

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MASTER HHV8 (XG-HHV8-MB)

KIT MASTER PARA QUANTIFICAÇÃO DE HERPESVIRUS HUMANO 8

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MASTER HHV8 é um teste quantitativo que permite à amplificação e quantificação do DNA, através de PCR em tempo real, do gene da proteína de capsídeo menor do genoma do HHV8 em amostras de sangue total e LCR.

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

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

1.1 INTRODUÇÃO

O Herpesvirus Humano 8 (HHV8) é um γ -herpesvirus também conhecido como herpesvirus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV). O HHV8 causa infecções principalmente em indivíduos imunocomprometidos e além do Sarcoma de Kaposi, também está associado com a doença de Castleman multicêntrica e linfoma. Os produtos do gene HHV8 promovem a proliferação de células do fuso e angiogênese e, portanto, podem eventualmente levar à transformação do tumor.

Vários subtipos de HHV8 já foram reportados baseado na alta variabilidade do gene *K1* e estão correlacionados com as origens geográficas e étnicas. A soroprevalência do HHV8 é maior em países do Mediterrânea e África Subsaariana. No Brasil, a soroprevalência na população em geral é de aproximadamente 2,5%, enquanto pacientes com HIV e Sarcoma de Kaposi, este número pode chegar até 98%.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN MASTER HHV8 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.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

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*. O acúmulo de produtos de PCR é detectado diretamente pelo aumento da fluorescência deste corante.

A utilização do kit XGEN MASTER HHV8 permite a detecção e quantificação do HHV8 e estudos epidemiológicos em populações de risco.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O ensaio deve ser realizado com ácido nucleico extraído de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e amostras de sangue.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

- O sangue deve ser colhido assepticamente por punção venosa.
- 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.
- 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.
- Amostras hemolisadas e hiperlipêmicas têm de ser descartadas, pois podem gerar falsos resultados.
- Amostras contendo resíduos de fibrinas, partículas pesadas ou filamentos e corpos microbianos devem ser descartadas, pois podem gerar falsos resultados.

4.3 MANUSEIO

Amostras de sangue devem ser transportadas e armazenadas entre 2° a 8° C e utilizadas em até 3 dias após a data de coleta. Amostras de LCR manter armazenado a -20°.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

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

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

Para a extração de DNA, o 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.

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

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

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

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

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE	
		48 TESTES	96 TESTES
MM HHV8	Solução de Master Mix	3 x 220 µL	3 x 440 µL
PS HHV8	Primers e Sondas	3 x 130 µL	3 x 260 µL

PADRÃO HHV8 10⁵	DNA clonado na concentração de 10 ⁵ cópias/μl	3 x 35 μL	3 x 70 μL
PADRÃO HHV8 10⁴	DNA clonado na concentração de 10 ⁴ cópias/μl	3 x 35 μL	3 x 70 μL
PADRÃO HHV8 10³	DNA clonado na concentração de 10 ³ cópias/μl	3 x 35 μL	3 x 70 μL
PADRÃO HHV8 10²	DNA clonado na concentração de 10 ² cópias/μl	3 x 35 μL	3 x 70 μL
CI HHV8	Controle Interno	3 x 100 μL	3 x 200 μL
CN	Controle Negativo	1 x 30 μL	1 x 60 μL

5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

5.1.1 MM HHV8

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.

5.1.2 PS HHV8

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.

5.1.3 PADRÃO HHV8 10⁵/10⁴/10³/10²

Solução pronta para uso para ser utilizada como amostra na etapa de amplificação. Não extrair o Padrão, uma vez que a solução é constituída por plasmídeos e a reação pode ser inibida.

5.1.5 CI HHV8

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

5.1.4 CN

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

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Micropipetas (0,5 μL < volume < 1.000 μL);

IMPORTANTE: Devem estar calibradas para distribuir o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a regulares descontaminações das partes que podem acidentalmente entrar em contato com a amostra. Elas devem ser certificadas e devem estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e exatidão de ± 5%.

- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Racks para tubos;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livre de nuclease;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Cabine de fluxo laminar.

- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor.
- ✓ Microtubos de 0,2 mL ou Microplacas de PCR, recomendados pelo fabricante do equipamento de PCR em tempo real;
- ✓ Filme selador;
- ✓ Kit de Extração de DNA;

7. ESTABILIDADE EM USO

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. Caso sejam utilizados de forma intervalada, sugere-se que sejam realizadas alíquotas em tubos livres de RNase e DNase, de acordo com a necessidade. Em uso, os componentes são estáveis por até 5 horas em temperatura ambiente e em condições de luz normal.

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. Todas as amostras de soro humano, sangue e plasma devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor.
- Os resíduos gerados durante a utilização do kit devem ser descartados de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

9. RECOMENDAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE

- Não utilizar reagentes ou materiais fora da data de validade.
- Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
- Ligar o termociclador, 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 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.

- Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança II, como recomendado pela legislação em vigor.
- 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 CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de controle negativo e os padrões

10.2 PREPARO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

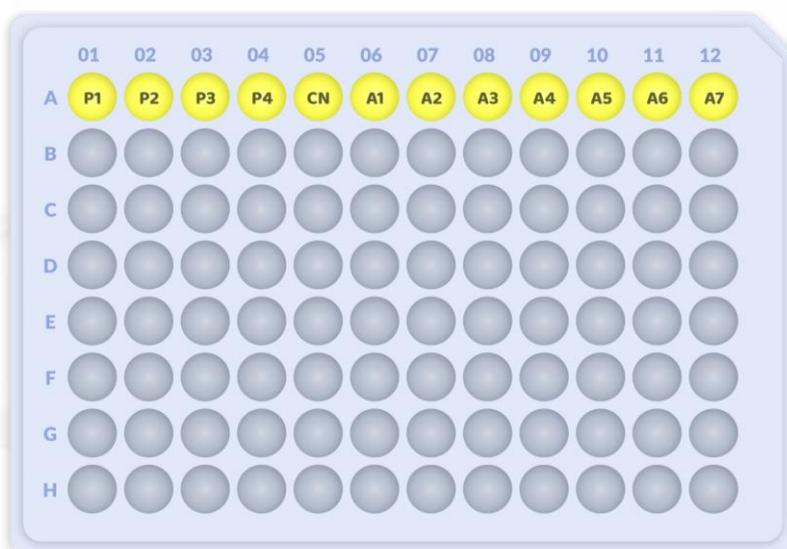
COMPONENTE	NÚMERO DE REAÇÕES			
	x 1	x 16	x 32	x 96
MM	13,75 µL	220	440 µL	1320 µL
PS	8,1 µL	129,6	259,2 µL	776,6 µL
VOLUME TOTAL	21,85 µL	349,6 µL	699,2 µL	2096,6 µL

- Descongelar o reagente MM HHV8, homogeneizar cuidadosamente em agitador *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo.
- Descongelar o reagente PS HHV8, homogeneizar cuidadosamente em agitador *vortex* 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:
- Homogeneizar a mistura de amplificação em agitador *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).

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

10.3 PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

- Dispensar 20 µL da mistura de amplificação em cada microtubo ou poço da microplaca, conforme gabarito de teste.
- Adicionar 5 µL de cada amostra extraída, CN extraído, dos padrões HHV8 $10^5/10^4/10^3/10^2$ conforme gabarito de teste.
- Fechar os microtubos ou selar a microplaca.
- Centrifugar brevemente os microtubos ou a microplaca a 2.000 rpm.
- Colocar os microtubos ou a microplaca no Termociclador de PCR em tempo real.
- Após configurar as operações descritas no subitem 10.4 - PROGRAMAÇÃO DA PCR e 10.5 - SELEÇÃO DE DETECTORES, iniciar a corrida no termociclador.



Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e reagentes na placa de PCR.

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 - A7:** Amostras
- **FUNDO AMARELO:** Mistura de Amplificação (MM HHV8 + PS HHV8)

IMPORTANTE: Utilizar somente microplacas recomendadas pelos fabricantes de termocicladores em tempo real.

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
<i>Hold</i>	50 °C	2 min.	1
<i>Hold</i>	95 °C	10 min.	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	15 seg.	45
	60 °C (*)	1 min.	

10.5 SELEÇÃO DE DETECTORES

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

ALVO	REPÓRTER	QUENCHER
HHV8	FAM	Não Fluorescente
CI	VIC	TAMRA

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 P1 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*, R^2 , e eficiência 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 tabela abaixo.

CRITÉRIO	FAIXA DE ACEITE
Eficiência da PCR	$90\% \leq \text{eficiência} \leq 100\%$
R^2	$0,99 \leq R^2 \leq 1$
Slope	$-3,6 \leq \text{Slope} \leq -3,2$
Valor de <i>Ct</i> do Padrão 1	$Ct \leq 25$

IMPORTANTE: Se a reação de amplificação o PADRÃO 1 produzir um $Ct > 25$ ou indeterminado, a sessão não poderá ser considerada válida e deverá ser repetida.

10.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Para cada amostra, o usuário deve realizar uma análise cuidadosa no gráfico de amplificação e para todos os alvos após os parâmetros serem configurados, para confirmar a presença ou ausência do traço exponencial.

HHV8 (FAM)	CI (VIC)	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***	Positivo

* Caso uma amostra apresente HHV8 com resultado indeterminado e controle interno com $Ct > 28$, pode significar problemas nas etapas de extração e/ou amplificação. Portanto, a amostra deve ser repetida.

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

*** Pode-se considerar válidas as amostras com $Ct > 28$ para o controle interno e alta concentração de DNA de HHV8. Neste caso, a natureza competitiva da reação de PCR pode esconder ou prejudicar a amplificação do controle interno.

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

10.9 QUANTIFICAÇÃO

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

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

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

Para cada amostra positiva detectada com o KIT XGEN MASTER HHV8, a correta quantificação da carga viral de HHV8 poderá ser aplicada, de acordo com a tabela abaixo.

DADO ANALÍTICO	DADO DIAGNÓSTICO
Dado Corrida HHV8 (cópias/ μ L)	Carga Viral HHV8 (cópias/mL)
Quantidade $\geq 1,29$	QUANTIFICAÇÃO*
Quantidade $< 1,29$	Carga Viral abaixo do LOQ

Cálculo para quantificação:

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

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 HHV8 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. 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%.

CRITÉRIO	RESULTADO
Limite de detecção	0,61 cópias/ μ L com probabilidade de $\geq 95\%$

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.

CRITÉRIO	RESULTADO
Especificidade	100%

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

12.4 PRECISÃO

Não aplicável.

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 HHV8 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.

Se um ou mais dos problemas descritos na tabela abaixo forem recorrentes, deve-se realizar uma investigação e para que se tomem ações a fim de evitá-los.

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 HHV8 (FAM)	Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.

CONTROLE POSITIVO 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.	
CONTROLE NEGATIVO COM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO	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.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Não aplicável.

18. GARANTIA

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

O produto KIT XGEN MASTER HHV8 é garantido contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

18.1 EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

18.2 EXTINÇÃO DA GARANTIA

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

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.

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

Telefone: (41) 3401-1850

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

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070083