	Controle Interno	Resultado
+	+	Resultado POSITIVO para o alvo
+	-	Resultado POSITIVO para o alvo
-	+	Resultado Negativo para o Alvo
-	-	Resultado INVÁLIDO: problema de amostra/extração/inibição Recomenda-se repetição da extração da amostra e teste. Se o resultado ainda for inválido, uma nova amostra deve ser obtida. Se uma amostra clínica adicional

		não estiver disponível, reporte o resultado como INVÁLIDO
--	--	---

- + Ocorreu curva de amplificação
- Não ocorreu curva de amplificação

**NOTA:**

<sup>1</sup> O Controle negativo deve ficar abaixo do *threshold*. Se existir potencial contaminação (aparecimento de curva de amplificação no controle negativo ou conjunto de curvas em amostras com alto Ct), os resultados obtidos não são interpretáveis e toda a corrida (incluindo extração) deve ser repetida.

<sup>2</sup> Todos os Controles Positivos devem exibir um traço positivo (exponencial) de amplificação.

<sup>3</sup> Caso o Controle Interno (RNase P) não tenha sido detectado no PS 1, os resultados obtidos serão inválidos e toda a corrida deve ser repetida.

<sup>4</sup> As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

## 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 de 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 resultados obtidos com o Kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 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.

O tipo de amostra clínica validada é líquido cefalorraquidiano (LCR). O método foi validado com base no material genético 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 (abaixo do limite de detecção) pode ser detectado, mas os resultados podem não ser reprodutíveis.

Um teste positivo para o kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 não exclui a possibilidade de que outros patógenos estejam presentes na amostra clínica.

Um resultado negativo do teste não exclui que haja uma infecção 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.

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

## 12. DESEMPENHO



### 12.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica é a capacidade de um método analítico obter resultados positivos frente a resultados positivos obtidos pelo método de referência, até a menor quantidade do analito que pode ser mensurada. O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de cópias do alvo que pode ser detectada pelo sistema de ensaio com uma probabilidade de 95%.

A sensibilidade analítica do kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 foi determinada realizando diluição em série de 5 pontos para os alvos detectados no kit, sendo que o LOD foi realizado em triplicata para garantir seu limite.

PATÓGENO	SENSIBILIDADE (cópias/μl)
Vírus Epstein-Barr (EBV)	5
Adenovírus (AdV)	5
Citomegalovírus (CMV)	7,5
Enterovírus (EV)	5
Parechovírus humano (HPeV)	50
Vírus Varicela Zoster (VZV)	5
Vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1)	5
Vírus herpes simplex tipo 2 (HSV2)	5
Vírus herpes humano tipo 6 (HHV6)	5
Vírus herpes humano tipo 7 (HHV7)	5
Eritrovírus B19	5

### 12.2 ESPECIFICIDADE

A especificidade analítica é a capacidade de um método analítico de determinar somente o analito frente a outras substâncias presentes na amostra.

Os Microrganismos patogênicos de referência utilizados neste estudo são:

TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA	
MICROORGANISMO	RESULTADO
<i>Mycoplasma hominis</i>	NEGATIVO
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NEGATIVO
<i>Chlamydia trachomatis</i>	NEGATIVO
HRSVA - Vírus Sincicial Respiratório	NEGATIVO
Influenza A (FLU A)	NEGATIVO
Influenza B (FLU B)	NEGATIVO
Parainfluenza 1	NEGATIVO
Parainfluenza 2	NEGATIVO
Parainfluenza 3	NEGATIVO
Parainfluenza 4	NEGATIVO
Coronavírus 229E	NEGATIVO
<i>Staphylococcus capitis</i>	NEGATIVO
<i>Candida krusei</i>	NEGATIVO
Coronavírus HKU1	NEGATIVO
Coronavírus OC43	NEGATIVO

<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	NEGATIVO
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	NEGATIVO
<i>Candida albicans</i>	NEGATIVO
<i>Staphylococcus hominis</i>	NEGATIVO
<i>Treponema pallidum</i>	NEGATIVO
<i>Candida parapsilosis</i>	NEGATIVO
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NEGATIVO
<i>Toxoplasma gondii</i>	NEGATIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NEGATIVO
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NEGATIVO
<i>Measles Virus</i>	NEGATIVO

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

### 12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

### 12.4 PRECISÃO

#### 12.4.1 REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi analisada testando o método em triplicata em duas concentrações distintas utilizando controle molecular padrão 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 variabilidade entre os testes foi determinada a partir dos valores de Cts obtidos das repetições. O coeficiente de variação (CV) foi calculado como desvio padrão dividido pela média dos Cts, tendo como parâmetro CV < 10% e Desvio padrão < 3,2.

#### 12.4.2 REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi analisada testando o método em triplicata em duas concentrações distintas utilizando controle molecular padrão 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 sob condições operacionais distintas e diferentes lotes do kit RUO XGEN MULTI NEURO 11. A variabilidade entre os testes foi determinada a partir dos valores de Cts obtidos das repetições. O coeficiente de variação (CV) foi calculado como desvio padrão dividido pela média dos Cts, tendo como parâmetro CV < 10% e Desvio padrão < 3,2.

### 12.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 foi validado a partir de DNA/RNA purificado. A capacidade diagnóstica do kit RUO XGEN MULTI NEURO 11 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  $100 \times \frac{\text{número de valores verdadeiros negativos (VN)}}{\text{número de valores verdadeiros negativos (VN)} + \text{número de valores verdadeiros positivos (VP) incorretamente classificados}}$

dividido pela soma dos valores verdadeiros negativos (VN) mais o número de falsos positivos (FP) valores, ou  $100 \times \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$ .

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

Um total de 650 amostras clínicas de diferentes origens foram analisadas em um estudo retrospectivo. As amostras eram provenientes de um laboratório de análises clínicas, localizado no Rio de Janeiro e coletadas entre os anos de 2021 e 2023. Destas amostras, 590 foram positivas e 60 negativas. O estudo comparativo foi realizado utilizando como método de referência o kit XGEN MULTI NEURO 9 (ANVISA: 80502070036)

ORGANISMO	VN	FP	VP	FN	ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA	SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA
Vírus Epstein-Barr (EBV)	539	0	51	0	100,00%	100,00%
Adenovírus (AdV)	534	0	56	0	100,00%	100,00%
Citomegalovírus (CMV)	525	0	65	0	100,00%	100,00%
Enterovírus (EV)	525	0	65	0	100,00%	100,00%
Parechovírus humano (HPeV)	538	0	52	0	100,00%	100,00%
Vírus Varicela Zoster (VZV)	525	0	65	0	100,00%	100,00%
Vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1)	525	0	65	0	100,00%	100,00%
Vírus herpes simplex tipo 2 (HSV2)	524	0	66	0	100,00%	100,00%
Vírus herpes humano tipo 6 (HHV6)	536	0	54	0	100,00%	100,00%
Vírus herpes humano tipo 7 (HHV7)	564	0	26	0	100,00%	100,00%
Eritrovírus B19	565	0	25	0	100,00%	100,00%

### 13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

### 14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

### 15. REQUISITOS

Usuário 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 Segurança (FDS) do produto. O produto é destinado unicamente para uso profissional em laboratório, e não como fármaco, para uso doméstico ou outros fins.
- O RUO XGEN MULTI NEURO 11 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 KIT RUO XGEN MULTI NEURO 11 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 amostras não previstas na instrução de uso.

## 19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

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

Produto exclusivo para uso em pesquisa (RUO).