

## INSTRUÇÕES DE USO

### XGEN MASTER HHV6

KIT MASTER PARA QUANTIFICAÇÃO DE *HERPESVÍRUS HUMANO 6* (HHV6)

#### 1. FINALIDADE E MODO DE USO

O Kit XGEN MASTER HHV6 é destinado para a detecção quantitativa do DNA do vírus herpes humano tipo 6 (HHV6) em amostra de plasma ou 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*.

##### 1. 1 Introdução

O vírus herpes humano tipo 6 (HHV6) é um  $\beta$ -herpesvírus com duas variantes, A e B, e infecta cerca de 90% da população antes de dois anos de idade. As infecções primárias em crianças muitas vezes resultam em febre seguida por desenvolvimento de exantema súbito. Após a infecção primária, a latência é estabelecida em células progenitoras mielóides e da medula óssea e permanecem durante o tempo de vida do hospedeiro. O vírus reativa-se periodicamente a partir deste estado latente, com o DNA do HHV6 detectável em adultos saudáveis. A reativação em portadores saudáveis é muitas vezes assintomática, mas portadores do vírus com estado clínico imunodeprimido podem ter sérias complicações em função da infecção.

Os ensaios moleculares, como os ensaios de PCR em Tempo Real, são ferramentas úteis para o diagnóstico de infecção primária por HHV6 por causa da alta sensibilidade e especificidade.

#### 2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O Kit XGEN MASTER HHV6 deve ser armazenado na embalagem original em temperatura controlada entre +2°C a +8°C e são estáveis até a data de vencimento indicada no rótulo. Uma vez reconstituído, o componente PS HHV6 e o componente CI 1 são estáveis durante 4 meses em temperatura controlada entre -25°C a -15°C. Uma vez reconstituído, o componente PADRÃO HHV6 é estável durante 2 semanas em temperatura controlada entre -25°C a -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 herpes humano tipo 6 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 HHV6 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.
8. Amostras de sangue total devem ser coletadas em tubos de coleta com EDTA, de acordo com a orientação do laboratório, e armazenado entre +2°C e +8°C por no máximo três dias. Amostras congeladas podem sofrer lise celular e perda de carga viral.

### 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.

### 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 mistura de tampão de lise e 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
<b>MM 1</b>	Solução de Master Mix	1 x 400 µL	1 x 825 µL	2 x 825 µL
<b>PS HHV6</b>	Primer e Sondas liofilizado*	1 Tubo	2 Tubos	4 Tubos
<b>PADRÃO HHV6</b>	Padrão Quantitativo liofilizado*	2 Tubos	3 Tubos	4 tubos
<b>CI 1</b>	Controle Interno liofilizado*	1 Tubo	2 Tubos	4 Tubos
<b>ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE</b>	Água Livre de DNase/RNase	2 x 1,5 mL	4 x 1,5 mL	4 x 1,5 mL
<b>CN 1</b>	Controle Negativo	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL
<b>GUIA RÁPIDO</b>	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 HHV6

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° a +25°C). Homogeneizar em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

**AVISO:** O PS HHV6 é sensível à luz. Proteger de forte exposição à luz.

### 5.1.3 PADRÃO HHV6

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 em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

#### 5.1.3.1 Preparo da curva padrão

- Preparar 04 tubos 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 HHV6	165.000 cópias/ $\mu$ L	Adicionar o volume da Água livre de DNase/RNase, conforme volume indicado na etiqueta do frasco.
Padrão 1	16.500 cópias/ $\mu$ L	10 $\mu$ L (Padrão HHV6) + 90 $\mu$ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 2	1.650 cópias/ $\mu$ L	10 $\mu$ L (Padrão 1) + 90 $\mu$ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 3	165 cópias/ $\mu$ L	10 $\mu$ L (Padrão 2) + 90 $\mu$ L Água livre de DNase/RNase
Padrão 4	16,5 cópias/ $\mu$ L	10 $\mu$ L (Padrão 3) + 90 $\mu$ 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° a 25°C). Homogeneizar 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  $\mu$ L < volume < 1.000  $\mu$ 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 HHV6 para a realização da curva 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 ponteiras descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiras 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.
9. 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 mistura de amplificação

### 10.2.1 CI como Controle de Amplificação

COMPONENTE	NÚMERO DE REAÇÕES			
	x 1	x 25	x 50	x 100
MM 1	12,5 µL	312,5 µL	625 µL	1.250 µL
PS HHV6	2 µL	50 µL	100 µL	200 µL
CI 1	0,5 µL	12,5 µL	25 µL	50 µL
Volume Total	15 µL	375 µL	750 µL	1.500 µL

1. Separar um microtubo de 1,5 mL para preparar a mistura de amplificação.
2. Homogeneizar o reagente MM 1 em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).
3. Homogeneizar os reagentes PS HHV6 e CI 1 já reconstituídos em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).
4. 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	12,5 µL	312,5 µL	625 µL	1.250 µL
PS HHV6	2 µL	50 µL	100 µL	200 µL
Água livre de DNase/RNase	0,5 µL	12,5 µL	25 µL	50 µL
Volume Total	15 µL	375 µL	750 µL	1.500 µL

1. Separar um microtubo de 1,5 mL para preparar a mistura de amplificação.
2. Homogeneizar os reagentes MM 1 e água livre de DNase/RNase em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).
3. Homogeneizar o reagente PS HHV6 já reconstituído em agitador tipo vortex e centrifugar brevemente (pulso).
4. 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

1. Dispensar 15 µL da mistura de amplificação em cada poço da microplaca conforme gabarito de teste.

2. Adicionar 10 µL de cada amostra extraída, CN extraído e diluições do PADRÃO HHV6 conforme gabarito de teste.
3. Selar a microplaca.
4. Centrifugar brevemente a microplaca a 2.000 rpm.
5. Não deixar a microplaca preparada em temperatura ambiente por mais de 30 minutos e exposta à luz.
6. Colocar a microplaca no termociclador de PCR em Tempo Real.
7. Após configurar as operações descritas 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°C a 8°C. Os tubos com as diluições seriadas do Padrão HHV6 deverão ser descartados após o 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 16.500 (1,65x10<sup>4</sup>) cópias/µL

P2 = Padrão 1.650 (1,65x10<sup>3</sup>) cópias/µL

P3 = Padrão 165 (1,65x10<sup>2</sup>) cópias/µL

P4 = Padrão 16,5 (1,65x10<sup>1</sup>) cópias/µL

CN = Controle Negativo

A1 - A7 = Amostras

FUNDO AMARELO = Mistura de Amplificação (MM 1 + PS HHV6 + ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE ou CI)

**10.3 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
HHV6	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	$20,5 < Ct < 23$

Para cada amostra os repórteres fluorescentes FAM e JOE/VIC são adotados para validar a detecção de DNA de HHV6 como descrito na tabela abaixo.

HHV6 (FAM)	CI (JOE/VIC)	Resultado do Ensaio
Ct DETERMINADO	$24 < Ct < 40$	VÁLIDO
	Ct > 40 ou INDETERMINADO	VÁLIDO <sup>1</sup>
Ct INDETERMINADO	$24 < Ct < 40$	VÁLIDO
	Ct > 40 ou INDETERMINADO	INVÁLIDO <sup>2</sup>

<sup>1</sup> A concentração de DNA de HHV6 (SINAL DE FAM POSITIVO) acima de 100.000 cópias/ $\mu$ L pode levar a um sinal REDUZIDO ou AUSENTE do Controle Interno devido à competição entre os reagentes.

<sup>2</sup> 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.

## 10.6 Quantificação

A concentração dos padrões de quantificação é expressa em cópias/ $\mu$ L. 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 com o produto, a correta quantificação da carga viral de HHV6 poderá ser aplicada, de acordo com a tabela abaixo.

DADO ANALÍTICO Dado Corrida HHV6 (cópias/ $\mu$ L)	DADO DIAGNÓSTICO Carga Viral HHV6 (cópias/mL)
Quantidade > 165.000.000 ( $1,65 \times 10^8$ )	Carga Viral acima do LOQ = 165.000.000 ( $1,65 \times 10^8$ ) x Fc
$0,5 \leq$ Quantidade $\leq$ 165.000.000 ( $1,65 \times 10^8$ )	QUANTIFICAÇÃO*
Quantidade < 0,5	Carga Viral abaixo do LOQ = 0,5 x Fc

Cálculo para conversão de unidade:

$$\text{*Carga Viral HHV6 (cópias/mL)} = \text{Dado corrida (cópias/ $\mu$ L)} \times \text{Fc}$$

## 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 XGEN MASTER HHV6 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 como aspectos essenciais na sequência dos 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. Os valores de sensibilidade analítica do kit XGEN MASTER HHV6 estão na tabela a seguir. 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.

CRITÉRIO	RESULTADO
Limite de detecção	0,5 cópias/ $\mu$ L
Limite máximo de quantificação	165.000.000 cópias/ $\mu$ L ( $1,65 \times 10^8$ cópias/ $\mu$ L)
Limite mínimo de quantificação	0,5 cópias/ $\mu$ L

### 12.2 Especificidade

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

CRITÉRIO	RESULTADO
Especificidade	100%

### 12.3 Exatidão

Não aplicável.

### 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
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 HHV6 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
<b>Controle interno com sinal fraco ou sem sinal de amplificação</b>	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 HHV6 (FAM).	Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.
<b>Curva padrão sem sinal de amplificação</b>	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.	
<b>Controle negativo com sinal de amplificação</b>	Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.	Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas.
		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.

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 | 0800-7101850

E-MAIL: [suporte@mobiuslife.com.br](mailto:suporte@mobiuslife.com.br) | Website: [www.mobiuslife.com.br](http://www.mobiuslife.com.br)

CNPJ: 04.645.160/0001-49

#### **20. REGISTRO ANVISA**

80502070011