

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MASTER EBV

KIT MASTER PARA QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS *EPSTEIN-BARR* (EBV)

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MASTER EBV é destinado para a detecção quantitativa do DNA do Vírus *Epstein-Barr* (EBV) em amostras de plasma e sangue total humano, com controle simultâneo de reação de extração/amplificação através do Controle Interno (CI).

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

Para uso em diagnóstico *in vitro* por profissionais.

1. 1 Introdução

O Vírus *Epstein-Barr* (EBV) é um γ -*Herpesvirus* com genoma linear de dupla fita, que infecta mais de 90% da população do mundo, deixando a maioria dos indivíduos com uma infecção silenciosa ao longo da vida. Embora a maioria das infecções primárias por EBV sejam assintomáticas, o vírus é o principal fator predisponente para o desenvolvimento de uma ampla gama de transtornos linfoproliferativos de células B (linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, e linfoma Hodgkin e não-Hodgkin), principalmente em indivíduos imunocomprometidos (como receptores de transplante e pacientes portadores de HIV). A detecção precoce do EBV é crucial para um tratamento eficaz e alteração da terapia com a droga imunossupressora que pode resultar na regressão da doença proliferativa.

Ensaio moleculares, como a PCR em Tempo Real, são uma ferramenta útil para o diagnóstico de infecção primária por EBV por serem metodologias rápidas e de fácil manipulação, com alta sensibilidade e especificidade.

A medição quantitativa do DNA do EBV é essencial para diferenciar portadores saudáveis com baixos níveis de carga viral e portadores com carga viral elevada, característica de doenças relacionadas ao EBV.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O Kit XGEN MASTER EBV deve ser armazenado na embalagem original em temperatura controlada entre +2°C e +8°C e seus componentes são estáveis até a data de vencimento indicada no rótulo. Uma vez dissolvidos, os componentes PS EBV e CI 1 são estáveis durante 4 meses em temperatura controlada entre -25°C e -15°C. Uma vez dissolvido, o componente PADRÃO EBV é estável durante 2 semanas em temperatura controlada entre -25°C e -15°C.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Esse kit realiza a detecção pelo método de PCR em Tempo Real, através de sondas e *primers* específicos.

O DNA do Vírus *Epstein-Barr* é recuperado das amostras biológicas durante a etapa de extração e posteriormente amplificado. O produto da amplificação é detectado por meio de uma sonda específica marcada com corante fluorescente para uma única sequência genômica do EBV, e quantificado a partir da comparação com a curva padrão gerada, para a determinação da carga viral. O Controle Interno (CI) funciona como controle da extração/amplificação para cada amostra processada individualmente, para identificação da presença de possíveis inibidores.

4. AMOSTRA

4.1 Tipos

O ensaio é para uso com ácido nucleico extraído de amostras de plasma e sangue total de origem humana.

4.2 Condições para coleta

1. O sangue deve ser colhido assepticamente por punção venosa, e o plasma deve ser preparado usando técnicas padrões de preparação de amostras para laboratórios de análises clínicas.
2. Nenhuma influência foi observada na preparação de amostras com citrato e EDTA.
ATENÇÃO: A heparina afeta as reações de PCR. Amostras que foram coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante não devem ser utilizadas. As amostras de pacientes heparinizados também não devem ser utilizadas.
3. Evitar qualquer adição de conservantes nas amostras.
4. As amostras devem ser claramente identificadas com códigos ou nomes, a fim de evitar resultados com erros de interpretação.
5. Amostras hemolisadas e hiperlipêmicas têm de ser descartadas, pois podem gerar falsos resultados.
6. Amostras contendo resíduos de fibrinas, partículas pesadas ou filamentos e corpos microbianos devem ser descartadas, pois podem gerar falsos resultados.
7. As amostras de plasma para extração de DNA devem ser coletadas de acordo com os procedimentos laboratoriais comuns, transportados e armazenados entre +2°C a +8°C, pelo período máximo de 4 horas.

4.3 Manuseio e preservação

É recomendado, para melhor armazenamento das amostras, separá-las em várias alíquotas (volume mínimo de 300 µL) e armazená-las congeladas a -20°C por um período máximo de 30 dias ou -80°C por períodos maiores. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

Quando utilizar amostras congeladas, só descongelar no momento da extração, a fim de evitar possíveis casos de degradação do ácido nucléico.

Amostras de sangue total podem ser armazenadas entre +2°C e +8°C por no máximo três dias. Amostras congeladas podem sofrer lise celular e perda de carga viral.

4.4 Preparo

As amostras devem passar por processo de extração e purificação do material genético.

Para a extração de DNA, 5 µL de Controle Interno poderá ser adicionado à amostra, de acordo com a Instrução de Uso fornecida pelo fabricante do kit de extração.

IMPORTANTE: O Controle Interno (CI) que acompanha o kit de detecção pode ser usado no procedimento de extração como controle de extração. O valor de C_t do CI é usado para avaliar se o procedimento de extração foi realizado corretamente.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão do kit contém reagentes para 25, 50 e 100 testes.

COMPONENTES	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE		
		25 TESTES	50 TESTES	100 TESTES
MM 1	Solução de Master Mix	1 x 400 µL	1 x 825 µL	2 x 825 µL
PS EBV	Primers e Sondas liofilizado*	1 tubo	2 tubos	4 tubos
PADRÃO EBV	Padrão Quantitativo liofilizado* (6,72x10 ⁴ cópias/µL)	4 tubos	4 tubos	4 tubos
CI 1	Controle Interno liofilizado*	1 tubo	2 tubos	4 tubos
ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE	Água livre de DNase/RNase	2 x 1,5 mL	4 x 1,5 mL	5 x 1,5 mL
CN 1	Controle Negativo	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL
GUIA RÁPIDO	Guia Rápido	1 unidade	1 unidade	1 unidade

*Material liofilizado que deverá ser diluído com Água livre de DNase/RNase, conforme volume indicado na etiqueta do componente.

5.1 Preparo e preservação dos reagentes

5.1.1 MM 1

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

AVISO: A MM 1 é sensível à luz. Proteger de forte exposição à luz.

5.1.2 PS EBV

Centrifugar o frasco a 11.000 rpm por 2 minutos. Abrir cuidadosamente a tampa do frasco evitando dispersão de pó. Ressuspender homogeneamente o componente liofilizado com o volume da Água livre de DNase/RNase indicado no rótulo do frasco. Homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso). Aguardar 10 minutos em temperatura ambiente (15°C < TA < 25°C). Homogeneizar novamente em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

AVISO: O PS EBV é sensível à luz. Proteger de forte exposição à luz.

5.1.3 Padrão EBV

Centrifugar o frasco a 11.000 rpm por 2 minutos. Abrir cuidadosamente a tampa do frasco evitando dispersão de pó. Ressuspender homogeneamente o componente liofilizado com o volume da Água livre de DNase/RNase indicado no rótulo do frasco. Homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso). Aguardar 10 minutos em temperatura ambiente (+15°C a +25°C). Homogeneizar novamente em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

5.1.3.1 Preparo da curva padrão

- Separar 4 microtubos livres de nucleases para preparação da curva padrão.

- Estabelecer um padrão de diluição em série de 1:10 da solução original, para obter os pontos da curva padrão como descrito na tabela abaixo.

PREPARO DA CURVA PADRÃO		
PADRÃO EBV	67.200 cópias/ μ L ou 67.200 UI/ μ L	Adicionar o volume da Água livre de DNase/RNase, conforme volume indicado na etiqueta do frasco.
Padrão 1	6.720 cópias/ μ L ou 6.720 UI/ μ L	10 μ L (Padrão EBV) + 90 μ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 2	672 cópias/ μ L ou 672 UI/ μ L	10 μ L (Padrão 1) + 90 μ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 3	67,2 cópias/ μ L ou 67,2 UI/ μ L	10 μ L (Padrão 2) + 90 μ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 4	6,72 cópias/ μ L ou 6,72 UI/ μ L	10 μ L (Padrão 3) + 90 μ L Água livre de DNase/RNase

5.1.4 CI 1

Centrifugar o frasco a 11.000 rpm por 2 minutos. Abrir cuidadosamente a tampa do frasco evitando dispersão de pó. Ressuspender homogeneamente o componente liofilizado com o volume da Água livre de DNase/RNase indicado no rótulo do frasco. Homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso). Aguardar 10 minutos em temperatura ambiente ($15^{\circ}\text{C} < \text{TA} < 25^{\circ}\text{C}$). Homogeneizar novamente em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

5.1.5 Água livre de DNase/RNase

Solução pronta para uso.

5.1.6 CN 1

Solução pronta para uso.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

A lista a seguir inclui os materiais que são necessários para uso, mas que não são incluídos no kit XGEN MASTER CMV:

- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Microcentrífuga de placas (quando aplicável);
- ✓ Micropipetas calibradas ($0,5 \mu\text{L} < \text{volume} < 1.000 \mu\text{L}$);
 - As micropipetas devem estar calibradas para dispensar o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a descontaminações regulares 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 uma exatidão de $\pm 5\%$.
- ✓ Microtubos livres de nucleases;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro, compatíveis com as pipetas;
- ✓ Racks para tubos;

- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor.

7. ESTABILIDADE EM USO

Recomenda-se realizar somente um ciclo de congelamento/descongelamento após a ressuspensão dos reagentes. Caso sejam utilizados de forma intervalada, sugere-se que sejam realizadas alíquotas em tubos livres de RNase e DNase, de acordo com a necessidade. As diluições do componente PADRÃO EBV para a realização da curva padrão, devem ser descartadas logo após a finalização do ensaio.

8. ORIENTAÇÕES GERAIS

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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

1. Não utilizar reagentes ou materiais fora da data de validade.
2. 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.
3. Ligar o termociclador, verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio está correto.
4. Seguir estritamente o manual do equipamento fornecido pelo fabricante para a correta configuração do termociclador em Tempo Real.
5. Não trocar os componentes entre diferentes lotes do produto. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
6. O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes.
7. 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.
8. 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.

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 Curva Padrão.

10.2 Preparo da mix de amplificação

10.2.1 CI como Controle de Amplificação

COMPONENTE	NÚMERO DE REAÇÕES			
	x 1	x 25	x 50	x 100
MM 1	15 µL	375 µL	750 µL	1.500 µL
PS EBV	2 µL	50 µL	100 µL	200 µL
CI 1	0,5 µL	12,5 µL	25 µL	50 µL
ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE	2,5 µL	62,5 µL	125 µL	250 µL
Volume Total	20 µL	500 µL	1.000 µL	2.000 µL

- Separar um microtubo de 1,5 mL para preparar a mistura de amplificação.
- Homogeneizar o reagente MM 1 em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).
- Homogeneizar os reagentes PS EBV e CI 1 já reconstituídos em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).
- Pipetar a quantidade requerida dentro do microtubo, de acordo com a relação da quantidade dos outros reagentes. Trocar as ponteiros após cada passo de pipetagem.

Se o Controle Interno foi adicionado no procedimento de extração do DNA, prepare a reação seguindo o quadro abaixo.

10.2.2 CI como Controle de Extração/Amplificação

COMPONENTE	NÚMERO DE REAÇÕES			
	x 1	x 25	x 50	x 100
MM 1	15 µL	375 µL	750 µL	1.500 µL
PS EBV	2 µL	50 µL	100 µL	200 µL
ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL
Volume Total	20 µL	500 µL	1.000 µL	2.000 µL

- Separar um microtubo de 1,5 mL para preparar a mistura de amplificação.
- Homogeneizar os reagentes MM 1 e água livre de DNase/RNase em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).
- Homogeneizar o reagente PS EBV já reconstituído em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).

- Pipetar a quantidade requerida dentro do microtubo, de acordo com a relação da quantidade dos outros reagentes. Trocar as ponteiros após cada passo de pipetagem.

10.3 Procedimento de amplificação

- Dispensar 20 μL da mistura de amplificação em cada poço da microplaca conforme o gabarito do teste.
- Adicionar 10 μL de cada amostra extraída, CN extraído e diluições do PADRÃO EBV conforme gabarito de teste.
- Selar a microplaca.
- Centrifugar brevemente a microplaca a 2.000 rpm.
- Não deixar a microplaca preparada em temperatura ambiente por mais de 30 minutos e exposta à luz.
- Colocar a microplaca no termociclador de PCR em Tempo Real.
- Após configurar a programação como descrito no subitem 10.4 - “Programação da PCR”, iniciar a corrida no termociclador.

IMPORTANTE: Após a ressuspensão dos componentes liofilizados, eles não são estáveis por mais de 3 horas, se mantidos entre $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$. Os tubos com as diluições seriadas do PADRÃO EBV deverão ser descartados ao fim da rotina.

Abaixo está um exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e reagentes do Kit XGEN MASTER EBV na placa de PCR.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	CN	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LEGENDA:

P1 = Padrão $6.720 (6,72 \times 10^3)$ cópias/ μL

P2 = Padrão 672 ($6,72 \times 10^2$) cópias/ μL

P3 = Padrão 67,2 ($6,72 \times 10^1$) cópias/ μL

P4 = Padrão 6,72 cópias/ μL

CN = Controle Negativo

A1 - A7 = Amostras

FUNDO AMARELO = Mistura de Amplificação (MM 1+ PS EBV + ÁGUA LIVRE DE DNase/RNase)

10.4 Programação da PCR

A programação deve ser feita conforme descrito abaixo. Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Hold	50 °C	2 min.	1
Hold	95 °C	10 min.	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	15 seg.	50
	60 °C (*)	1 min.	

10.5 Seleção dos detectores

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

ALVO	REPÓRTER	QUENCHER
EBV	FAM	Não Fluorescente
CI	JOE/VIC	Não Fluorescente

IMPORTANTE: Configurar ROX como referência passiva.

10.6 Configurações pré-análise

É necessária a realização de ajuste de configuração para avaliação dos parâmetros de validação da corrida. Recomenda-se definir os valores de limite (*threshold*) para cada canal (alvo) independentemente. Use a curva de amplificação do controle positivo como ponto de partida durante a validação da execução (antes da interpretação de resultados amostrais do paciente), a fim de garantir que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo (*background*). O valor do limite (*threshold*) para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades de sinal.

10.7 Validação da corrida

Os valores de *SLOPE* e R^2 da corrida, assim como o valor de *Ct* do Padrão 1 devem ser verificados, a fim de garantir a qualidade da execução, e devem estar de acordo com a tabela abaixo.

CRITÉRIO	FAIXA DE ACEITE
<i>SLOPE</i>	$-3,1 > SLOPE > -3,9$
R^2	$> 0,98$
Valor de <i>Ct</i> do Padrão 1	$22 < Ct < 24,5$

Para cada amostra o repórter fluorescente FAM e JOE/VIC são adotados para validar a detecção de DNA de EBV como descrito na tabela abaixo.

EBV (FAM)	CI (JOE/VIC)	RESULTADO DO ENSAIO
Ct determinado	24 < Ct < 40	VÁLIDO
	Ct > 40 ou indeterminado	INVÁLIDO*
Ct indeterminado	24 < Ct < 40	VÁLIDO
	Ct > 40 ou indeterminado	INVÁLIDO**

IMPORTANTE:

* A alta concentração inicial de DNA de EBV (sinal FAM positivo) pode levar a um sinal REDUZIDO do Controle Interno devido à competição entre os reagentes.

** Nestes casos podem ocorrer problemas durante a etapa de amplificação (ineficiência ou ausência de amplificação) ou durante a etapa de extração (presença de inibidores ou amostras iniciais contendo número insuficiente de células), o qual pode levar a resultados incorretos e falsos negativos. O procedimento deve ser repetido iniciando a partir da etapa de extração usando amostra fresca vinda do paciente.

10.7 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 abaixo.

$$\text{Fator de conversão (Fc)} = \frac{\text{Volume de eluição de amostra (uL)}}{\text{Volume inicial de amostra na extração (mL)}}$$

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

DADO ANALÍTICO	DADO DIAGNÓSTICO
Dado Corrida EBV (cópias/μL)	Carga Viral EBV (cópias/mL)
Quantidade > 10.000 (1x10 ⁴)	Carga viral acima do LOQ = 10.000 (1x10 ⁴) x Fc
2 ≤ Quantidade ≤ 10.000 (1x10 ⁴)	QUANTIFICAÇÃO
Quantidade < 2	Carga Viral abaixo do LOQ = 2 x Fc

Cálculo para quantificação:

$$\text{Carga viral (cópias / mL)} = \text{Dado da corrida (cópias)} \times \text{Fc}$$

Para converter a carga viral da amostra expressa em cópias/mL para UI/mL, o fator de conversão é 1*, ou seja 1,0 cópia/mL = 1,0 UI/mL.

AVISO: *O Kit XGEN MASTER EBV foi validado para utilização em combinação com o kit de extração QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) e Mini Spin Plus (BIOPUR). O fator de conversão da concentração das amostras de cópias/mL para Unidades Internacionais (UI/mL) foi determinado de acordo com a 1ª WHO International Standard for Epstein-Barr virus (NBISC Code 09/260), e é aplicável para os kits de extração indicados acima em conjunto com os instrumentos recomendados na Instrução de Uso.

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 no termociclador, são essenciais 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 XGEN MASTER EBV 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

12.1 Sensibilidade

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.

12.2 Especificidade

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%. O limite de quantificação (LOQ) foi determinado por meio da medição da linearidade (SLOPE), a faixa dinâmica e a reprodutibilidade.

12.3 Exatidão

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

12.4 Precisão

Por fim, o ensaio de precisão foi realizado através do resultado de um mesmo analito medido diversas vezes sob mesmas condições operacionais (repetibilidade) e sob condições operacionais distintas (reprodutibilidade). O resultado pode ser visualizado através do coeficiente de variação (CV%). Assim, os limites da faixa dinâmica são os limites mínimo e máximo da quantificação e foram estabelecidos conforme tabela abaixo.

CRITÉRIO	RESULTADO
Limite de detecção	0,6 cópias/μL
Limite máximo de quantificação	10.000 cópias/μL (1x10 ⁴ cópias/μL)
Limite mínimo de quantificação	2 cópias/μL
Especificidade	100%
Repetibilidade	CV% < 10%
Reprodutibilidade	CV% < 10%

13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

15. REQUISITOS

Usuário profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Os resultados obtidos com o Kit XGEN MASTER EBV 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.

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
Controle interno com sinal fraco ou sem sinal de amplificação	As condições da PCR não cumprem o protocolo.	Verificar as condições da PCR e repetir o procedimento de acordo com a instrução de uso, se necessário.
	A PCR foi inibida, não houve adição ou o volume de Controle Interno adicionado na etapa de extração não foi suficiente.	Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit.
	Sinal positivo forte do alvo EBV (FAM)	Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.
Curva padrão sem sinal de amplificação	Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.	Comparar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
	Erros de pipetagem	Checar a calibração das micropipetas.
		Verificar se os reagentes estão sendo manuseados corretamente.
	Homogeneização inadequada.	
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.	Checar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.	
		Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas.

Controle negativo com sinal de amplificação	Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.	É recomendado realizar a pipetagem da Curva Padrão após todos os outros reagentes.
		Certificar-se de que o local de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

IMPORTANTE: A 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. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Não aplicável.

18. GARANTIA

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

- Garantia contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar na proposta. Abrange defeitos de produção.
- Exceções na garantia: todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Extinção da garantia: quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

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

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

CNPJ: 04.645.160/0002-20

Rua Paraíso do Norte, 866 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-221

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

80502070016