

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MASTER ADV

KIT MASTER PARA QUANTIFICAÇÃO DE ADENOVÍRUS

1. USO PRETENDIDO

O KIT XGEN MASTER ADV é um teste quantitativo que permite a amplificação e quantificação do DNA, através de PCR em Tempo Real, da região hexon do gene de Adenovírus em amostras de sangue total, plasma, swab ou lavado nasal.

O kit foi otimizado para uso nos aparelhos de PCR em Tempo Real: ABI 7500 e ABI 7500 Fast e Rotor-Gene Q.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

2. INTRODUÇÃO

Existem 51 subtipos de Adenovírus (ADV) divididos em 7 subgrupos (A a G) que podem causar infecções em humanos. As vias aéreas superiores são o local mais frequente da infecção por adenovírus. Em crianças pequenas e idosos pode causar pneumonia, meningite e encefalite. Com menor frequência podem causar conjuntivite hemorrágica, bronquiolite, cistite e gastroenterite.

A transmissão do vírus ocorre através do contato pessoa-a-pessoa e estima-se que de 5 a 6% das infecções respiratórias sejam provocadas por estes vírus. A maioria das infecções não requer qualquer intervenção terapêutica. As infecções graves por adenovírus necessitam, por vezes, de internamento e de tratamento de suporte específico, incluindo cuidados intensivos e ventilação assistida.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

A reação de PCR em Tempo Real explora a atividade exonuclease 5' da DNA Taq polimerase para clivar uma sonda TaqMan durante a amplificação. A sonda TaqMan é composta por um corante *reporter* na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante *reporter* com o corante *quencher* resulta em supressão da fluorescência *reporter*, principalmente por transferência de energia tipo Förster. Durante a reação, se o alvo de interesse estiver presente, a sonda se liga especificamente entre os primers *forward* e *reverse*, e a clivagem da sonda resulta na emissão de fluorescência do *reporter*, e o acúmulo de produtos de PCR é detectado diretamente pelo aumento da fluorescência deste corante.

Especificidade ADV	100% para Vírus ADV
Sensibilidade (LOD)	1,02 cópias/μL com probabilidade de ≥95%
Limite mínima de quantificação	2,35 cópias/μL

O kit é constituído de primers e sondas que permitem a correta identificação das seguintes espécies e sorotipos de Adenovírus:

ESPÉCIE	SOROTIPO
A	12 / 31
B	11 / 14 / 18
C	1 / 2 / 5 / 6 / 57
D	8-10 / 13 / 15 / 17 / 19 / 20 / 22-30 / 32 / 33 / 36-39 / 42-49 / 51 / 53 / 54 / 56
E	4
F	40 / 41
G	52

4. COMPONENTES

O formato padrão do kit contém reagentes para 48 ou 96 testes.

COMPONENTES	CONTEÚDO	48 TESTES (XG-ADV-MB-48)	96 TESTES (XG-ADV-MB-96)
MM ADV	mMix de Amplificação dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polimerase, UNG, Água livre de nuclease, ROX	3 x 220 µL	3 x 440 µL
PS ADV	Primers e Sondas ADV Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para ADV	3 x 130 µL	3 x 260 µL
PADRÃO ADV 10 ⁵	DNA clonado da região hexon do gene de ADV na concentração de 10 ⁵ cópias/µl	3 x 35 µL	3 x 70 µL
PADRÃO ADV 10 ⁴	DNA clonado da região hexon do gene de ADV na concentração de 10 ⁴ cópias/µl	3 x 35 µL	3 x 70 µL
PADRÃO ADV 10 ³	DNA clonado da região hexon do gene de ADV na concentração de 10 ³ cópias/µl	3 x 35 µL	3 x 70 µL
PADRÃO ADV 10 ²	DNA clonado da região hexon do gene de ADV na concentração de 10 ² cópias/µl	3 x 35 µL	3 x 70 µL
CI ADV	Controle Interno	3 x 100 µL	3 x 200 µL
CN	Controle Negativo	1 x 30 µL	1 x 60 µL

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O KIT XGEN MASTER ADV deve ser armazenado e transportado na embalagem original em temperatura controlada de -20°C e é estável até a data de vencimento indicada no rótulo. O transporte deve ser realizado em gelo seco.

Após a utilização, os componentes devem ser armazenados em temperatura controlada a -20°C. O congelamento e descongelamento repetido (mais de duas vezes) deve ser evitado, já que pode afetar a performance do ensaio. Em uso, os componentes são estáveis por até 7,5 horas em temperatura ambiente e em condições de luz normal.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Luvas Descartáveis Sem Talco;
- ✓ Microcentrífuga (12.000-14.000 rpm);
- ✓ Micropipetas calibradas (0,5 µL < volume < 200 µL);
- ✓ Ponteiras Estéreis com Filtro;
- ✓ Agitador Tipo *Vórtex* ou similar;
- ✓ Microtubos de 0,2 mL ou Microplacas de PCR, recomendados pelo fabricante do equipamento de PCR em Tempo Real;
- ✓ Filme selador;
- ✓ Banho-seco (para extração);
- ✓ Cabine de Fluxo Laminar;
- ✓ Kit de Extração de DNA;
- ✓ Microtubos Livres de Nuclease;
- ✓ Reagentes para descontaminação e equipamentos necessários;
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real.

ATENÇÃO: Uma calibração válida dos filtros (*Pure Spectra Component File*) e do *background* (*Background Component File*) deve ser feita rotineiramente

7. AVISOS E PRECAUÇÕES

7.1. O kit deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.

7.2. O pessoal técnico deve ser treinado no uso dos termocicladores em Tempo Real, na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em tempo real.

7.3. Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. O uso de objetos perfuro-cortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.

7.4. 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.

7.5. O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.

7.6. Evitar vibração na superfície da bancada onde o teste é realizado.

7.7. Após o recebimento, armazenar o kit a -20°C em freezer ou câmara fria com temperatura controlada.

7.8. Não trocar os componentes entre diferentes lotes dos kits. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.

7.9. Verificar se os reagentes estão limpos e não contém partículas visíveis pesadas ou grumos. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição do kit.

7.10. Manusear e descartar todos os materiais utilizados em local apropriado para descarte de resíduos perigosos. Além disso, deve-se seguir as leis locais para o descarte adequado.

7.11. Manter as áreas de extração e preparação de reagentes separada.

8. AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

O Kit XGEN MASTER ADV pode ser utilizado com DNA extraído de: sangue total, plasma, swab e lavado nasal. Amostras coletadas devem ser transportadas e armazenadas a +2° a +8°C e utilizadas em até 3 dias após a data de coleta. Armazenar a amostra a -20°C caso seja usada após 3 dias. Após armazenamento, as amostras a -20°C são estáveis por vários anos, verificar o procedimento interno do laboratório.

IMPORTANTE: Para utilização do kit com outras amostras deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

9. PREPARAÇÃO DOS COMPONENTES E AVISOS

9.1 MM ADV

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

9.2 PS ADV

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

9.3 PADRÃO ADV 10⁵/10⁴/10³/10²

Solução pronta para uso para ser utilizada como amostra na etapa de amplificação.

Não extrair o Controle Positivo, uma vez que a solução é constituída por plasmídeos e a reação será inibida.

9.4 CN

Descongelar o Controle Negativo. Antes de utilizar, homogeneizar em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).

9.5 CI ADV

Descongelar o Controle Interno. Antes de utilizar, homogeneizar em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).

IMPORTANTE: Para a extração de amostras de plasma, swab e lavado nasal, o Controle Interno deve ser adicionado à mistura de tampão de lise e amostra, de acordo com a Instrução de Uso fornecida pelo fabricante do kit de extração.

Na extração, para volume de eluição de 50 µL, recomenda-se adicionar 5 µL do Controle Interno ao tampão de lise em cada extração. Caso seja utilizado volume de eluição diferente do descrito acima, adicionar o volume de Controle Interno proporcional.

ELUIÇÃO	CI
50 µL a 99 µL	5 µL
>100 µL	10 µL

NOTA: Adicionar o Controle Interno a cada uma das amostras e ao Controle Negativo é uma etapa muito importante para confirmar o sucesso do procedimento de extração de ácido nucleico e para verificar possível inibição da PCR.

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS USADOS EM COMBINAÇÃO COM O KIT

10.1 Micropipetas

Devem ser 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 $\pm 5\%$.

10.2 Equipamento

O Kit **XGEN MASTER ADV** é direcionado para uso em combinação com os Termocicladores ABI 7500 e ABI 7500 Fast e Rotor-Gene Q.

NOTA: Os usuários finais devem seguir estritamente a instrução de uso fornecida pelo fabricante.

Para utilização do kit em outros equipamentos deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

11. CONTROLE DE PRÉ-ENSAIO E OPERAÇÕES

11.1. Verificar a data de validade do kit impresso na etiqueta externa da caixa.

11.2. Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis a olho nu ou grumos.

11.3. Verificar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.

11.4. Ligar os termocicladores, verificar as configurações e certificar-se de utilizar o protocolo de ensaio correto.

11.5. Seguir estritamente o manual do equipamento fornecido pelo fabricante para a correta configuração do termociclador em Tempo Real.

11.6. Verificar se as micropipetas estão configuradas para o volume necessário.

11.7. Verificar se todos os outros equipamentos estão prontos para uso.

11.8. Em caso de problemas, não continuar o teste e comunicar ao responsável pelo laboratório.

12. PROTOCOLO

IMPORTANTE: Um exemplo de gabarito para dispensação dos reagentes é informado no item Gabarito do Teste. Favor consultar o item antes de começar a ler as instruções abaixo.

IMPORTANTE: Utilizar somente microplacas recomendadas pelos fabricantes de termocicladores em Tempo Real.

12.1 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de controle negativo e controle positivo.

12.2 PREPARAÇÃO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

- Descongelar o reagente **MM ADV**, homogeneizar cuidadosamente em agitador tipo vórtex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo.
- Descongelar o reagente **PS ADV**, homogeneizar cuidadosamente em agitador tipo vórtex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo.
- Preparar a mistura de amplificação, de acordo com o número de amostras a serem analisadas:

Componente	X 1	X 32	X 64	X 96
MM	13,75 ul	440 ul	880 ul	1.320 ul
PS	8,1 ul	259,2 ul	518,4 ul	776,6 ul
Volume total	21,85 ul	699,2 ul	1.398,4 ul	2.096,6 ul

- Homogeneizar a mistura de amplificação em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).

IMPORTANTE: Certificar-se de congelar os volumes restantes dos reagentes não utilizados logo após a utilização.

12.3 PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

- Dispensar 20 µL da mistura de amplificação em cada microtubo ou poço da microplaca, conforme gabarito de este.
- Adicionar 5 µL de cada amostra extraída, CN extraído e padrões ADV conforme gabarito de teste.
- Fechar os microtubos ou selar a microplaca.

NOTA: em caso de termociclador Rotor-Gene Q, selar cada tubo com a tampa apropriada.

- Centrifugar brevemente os microtubos ou a microplaca a 2.000 rpm.
- Colocar os microtubos ou a microplaca no Termociclador de PCR em Tempo Real.

- f) Após configurar as operações descritas no no subitem “Programação da PCR”, iniciar a corrida no termociclador.

12.4 PROTOCOLO DE PCR

A programação deve ser feita conforme descrito abaixo.

PROGRAMA DE PCR		
50°C	2 min.	1
95°C	10 min.	1
95°C	15 seg.	45
60°C (Coleta de Dados)	1 min.	

AVISO: Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

a) Seleção de Detectores

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

1. ABI 7500, ABI 7500 Fast

Detecção	Reporter	Quencher
ADV	FAM	TAMRA
CONTROLE INTERNO (β-globina)	VIC	TAMRA

Configurar ROX como referência passiva.

2. Rotor-Gene Q

Reporter	Ganho
Verde	2
Amarelo	2
Laranja	5

13. GABARITO DO TESTE

Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e reagentes para uma análise qualitativa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	A1										
B	P2	A2										
C	P3	A3										
D	P4	A4										
E	CN	A5										
F		A6										
G		A7										
H		A8										

Legenda:

P1 = Padrão 10^5 cópias/ μ L

P2 = Padrão 10^4 cópias/ μ L

P3 = Padrão 10^3 cópias/ μ L

P4 = Padrão 10^2 cópias/ μ L

CN = Controle Negativo

A1 - A8 = Amostras

FUNDO AMARELO = Mistura de Amplificação (MM ADV + PS ADV)

14. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

a) Análise de Dados

Uma verificação é realizada nos Padrões sempre que o kit é utilizado a fim de verificar se os valores de Ct são os esperados e informados na tabela abaixo. Além disso, os valores de SLOPE e R^2 são verificados, a fim de garantir a qualidade da execução. Os seguintes requisitos devem ser cumpridos:

Critério	Faixa de aceite
Padrão 10^5 / μ L (FAM)	$Ct \leq 25$
R^2	$0,990 \leq r^2 \leq 1$
Slope	$-3,6 \leq Slope \leq -3,2$
Eficiência da PCR	$90 \leq \text{eficiência} \leq 100$

AVISO: Se a reação de amplificação o PADRÃO ADV 10^5 produzir um $Ct > 25$ ou indeterminado, a sessão não poderá ser considerada válida e deverá ser repetida.

Para cada amostra os *reporters* fluorescentes são adotados para validar a detecção de DNA de ADV como descrito na tabela abaixo:

ADV - FAM	CI - VIC/Hex	Resultado do Ensaio	Resultado Amostra
Ct INDETERMINADO	Ct > 28 ou indeterminado	Inválido	Repetir
	Ct < 28	Válido	Negativo
Ct DETERMINADO	Ct < 28	Válido	Positivo
	Ct > 28 ou indeterminado	Válido	Alto Positivo

NOTA:

¹ Os valores de Ct para a sonda específica de controle interno (β-globina) são usados para validar a sessão de análise, do processo de extração até a etapa de detecção. Um bom desempenho de extração apresenta um Ct entre 22 e 25.

² Caso uma amostra apresenta ADV com resultado indeterminado e um controle interno com Ct > 28, significa que houve problemas no estágio de extração ou no estágio de amplificação. Portanto, a amostra deve ser repetida.

³ Pode-se considerar válidas as amostras com Ct > 28 para o controle interno e alta concentração de DNA de ADV. Neste caso, a natureza competitiva da reação de PCR pode esconder ou prejudicar a amplificação do controle interno.

⁴ Se existir potencial contaminação na amostra Controle Negativo, os resultados obtidos não são interpretáveis e toda a corrida (incluindo extração) deve ser repetida.

15. QUANTIFICAÇÃO

A concentração dos padrões de quantificação é expressa em cópias/μL.

A concentração do genoma viral por mL para cada amostra de paciente é calculada aplicando a fórmula a seguir:

$$\text{Fator de conversão (Fc)} = \frac{\text{Volume de Eluição da Amostra (}\mu\text{L)}}{\text{Volume de Amostra na Extração (mL)}}$$

Para cada amostra positiva detectada com o produto, a correta quantificação da carga viral de ADV poderá ser aplicada, de acordo com a tabela abaixo.

DADO ANALÍTICO	DADO DIAGNÓSTICO
Corrida ADV (cópias/μL)	Carga Viral ADV (cópias/mL)
Quantidade ≥ 1,02	QUANTIFICAÇÃO*
Quantidade < 1,02	Carga Viral abaixo do LOQ

Cálculo para conversão de unidade:

$$\text{*Carga Viral ADV (cópias/mL)} = \text{Dado corrida (cópias/}\mu\text{L)} \times \text{Fc}$$

Os resultados obtidos com o Kit XGEN MASTER ADV 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.

16. SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
Ausência de sinal de amplificação no Controle Positivo	1-Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento 2-Configuração incorreta da reação de PCR. 3-Manuseio incorreto dos controles positivos. 4-Condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não estão de acordo com a instrução de uso ou a data de validade do kit expirou.	1- Comparar se a configuração está de acordo com a instrução de uso. 2.a- Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o procedimento, se necessário. 2.b-Checar a calibração das micropipetas. 3-Homogeneização inadequada ou descongelamento em temperatura diferente do ambiente. 4- Checar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.
Ausência de sinal / Sinal fraco de amplificação no Controle Interno	1-As condições da PCR não cumprem o protocolo. 2-A PCR foi inibida, não houve adição ou o volume de Controle Interno adicionado na etapa de extração não foi suficiente.	1-Verificar as condições da PCR e repetir o procedimento de acordo com a instrução de uso, se necessário. 2.a-Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit. 2.b-Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.
Sinal de amplificação no Controle Negativo	1-Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.	1.a-Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas. 1.b-É recomendado realizar a pipetagem do Controle Positivo após todos os outros reagentes. 1.c-Certificar-se de que o local de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

IMPORTANTE: Interpretação dos resultados deve ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório para reduzir o risco de erros e resultados mal interpretados. Quando os resultados do laboratório são transmitidos do laboratório para o centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erro na transferência de dados.

Se um ou mais dos problemas descritos na tabela acima acontecer, depois da investigação, informe qualquer problema residual ao supervisor para futuras ações.

17. 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 reproduzíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

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

18. GARANTIA DA QUALIDADE

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

18.1 GARANTIA

O produto XGEN MASTER ADV é garantido pela Mobius contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

18.2 EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

18.3 EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Clonit Srl
Via B. Quaranta 57
20139 Milão - Itália

Distribuído por:
Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.
Rua Paraíso do Norte, 866 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-221
Telefone: +55 (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

80502070079