

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MASTER MTB

KIT MASTER PARA DETECÇÃO DE DNA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O Kit XGEN MASTER MTB é destinado para a detecção qualitativa do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em amostras clínicas de escarro, lavado bronco alveolar, líquido cefalorraquidiano, fezes, com controle simultâneo de reação de extração/amplificação através do Controle Interno (CI).

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

Produto para uso em diagnóstico *in vitro*.

1. 1 INTRODUÇÃO

Mycobacterium tuberculosis (MTB) é o agente causador de uma grave doença respiratória, a tuberculose (TB). Atualmente esta doença cresce significativamente devido à ocorrência de cepas multirresistentes, ao crescente número de pacientes imunodeficientes e às taxas crescentes de migração da população. A infecção pela MTB ocorre principalmente nos pulmões e pode ser detectada em amostras de escarro, lavado bronco alveolar (LBA) e biópsias do pulmão. Infecções também podem aparecer em locais atípicos causando meningite basilar, tuberculose ganglionar, infecções urogenitais, infecções nas articulações e infecções nos olhos.

Os testes clássicos designados para o diagnóstico da tuberculose são baseados na coloração acidófila do MTB e microscopias, acompanhadas por uma cultura para confirmação. Estes métodos tradicionais além de requererem bastante tempo (a cultura, por exemplo, necessita de 2 a 4 semanas), possuem uma baixa sensibilidade. Portanto, as metodologias baseadas em PCR são rápidas e sensíveis, tornando-se gradativamente procedimentos padronizados para o diagnóstico da tuberculose. Estes métodos são capazes de registrar pequenas quantidades de patógeno em ampla diversidade de material clínico.

O resultado positivo do exame de detecção de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR deve ser considerado apenas como prova da doença. A detecção pelo método molecular pode ser negativa em casos de localização extrapulmonar, estado latente do portador ou devido à amostra clínica inadequada.

IMPORTANTE: A presença de bactérias mortas após a terapia anti-TB deve ser levada em conta na interpretação dos resultados de PCR. Além disso, detecções positivas (em qualquer tipo de amostra) em pacientes idosos, assintomáticos e/ou “infectados latentes”, podem ser representativas de MTB presentes em quantidades muito baixas que não reagem a qualquer tipo de tratamento.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O Kit XGEN MASTER MTB deve ser armazenado entre -15°C e -25°C.

O produto estocado corretamente é estável até a data de validade impressa no rótulo.

Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento da MasterMix, do Controle Interno e do Controle Positivo devem ser evitados, pois podem resultar em uma baixa qualidade de detecção. Sendo assim, recomenda-se fazer a alíquotas de 30 µL da MasterMix em tubos para PCR livres de DNase e RNase e mantê-las armazenadas entre -80°C a -20°C.

O Kit quando em uso, apresenta uma estabilidade de até 6 horas a temperatura ambiente e em condições de luz normal.

Minimizar a exposição à luz dos componentes do kit.

Os componentes armazenados sob outras condições que não as especificadas no rótulo podem não proporcionar um desempenho correto, afetando negativamente os resultados dos testes.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit XGEN MASTER MTB detecta especificamente cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. orygis*, *M. mungi* e *vaccination strain Bacillus Calmette-Guérin*) e também cepas de vacinas (por exemplo: BCG). A presença de *M. tuberculosis* é indicada pelo aumento da fluorescência do fluoróforo FAM. O Controle Interno, detectado no canal de fluorescência do fluoróforo HEX/JOE, é incluído no processo de extração de DNA, controlando uma possível inibição da reação de PCR. O kit de detecção aproveita a tecnologia "hot start", minimizando reações não específicas e garantindo a máxima sensibilidade. A MasterMix é pronta para o uso e contém Uracilo-DNA-Glicosilase (UDG), eliminando possíveis contaminações da reação de PCR por produtos de amplificação

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

Usualmente são utilizadas amostras do trato respiratório para diagnosticar a presença de *M. tuberculosis*. Geralmente a infecção não é disseminada, portanto a detecção em amostras de sangue periférico não é importante para fins de diagnósticos.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

- As amostras clínicas devem ser coletadas e rotuladas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra) e processadas o mais rapidamente possível para garantir a qualidade do teste.
- É recomendada a utilização de amostras frescas.

4.3 MANUSEIO

Recomenda-se o uso de amostras frescas para o teste. Para longos períodos de armazenamento, recomenda-se que todas as amostras fiquem a -20°C ou, idealmente, a -80°C até a extração.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

A amostra deverá ser totalmente descongelada e levada à temperatura ambiente antes do teste. Homogeneizar bem a amostra antes da preparação. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados para impedir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos. Realizar a preparação da amostra de acordo com as recomendações descritas nas instruções de uso do kit de extração utilizado. Para extração de DNA a partir de amostras clínicas, pode ser utilizado qualquer kit de extração de DNA comercialmente disponível, tanto manuais quanto automatizados, seguindo as instruções do fabricante.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

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

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE	
		25 TESTES	100 TESTES
MMIX	Mistura de enzima, sondas, primers, tampão e dNTPs	1 x 750 µL	4 x 750 µL
CP	Controle Positivo 10 ² cópias/µL de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 x 200 µL	2 x 200 µL
CI	Controle Interno	1 x 1.000 µL	2 x 1.000 µL
CN	Controle Negativo	1 x 500uL	1 x 500uL
Guia rápido	Guia Rápido	1 un	1 un

5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

Os componentes do Kit XGEN MASTER MTB são prontos para o uso.

A extração do DNA deve ser realizada por kits específicos disponíveis no mercado de acordo com os protocolos específicos para extração particular de MTB.

Deve-se adicionar o Controle Interno diretamente na amostra no início do processo de extração. Ao final do processo, deverá conter 0,1 µL do Controle Interno em 1 µL de Volume de Eluição.

Volume de Eluição	25 µL	50 µL	100 µL	200 µL
Volume de Controle Interno	2,5 µL	5 µL	10 µL	20 µL

IMPORTANTE: O valor de Ct do Controle Interno é usado para avaliar se o procedimento de extração foi realizado corretamente.

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;
- ✓ Microplacas de PCR, recomendados pelo fabricante do equipamento de PCR em tempo real;
- ✓ Filme selador.

7. ESTABILIDADE EM USO

Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento da MasterMix, do Controle Interno e do Controle Positivo devem ser evitados, pois podem resultar em uma baixa qualidade de detecção. Sendo assim, recomenda-se fazer a alíquotas de 30 µL da MasterMix em tubos para PCR livres de DNase e RNase e mantê-las armazenadas entre -15°C a -25°C.

É indicado minimizar a exposição dos componentes do kit à luz. Os componentes armazenados sob outras condições que não as especificadas no rótulo podem não proporcionar um desempenho correto, afetando negativamente os resultados dos testes. Caso sejam utilizados de forma intervalada, sugere-se que sejam realizadas alíquotas em tubos livres de DNase e RNase, de acordo com a necessidade.

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.
- 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 ponteiros descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiros após a manipulação de cada amostra.

- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, iniciando com o preparo dos reagentes (pré-PCR), passando para a extração de amostras (pré-PCR) e finalizando nas áreas de amplificação e de análises de dados (pós-PCR). Não compartilhar reagentes e equipamentos entre as diferentes áreas.

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

- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.

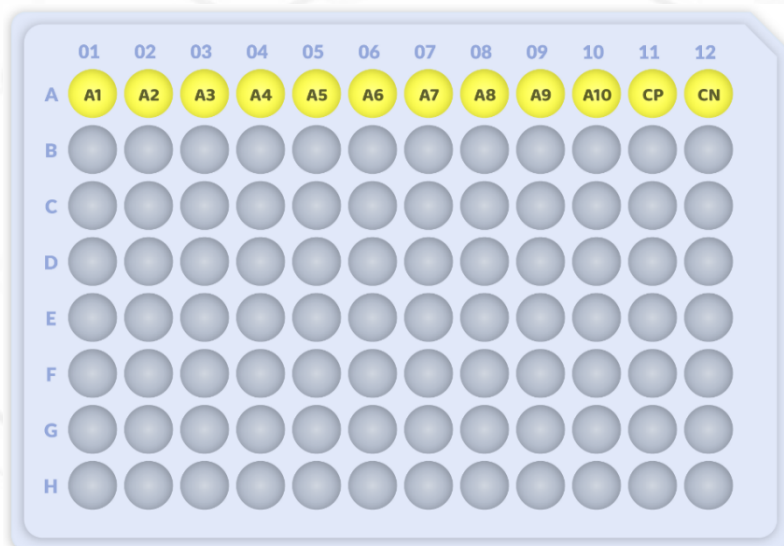
10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

10.1 CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO

O kit XGEN MASTER MTB contém controles positivo e negativo que devem ser incluídos em cada execução para interpretar corretamente os resultados. Além disso, o controle interno (CI) adicionado em cada amostra testada confirma o desempenho correto da técnica.

10.2 PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

- Adicionar 30 µL da MMIX em cada poço de acordo com o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles.
- Adicionar 10 µL de DNA extraído de cada amostra, CP e CN em seus respectivos poços e fechar a placa/microtubos.
- Centrifugar brevemente a placa/microtubos.
- Colocar a placa/microtubos no termociclador de PCR em Tempo Real.
- Após configurar a programação como descrito no subitem 10.3 PROGRAMAÇÃO DA PCR E 10.4 SELEÇÃO DOS DETECTORES, iniciar a corrida no termociclador.



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

LEGENDA:

- **A1 - A10** = Amostras
- **CP** = Controle Positivo
- **CN** = Controle Negativo
- **FUNDO AMARELO:** Mistura de Amplificação (MMIX)

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	37°C	2 min	1
Hold	95°C	10 min	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95°C	5 s	45
	60°C (*)	40 s	
	72°C	20 s	

10.4 SELEÇÃO DOS DETECTORES

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

ALVO	REPÓRTER
<i>M.tuberculosis</i>	FAM
Controle Interno	JOE/VIC/HEX

10.5 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.

10.6 VALIDAÇÃO DA CORRIDA

Uma verificação nos controles é realizada sempre que o kit é utilizado a fim de verificar se os valores de Ct são os esperados e informados na tabela abaixo.

CRITÉRIO	ALVO	CONTROLE INTERNO	RESULTADO DO ENSAIO
Controle Negativo	>40 ou nenhum sinal	≤40	Válido
	≤40	≤40	Inválido
Controle Positivo	≤40*	≤40**	Válido***

* As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

** Se o controle interno foi adicionado às amostras apenas no momento da extração e não foi adicionado ao controle positivo no momento da amplificação, não haverá amplificação do CI no controle positivo.

*** Controle Positivo e qualquer amostra positiva irá mostrar curva exponencial de fluorescência. Qualquer amostra exibindo um traço exponencial é considerada positiva.

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

Se todos os controles estiverem dentro dos intervalos especificados, validando a corrida, verificar as amostras clínicas.

10.7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Qualquer amostra exibindo um traço exponencial é considerada positiva.

ALVOS	CI	RESULTADO DO ENSAIO
Ct < 40	Determinado	Positivo Válido
	Indeterminado	Positivo Válido*
Ct ≥ 40 ou Indeterminado/Não detectado	< 40	Negativo Válido
	Ct ≥ 40 ou indeterminado	Inválido**

* A concentração de DNA dos alvos (sinal FAM, ROX e/ou Cy5 positivos) pode levar a um sinal REDUZIDO ou AUSENTE 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.

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 do termociclador, é essencial para resultados precisos e reproduzíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os resultados obtidos com o kit MASTER para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas 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. O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de cópias do alvo que pode ser detectada pelo sistema de ensaio com uma probabilidade de 95%. A sensibilidade do kit XGEN MASTER MTB para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

ALVO	SENSIBILIDADE
Sensibilidade (LOD) <i>M.tuberculosis</i>	0,09 cópias/uL

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.

Gene Alvo	Inserção Específica de Múltiplas Cópias da Sequência IS6110
------------------	---

Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Especificidade (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. orygis*, *M. mungi* and vaccination strain *Bacillus Calmette-Guérin*) e também cepas de vacina BCG.

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

12.4 PRECISÃO

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 resultados foram estabelecidos conforme tabela abaixo.

CRITÉRIO	RESULTADO
Repetibilidade	CV% < 5%
Reprodutibilidade	CV % < 5%

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 MASTER para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas deve ser interpretado 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 POSITIVO SEM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO	Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.	Verificar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
	Aplicação incorreta do CP.	Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o

		procedimento, se necessário.
	Homogeneização inadequada ou descongelamento em temperatura diferente da ambiente.	Conferir a calibração das micropipetas.
	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.	Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.
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.
	Possibilidade de inibição, erro no procedimento ou mau funcionamento do equipamento.	Verificar se nenhum potencial inibidor de PCR contaminou os tubos.
		Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.
		Verificar se as análises foram realizadas com a configuração correta do equipamento.
Problemas durante a extração.	Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit e se o procedimento foi executado corretamente.	
CONTROLE NEGATIVO COM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO	Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.	Repetir a PCR com novo reagentes em replicatas.
		É recomendado realizar a pipetagem do Controle Positivo 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.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Não aplicável.

18. GARANTIA

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

O produto MASTER para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas 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 equipamentos e amostras não previstas na instrução de uso.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL E IMPORTADOR

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 | Website: www.mobiuslife.com.br
CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070029