

## INSTRUÇÕES DE USO

### XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII*

#### KIT XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECII*

### 1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* foi desenvolvido para identificação e quantificação de *Pneumocystis jirovecii* em amostras respiratórias de pacientes com sintomas de infecções respiratórias. Este teste destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* em combinação com fatores de risco clínicos e epidemiológicos. O DNA extraído das amostras, será multiplicado através da amplificação em tempo real e detectado usando sonda fluorescente específica para *Pneumocystis jirovecii*.

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

#### PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

#### 1. 1 INTRODUÇÃO

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PCP), é uma doença pulmonar aguda e potencialmente fatal causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii*. A PCP é uma doença importante em humanos imunocomprometidos, particularmente pacientes com HIV, mas também pacientes com um sistema imunológico severamente suprimido por outras razões. Em humanos com um sistema imunológico normal, apresenta-se como uma infecção silenciosa extremamente comum. Em países em desenvolvimento, a prevalência de PCP já foi considerada muito menor, mas estudos mostraram que essa baixa incidência relatada provavelmente é uma falha no diagnóstico preciso.

Os sintomas da PCP são inespecíficos, em pacientes com HIV tende a se apresentar tardiamente após várias semanas de sintomas, comparada com pacientes com outro tipo de imunossupressão. Os sintomas da PCP incluem: dispneia de esforço progressivo, febre, tosse não produtiva, desconforto torácico, perda de peso, calafrios e hemoptise (rara).

A PCP é difícil de diagnosticar devido aos sinais e sintomas inespecíficos associados. Como *P. jirovecii* não pode ser reproduzido em cultura, a visualização microscópica de cistos ou formas tróficas em espécimes pulmonares com coloração citoquímica ou imunofluorescente com anticorpos monoclonais e/ou amplificação de DNA são os procedimentos padrão para detectar esse microrganismo.

### 2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

O kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* deve ser armazenado na embalagem original em temperatura controlada entre 2°C e 40°C e é estável até a data de vencimento indicada no rótulo. Uma vez que o Controle Positivo tenha sido reconstituído, deve ser armazenado a -20°C. Após reconstituída, a Mix deve ser armazenada a 2 a 8°C por até 4 horas, para longos períodos, armazenar a -20°C.

### 3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* foi desenvolvido para o diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* em amostras respiratórias. Após o isolamento do DNA, a identificação de *Pneumocystis jirovecii* é realizada pela amplificação de uma região conservada do gene de rRNA de subunidade maior (mt LSU) usando primers específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* baseado na atividade exonuclease 5' da DNA polimerase. Durante a amplificação do DNA, essa enzima cliva a sonda ligada à sequência de DNA complementar, separando o *quencher* do *reporter*. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à quantidade de sequência alvo. Esta fluorescência pode ser medida em plataformas de PCR em tempo real. Além disso, a quantificação do DNA específico de *Pneumocystis jirovecii* pode ser obtida através de uma curva padrão usando o padrão quantitativo de *Pneumocystis jirovecii* fornecido com o kit.

O kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* contém em cada tubo MIX todos os componentes necessários para 24 reações de PCR em tempo real (primers/sondas específicos, dNTPS, tampão, polimerase) em um formato liofilizado. O ensaio pode usar um Controle Interno (CI) que pode ser adicionado em cada amostra durante o processo de extração. Este controle pode ser utilizado para monitorar o processo de extração e/ou descartar a inibição da atividade da polimerase. Os alvos de DNA de *Pneumocystis jirovecii* são amplificados e detectados no canal FAM e o Controle Interno (CI) no canal HEX, VIC ou JOE.

## 4. AMOSTRA

### 4.1 TIPOS

O ensaio é para uso com ácido nucleico extraído de lavado bronco alveolar de pacientes com sinais e sintomas de infecções respiratórias.

### 4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

As amostras devem ser claramente identificadas com códigos ou nomes, a fim de evitar resultados com erros de interpretação.

As amostras clínicas devem ser coletadas e armazenadas 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 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.

Adicionar 5 µL do Controle Interno ao tampão de lise durante a extração em cada amostra. Fechar o tubo e homogeneizar em *vortex* por 10 segundos. Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra, ao menos que esteja diluída no tampão de lise.

Se o Controle Interno for usado apenas como controle de inibição da PCR, 1µl deste componente deve ser adicionado à mistura de reação reconstituída.

**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 24 testes, 48 e 96 testes.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE		
		24 TESTES XG-PJ-MB-24	48 TESTES XG-PJ-MB-48	96 TESTES XG-PJ-MB-96
MMIX	Mistura de enzimas, sondas, tampão, dNTPs, liofilizada	1 tubo	2 tubos	4 tubos
TR	Tampão de reidratação	1 tubo x 1.8 mL	1 tubo x 1.8 mL	1 tubo x 1.8 mL
CP	Controle Positivo contendo cDNA liofilizado sintético	1 tubo	1 tubo	1 tubo
PADRÃO QUANTITATIVO	Padrão quantitativo liofilizado	1 tubo	1 tubo	1 tubo
CI	Controle interno	1 tubo	1 tubo	1 tubo
CN	Controle Negativo	1 tubo X 1mL	1 tubo X 1mL	1 tubo X 1mL
ÁGUA LIVRE DE RNase/DNase	Água livre de RNase/DNase	1 tubo X 1mL	1 tubo X 1mL	1 tubo X 1mL
GR	Guia Rápido	1 unidade	1 unidade	1 unidade

### 5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

#### 5.1.1 CONTROLE INTERNO

Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo. Recomenda-se abrir e manipular o Controle Interno (CI) na área do laboratório de pré-PCR longe de o controle positivo liofilizado. O CI deve ser reconstituído adicionando 500µL de Água Livre de RNase/DNase fornecida. Homogeneizar gentilmente com a pipeta. Centrifugar brevemente (pulso) para remover bolhas geradas durante a homogeneização.

Após reconstituído, o CI deve ser armazenado a -20°C. É recomendado separar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

Se o CI for usado para monitorar o isolamento de ácido nucleico e como controle de inibição de PCR, adicione 5µL de CI à amostra e/ou à mistura de tampão de lise (amostra clínica, bem como controle positivo e/ou controle negativo). Feche cada tubo e homogeneíze em *vortex* por 10 segundos.

Se o CI for usado apenas como controle de inibição de PCR, 1µL do CI deve ser adicionado a MMIX.

**NOTA:** O tubo de Água livre de RNase/DNase deve ser utilizado primeiro para reconstituir o Controle Interno liofilizado na área do laboratório de pré-PCR e, posteriormente, pode ser utilizado para reconstituir o Controle Positivo *Pneumocystis jirovecii* liofilizado em uma área distante dos demais componentes.

#### 5.1.2 CONTROLE POSITIVO E PADRÃO QUANTITATIVO

O Controle Positivo (CP) de *Pneumocystis jirovecii* e o Padrão Quantitativo contêm modelo de várias cópias do PCP, a recomendação é abri-los e manipulá-los em uma área separada do laboratório, longe do outros componentes. Reconstitua o CP e/ou Padrão Quantitativo adicionando 100 µL de Água livre de RNase/DNase fornecido e agite bem.

Uma vez que o controle positivo tenha sido reconstituído, armazene-o a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Recomendamos separá-lo em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

### 5.1.3 MMIX

Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo. Reconstituir a mix na área pré-PCR do laboratório. Abrir o tubo da mix liofilizada com cuidado para evitar que o pellet se desfaça e adicionar 390  $\mu\text{L}$  do Tampão de Reidratação fornecido no kit. Homogeneizar gentilmente com a pipeta. Centrifugar brevemente (pulso) para remover bolhas geradas durante a homogeneização.

**AVISO:** Após reconstituída, a MMIX pode ser mantida em  $2^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  por até 4 horas, para longos períodos, armazenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . É recomendado separar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento/descongelamento.

### 5.1.4 PREPARAÇÃO DE CURVA PADRÃO - ENSAIO QUANTITATIVO

O Padrão Quantitativo de *Pneumocystis jirovecii* deve ser aberto e manipulado em área separada do laboratório, longe dos outros componentes. Reconstitua o Padrão Quantitativo de *Pneumocystis jirovecii* adicionando 100  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase/DNase fornecida no kit.

Para realizar um ensaio quantitativo, uma curva padrão deve ser preparada por diluição em série do Padrão Quantitativo (que contém aproximadamente  $2 \times 10^7$  cópias/ $\mu\text{L}^*$ ). Para o preparo da curva padrão, seguir conforme orientações descritas abaixo:

- Pipete 90  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase/DNase em 6 microtubos de 1,5 mL ou 2 mL.
- Adicione 10  $\mu\text{L}$  do Padrão Quantitativo ao primeiro tubo para obter um padrão com cerca de  $2 \times 10^6$  cópias/ $\mu\text{L}$ . Misture no *vortex* e centrifugue brevemente.
- Adicione 10  $\mu\text{L}$  de padrão com  $\sim 2 \times 10^6$  cópias/ $\mu\text{L}$  ao segundo tubo para obter um padrão com aproximadamente  $2 \times 10^5$  cópias/ $\mu\text{L}$ . Homogeneíze em *vortex* e centrifugue brevemente.
- Repita o passo anterior sequencialmente para completar a série de diluições para padrões com cerca de  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  e  $2 \times 10^1$  cópias/ $\mu\text{L}$ .

**NOTA:** A diluição não é necessária para a realização do ensaio qualitativo de PCR em tempo real.

\*Para mais detalhes, consulte o “Certificado de Análise”, onde o número do lote e o número de cópias de DNA do padrão quantitativo do kit XGEN MASTER *Pneumocystis jirovecii* são detalhados.

## 6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Micropipetas (0,5-20  $\mu\text{L}$ ; 20-200  $\mu\text{L}$ );

**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  $\pm 5\%$ .

- ✓ Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL e tiras de poços de PCR ou placa de 96 poços (se disponível);
- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Racks para tubos;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livre de nuclease;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;

- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor;
- ✓ Kit de extração de DNA.

## 7. ESTABILIDADE EM USO

Após a utilização, os componentes devem ser armazenados em temperatura controlada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento repetido, por mais de seis vezes, deve ser evitado, já que pode afetar a performance do ensaio.

Em uso, os componentes são estáveis por até 4 horas em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) ou 2 a  $8^{\circ}\text{C}$  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

- Atentar-se ao uso correto dos componentes, evitando assim confundir o frasco de Controle Positivo de *Pneumocystis jirovecii* com o frasco de Padrão Quantitativo.
- 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 e verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio correto.
- Evitar vibração na superfície da bancada onde o teste é realizado.
- 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.
- 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 com as 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 evitar a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.

- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.
- Não use reagentes se os sachês plásticos estiverem abertos ou quebrados na chegada.
- Não use reagentes se o dessecante não estiver presente ou quebrado dentro dos sachês plásticos.
- Não remova o dessecante dos sachês plásticos depois de abertos.
- Feche os sachês plásticos de reagentes imediatamente com o fecho após cada uso (se disponível). Remova qualquer excesso de ar dos sachês antes de selá-los.
- Não use reagentes se a folha estiver quebrada ou danificada.
- Não misture reagentes de diferentes envelopes, kits, lotes e/ou de outro fornecedor.
- Proteger os reagentes contra umidade. A exposição prolongada à umidade pode afetar o desempenho do produto.

## 10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

### 10.1 PROTOCOLO DE PCR

- Adicionar 15 µL da MMIX *Pneumocystis jirovecii* em cada poço de acordo com o número de reações necessárias.
- Adicionar 5 µL de DNA extraído de cada amostra, Controle Positivo reconstituído (tubo vermelho) e Controle Negativo (tubo violeta) em poços diferentes e fechar a placa/microtubos.

**NOTA:** Caso o CI não tenha sido adicionado na extração, adicionar 1 µL de controle interno no poço de cada amostra. É recomendado a adição de Controle Interno no poço do Controle Positivo para validação da reação de amplificação de todos os alvos.

- Centrifugar brevemente a placa/microtubos.
- Inserir a placa/microtubos no equipamento.
- Após configurar a programação como descrito no subitem 12.2 PROGRAMAÇÃO DE PCR e 12.3 SELEÇÃO DE DETECTORES, iniciar a corrida no termociclador.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6	A1	A2	A3	A4	CP	CN
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

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

#### LEGENDA:

- **A1 - A6:** Padrão quantitativo
- **A7 - A10:** Amostras
- **CP:** Controle Positivo
- **CN:** Controle Negativo
- **FUNDO AMARELO:** Mistura de Amplificação (MMIX)

**NOTA:** A diluição não é necessária para a realização do ensaio qualitativo de PCR em tempo real.

#### 10.2 PROGRAMAÇÃO DA PCR

Programe o termociclador seguindo as condições descritas abaixo:

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Hold</i>	95 °C	2 min	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95 °C	10 s	45
	60 °C (*)	50 s	

#### 10.3 SELEÇÃO DE DETECTORES

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

ALVO	REPORTER
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	FAM
Controle Interno (CI)	VIC

Alterar as configurações para selecionar o canal ROX como detector (por padrão o ROX é configurado como referência passiva).

#### 10.4 CONFIGURAÇÕES PRÉ-ANÁLISE

Para a validação da corrida é necessário realizar os ajustes dos parâmetros de análise. Recomenda-se definir os valores de limite (threshold) para cada canal (alvo) independentemente. O ajuste manual do threshold é definido no início da fase exponencial (ponto de inflexão da curva em análise linear) de forma a excluir o ruído (background). Em seguida, deve ser realizado o ajuste do baseline, que deve levar em conta ciclos suficientes para eliminar os ruídos encontrados nos primeiros ciclos de amplificação. A determinação do valor deve anteceder a primeira amplificação exponencial.

**NOTA:** O valor do threshold pode apresentar variação de acordo com o equipamento devido as diferenças de intensidade de sinal.

#### 10.5 VALIDAÇÃO DA CORRIDA

O uso de Controle Positivo e Negativos em cada execução valida a reação, verificando a ausência de sinal no poço de Controle Negativo e a presença de sinal para *Pneumocystis jirovecii* no poço de Controle Positivo. Verifique o sinal do Controle Interno para analisar o funcionamento correto da Mix de amplificação.

PNEUMOCYSTIS JIROVECI (FAM)	CONTROLE INTERNO (VIC)	CN	CP	INTERPRETAÇÃO
--------------------------------	---------------------------	----	----	---------------

+	+/-	-	+	Positivo para <i>Pneumocystis jirovecii</i>
-	+	-	+	Negativo para <i>Pneumocystis jirovecii</i>
-	-	-	+	Falha no experimento
+	+	+	-	Falha no experimento

+ Ocorreu curva de amplificação

- Não ocorreu curva de amplificação

**NOTAS:**

- Uma amostra é considerada positiva se o valor de *Ct* obtido for menor que 40 e o Controle Interno (CI) apresentar ou não sinal de amplificação. Às vezes, a detecção do CI pode não ser registrada porque um alto número de cópias do alvo pode causar amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.
- Uma amostra é considerada negativa se não apresentar sinal de amplificação no sistema de detecção e o CI for positivo. Uma inibição da reação de PCR pode ser descartada pela amplificação do CI.
- O resultado é considerado inválido se houver sinal de amplificação no Controle Negativo ou ausência de sinal no poço positivo. Recomendamos repetir o ensaio.
- Em caso de ausência de sinal em ambos, CI e alvo nos poços amostrais, recomendamos repetir o ensaio diluindo a amostra 1:10 ou repetir a extração para verificar possíveis problemas de purificação e/ou inibição dos ácidos nucleicos.
- Podem ser observadas diferenças nos valores de *Ct* no Controle Interno entre as amostras controle (Controle Negativo e Controle Positivo) e as amostras clínicas, devido ao processo de extração.
- Para amostras no limite de detecção (LoD) ou negativas com valor de *Ct* para o controle interno  $\geq 35$ , recomenda-se diluir o extraído (1:10 e 1:100) para evitar possíveis interferências e inibidores na reação de amplificação. Recomenda-se revisar as instruções de uso do processo de extração usado pelo usuário.

**10.6 ENSAIO QUANTITATIVO**

A concentração da sua amostra positiva é apresentada em cópias/ $\mu$ l e refere-se à concentração no DNA eluído e não à amostra clínica original. Para determinar a concentração alvo da amostra original, leve em consideração o volume inicial de amostra na extração e o volume de eluição da amostra. A concentração da amostra original é calculada aplicando a fórmula a seguir.

$$\text{Fator de Conversão (FC)} = \frac{\text{Volume de eluição de amostra } (\mu\text{l})}{\text{Volume inicial de amostra na extração } (\mu\text{l})}$$

Para cada amostra positiva detectada com o produto, a correta quantificação da amostra original pode ser obtida multiplicando o dado da corrida com o fator de conversão.

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

Os resultados obtidos com o kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* 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 *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* está na tabela abaixo:

CRITÉRIO	RESULTADO
SENSIBILIDADE (LOD) <i>Pneumocystis jirovecii</i>	10 cópias/reação

### 12.3 ESPECIFICIDADE

A especificidade do ensaio *Pneumocystis jirovecii* foi confirmada testando um painel composto por diferentes microorganismos representando os patógenos respiratórios mais comuns. Nenhuma reatividade cruzada foi detectada entre qualquer um dos seguintes microorganismos testados.

TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA					
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. Aureus</i>	-	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Influenza B / Brisbane/ 60/ 2008-like virus</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Respiratory syncytial virus (RSV)</i>	-	<i>Influenza B/Florida/04/06 virus</i>	-
<i>Fluoribacter bozemanæ</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Influenza B/Phuket/3073/2013 virus</i>	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Human Adenovirus</i>	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Influenza A/ California/ 7/ 2009(H1N1) virus</i>	-	<i>Human coronavirus 229E</i>	-
<i>Legionella longbeachæ</i>	-	<i>Influenza A/ Perth/ 16/ 2009(H3N2) virus</i>	-	<i>Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus</i>	-	<i>Human metapneumovirus A and B</i>	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Influenza A/ Switzerland/ 9715293/2013 virus</i>	-	<i>Human rhinovirus</i>	-

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus</i>	-
---------------------------------	---	---	---

#### 12.4 EXATIDÃO

Não aplicável.

#### 12.5 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

Profissional com conhecimentos em biologia molecular.

#### 16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Os resultados obtidos com o kit XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* 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 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 do ambiente.	Conferir a calibração das micropipetas.
	Condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit	Verificar as condições de armazenamento e a data de

	não estão de acordo com a instrução de uso ou a data de validade do kit expirou.	validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.
<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.
	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.
<b>CONTROLE NEGATIVO COM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO</b>	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 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 XGEN MASTER *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* 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

### FABRICANTE:

CERTEST BIOTEC

ENDEREÇO: CALLE J, N° 1, 50840, SAN MATEO DE GÁLLEGO, ZARAGOZA, ESPANHA

### IMPORTADO POR:

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

80502070109