

## INSTRUÇÕES DE USO

### XGEN MULTI HPV LYO CHIP

FAMÍLIA DE KITS MULTIPLEX PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) ATRAVÉS DE PCR E HIBRIDIZAÇÃO REVERSA

#### 1. FINALIDADE E MODO DE USO

Os XGEN MULTI HPV LYO CHIP são kits de diagnóstico in vitro para a detecção e genotipagem de 35 diferentes tipos do Papiloma Vírus Humano de alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82) e baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81 e 84) em amostras de swabs citológico (cervical e anal) e retal, tecidos em parafina e citologia em meio líquido (endocervical e anal), sem a necessidade da extração de DNA.

Os kits foram otimizados para uso nos aparelhos HS12: *HybriSpot 12* (VIT-HS12), HS24: *HybriSpot 24* (VIT-HS24) e HS12A: *HybriSpot 12Auto* (VIT-HS12A) da Vitro Group®.

#### PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

##### 1. 1 INTRODUÇÃO

O Papiloma Vírus Humano, também conhecido como HPV, é um vírus da família *Papillomaviridae* que se instala na pele ou mucosas. Atualmente, o HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais frequente, ou seja, é a principal infecção viral transmitida por via sexual. Existem mais de 100 tipos virais de HPVs descritos até o momento, classificados em alto e baixo risco e aproximadamente 45 infectam o epitélio do trato ano genital masculino e feminino. Os de alto risco oncogênico, principalmente os tipos 16 e 18, estão associados ao câncer ano genital e do trato aero digestivo. Os HPVs de baixo risco, principalmente os tipos 6 e 11, causam as lesões benignas (verrugas e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) e papilomatose laríngea.

Estima-se que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos terão contato com o HPV em algum momento de suas vidas e que 80% das mulheres terão esse contato até os 50 anos de idade.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 630 milhões de homens e mulheres estão infectados pelo HPV. No Brasil, estima-se que haja 9 a 10 milhões de infectados por esses vírus e que, a cada ano, 700 mil casos novos surjam, podendo ser considerado, portanto, uma epidemia. Cerca de 105 milhões de pessoas no mundo são positivas para o HPV tipo 16 ou 18.

#### 2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

Todos os componentes do kit devem ser armazenados na embalagem original em temperatura de armazenamento de 2°C a 8°C.

Os reagentes de PCR devem ser armazenados em áreas livre de DNA ou contaminação por produtos de PCR. Uma vez que a embalagem dos tubos em *strips* com a mistura de PCR liofilizada tenha sido aberta, armazenar os tubos restantes por no máximo uma semana.

Os reagentes de hibridização são estáveis até a data de validade indicada. O reagente de hibridização (Reagente A) deve ser preaquecido a 41°C antes do seu uso para a o formato manual. Os demais reagentes de hibridização devem ser utilizados a temperatura ambiente (20°C - 25°C).

#### 3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O princípio do ensaio é baseado na amplificação da região L1 do papiloma vírus humano por PCR Multiplex, seguido de hibridização reversa (*Dot Blot*) com sondas específicas de DNA

imobilizadas em um chip composto por membrana de nylon (Tecnologia *Flow-Chip*). O processo de hibridização permite a ligação dos produtos de PCR biotinilados às sondas complementares presentes no chip e o sinal de hibridização é desenvolvido por uma reação colorimétrica imunoenzimática (Estreptavidina-Fosfatase Alcalina e Cromógeno NBT-BCIP).

A reação substrato-cromógeno gera um precipitado de coloração roxo escuro na posição em que o fragmento amplificado de PCR hibridiza com a sonda específica e este sinal é automaticamente capturado e analisado pelo software do equipamento.

## 4. AMOSTRA

### 4.1 TIPOS

O kit XGEN MULTI HPV LYO CHIP é otimizado para o uso com amostras clínicas de *swab* citológico, tecidos em parafina e citologia em meio líquido de origem humana, sem a necessidade de extração prévia de DNA. Entretanto, pode ser utilizado DNA purificado. Para informações a respeito da compatibilidade consulte o tópico 6 “ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS”.

**IMPORTANTE:** A Mobius não se responsabiliza por resultados/diagnósticos que sejam obtidos através da utilização de equipamentos e amostras não previstas na instrução de uso.

### 4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

Utilizar material genético purificado ou não das diferentes amostras clínicas selecionadas.

### 4.3 MANUSEIO

Seguir instruções específicas de preparo para cada tipo de amostra descritas no tópico 4.4

### 4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

#### 4.4.1 TECIDOS EM PARAFINA

Para o teste com amostras embebidas em parafina, recomenda-se o seguinte protocolo utilizando o kit Master para processamento de tecidos em parafina:

1. Utilizar 1-3 secções do tecido embebido em parafina (dependendo do tamanho do bloco de parafina) de 10 µm de espessura.
2. Colocar em um microtubo de 0,5 mL utilizando uma pinça de dissecação ou agulha;

**NOTA:** Remover o máximo de parafina possível dos cortes de tecido.

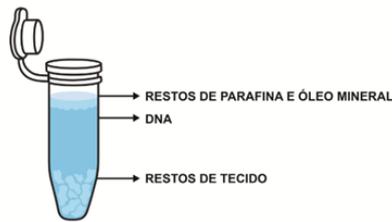
3. Adicionar 400 µL do Óleo Mineral;
4. Aquecer a 95°C por 2 minutos;
5. Centrifugar a 2.000 rpm por 1 minuto e retirar o máximo possível de óleo Mineral;
6. Adicionar 60 µL de tampão de extração e 1,5 µL de DNA Release (Proteinase K).

**NOTA:** Se o corte de tecido não estiver completamente submerso na solução, aumentar proporcionalmente esses volumes até o tecido ficar submerso.

7. Aquecer a amostra a 60°C por 30 minutos e depois a 98°C por 10 minutos (este passo pode ser feito utilizando termociclador ou termo bloco);

**NOTA:** Se após o aquecimento o tecido não estiver digerido completamente é recomendado adicionar um volume adicional de Tampão de Extração e DNA Release e repetir a incubação a 60°C por 30 minutos e depois a 98° por 10 minutos.

8. Centrifugar a 2.000 rpm por 1 minuto;
9. A fase 1 possui o restante do Óleo Mineral e da parafina. Os detritos celulares serão sedimentados no fundo do tubo e o DNA estará no líquido sob a camada de óleo parafina (fase 2), conforme figura abaixo.



10. Adicionar 27  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase diretamente a mix liofilizada e 3  $\mu\text{L}$  do DNA contido na fase 2, evitando retirar restos de tecido do fundo do tubo.

**NOTA:** A PCR direta sem o processo de purificação não foi testada com outros tipos de amostras clínicas (amostras coradas ou extensões citológicas). Para esses casos, é recomendado fazer a purificação do DNA.

Para maiores informações consultar a Instrução de Uso do kit Master para Processamento de Tecidos em Parafina.

#### 4.4.2 SWAB CITOLÓGICO (CERVICAL E ANAL) E RETAL

- Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase em um microtubo 1,5 - 2,0 mL. Mergulhar a ponta do *swab* e agitar moderadamente em *vortex*;
- Utilizar 30  $\mu\text{L}$  dessa suspensão de células para a reação de PCR.

**NOTA:** Caso a amostra apresente sangue ou demais sujidades, uma lavagem extra pode ser realizada. Para isso, execute o protocolo descrito abaixo entre os passos 1 e 2:

- Remover o *swab*, centrifugar o microtubo a 2000 rpm por 1 minuto e remover cuidadosamente o sobrenadante;
- Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase e agitar moderadamente em *vortex*;
- Seguir com o passo 2 do protocolo descrito acima.

#### 4.4.3 CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

- Transferir 400  $\mu\text{L}$  da amostra previamente homogeneizada em *vortex* para um microtubo de 1,5 - 2,0 mL.

**NOTA:** Caso a amostra apresente muco, recomenda-se evitar a sucção deste na retirada de material do tubo pois ele aumenta o risco da não obtenção de células suficientes para a análise.

- Centrifugar por 1 minuto a 2000 rpm e remover o sobrenadante cuidadosamente;
- Ressuspender o *pellet* em 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase;
- Centrifugar por 1 minuto a 2000 rpm e remover o sobrenadante cuidadosamente;
- Ressuspender o *pellet* em 300  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase;
- Homogeneizar moderadamente em *vortex* e utilizar 30  $\mu\text{L}$  dessa suspensão de células para a reação de PCR.

**NOTA:** É necessário que a amostra esteja homogênea para a utilização na PCR, pois a coleta apenas do sobrenadante pode gerar resultados negativos por insuficiência de material e a coleta do *pellet* concentrado pode causar inibição de PCR por excesso.

**IMPORTANTE:** Os kits foram validados para PCR direta com os seguintes kits de coleta:

- *Thinprep (Hologic);*
- *Surepath (Becton Dickinson);*
- *Novaprep (Novacyt);*
- *Cellprep (Biodyne);*
- *CY-PREP™ Pap Test (FJORD Diagnostics).*

#### 4.4.4 CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COM MEIO DE TRANSPORTE *DIGENE (STM)*

- Transferir 500 - 1.000 µL da suspensão de células para um microtubo 1,5 - 2,0 mL;
- Centrifugar por 1 minuto a 2000 rpm e remover o sobrenadante cuidadosamente;
- Ressuspender o *pellet* em 400 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase;
- Centrifugar por 1 minuto a 2000 rpm e remover o sobrenadante cuidadosamente;
- Ressuspender o *pellet* em 300 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase;
- Homogeneizar moderadamente em *vortex* e utilizar 30 µL dessa suspensão de células para a reação de PCR.

**NOTA:** É necessário que a amostra esteja homogênea para a utilização na PCR, pois a coleta apenas do sobrenadante pode gerar resultados negativos por insuficiência de material e a coleta do *pellet* concentrado pode causar inibição de PCR por excesso.

## 5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão dos kits contém reagentes e chips para 24 ou 48 testes.

A família **XGEN MULTI HPV LYO CHIP** é composta por kits que possuem componentes em dois diferentes formatos:

- **XGEN MULTI HPV FLOW CHIP MANUAL:** utilizado com a plataforma manual (HS12)
- **XGEN MULTI HPV FLOW CHIP AUTOMATIZADO:** utilizado com as plataformas semiautomatizada (HS24) e automatizada (HS12A).

| COMPONENTES                                    | DESCRIÇÃO                           | QUANTIDADE<br>24 TESTES<br>(XG-HPVM-MB-24) | QUANTIDADE<br>48 TESTES<br>(XG-HPVM-MB-48) | QUANTIDADE<br>24 TESTES<br>(XG-HPVA-MB-24) | QUANTIDADE<br>48 TESTES<br>(XG-HPVA-MB-48) |
|--|-------------------------------------|--|--|--|--|
| MM HPV   | Mistura de amplificação liofilizada | 3 strips x 8 poços (rosa)                  | 6 strips x 8 poços (rosa)                  | 3 strips x 8 poços (rosa)                  | 6 strips x 8 poços (rosa)                  |
| Solução de Hibridização (Reagente A)           | Solução de Hibridização             | 40 mL                                      | 80 mL                                      | 60 mL                                      | 115 mL                                     |
| Solução de Bloqueio (Reagente B)               | Solução de Bloqueio                 | 10 mL                                      | 18 mL                                      | 10 mL                                      | 18 mL                                      |
| Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Reagente C) | Estreptavidina-Fosfatase Alcalina   | 10 mL                                      | 18 mL                                      | 10 mL                                      | 18 mL                                      |

|                                    |                       |             |             |             |             |
|------------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Tampão de Lavagem I (Reagente D)   | Tampão de Lavagem I   | 35 mL       | 70 mL       | 35 mL       | 70 mL       |
| Substrato Cromogênico (Reagente E) | Substrato Cromogênico | 10 mL       | 18 mL       | 10 mL       | 18 mL       |
| Tampão de Lavagem II (Reagente F)  | Tampão de Lavagem II  | 18 mL       | 35 mL       | -           | -           |
| CHIP HPV                           | Chip HPV              | 24 unidades | 48 unidades | 24 unidades | 48 unidades |
| Guia Rápido                        | 1 unidade             | 1 unidade   | 1 unidade   | 1 unidade   | 1 unidade   |

## 5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO DOS REAGENTES

### 5.1.1 MM HPV

Componente pronto para uso, comercializado em formato de *strips* de 8 tubos de 0,2 mL contendo os reagentes liofilizados correspondendo a mix de PCR.

Os tubos correspondentes a MM HPV estão dispostos na cor rosa e possuem esfera liofilizada branca.

**NOTA:** Após a abertura da embalagem, armazenar os tubos nas *strips* com os reagentes liofilizados a +4°C por até uma semana.

### 5.1.2 REAGENTES A, B, C, D, E e F (Hibridização)

Reagentes prontos para uso.

**NOTA:** O reagente F é de uso exclusivo dos kits manuais.

### 5.1.3 CHIP (Hibridização)

Os chips são de uso único e devem ser manuseados com luvas.

Nunca tocar a membrana do chip. Para o manuseio, tocar somente na lateral do chip.

## 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;
- ✓ Racks termostável (4°C);
- ✓ Ponteiras com filtro livres de DNase/RNase;
- ✓ Microtubos 1,5 - 2,0 mL livres de nucleases;
- ✓ Luvas Descartáveis Sem Talco;
- ✓ Água livre de DNase/RNase duplamente destilada;
- ✓ Kit Master para Processamento de Tecidos em Parafina;
- ✓ Kit *Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification* (Promega) para purificação de DNA em amostras frescas ou parafinadas, quando necessário;
- ✓ *MagNa Pure* (Roche) para purificação de DNA de amostras frescas, quando necessário.
- ✓ Solução de Lavagem Automação.

### 6.1 EQUIPAMENTOS ESPECÍFICOS

- ✓ HS12: HybriSpot 12 (VIT-HS12)
  - Banho seco ou banho maria;
  - Equipamento HS12;

- Termociclador.
- ✓ HS24: HybriSpot 24 (VIT-HS24)
- Equipamento HS24
- Termociclador
- ✓ HS12A: HybriSpot 12Auto (VIT-HS12A)
- Equipamento HS12 AUTO

## 7. ESTABILIDADE EM USO

Os componentes são estáveis até a data de validade indicada. Não congelar.

## 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.
- 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.
- 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.

### 9.1 CONTROLES

Os kits XGEN MULTI HPV LYO CHIP possuem diversos controles internos para verificação da qualidade dos resultados.

Todas as sondas estão em duplicata para garantir a confiabilidade na análise automática dos resultados. O controle de hibridização (B) é repetido em 5 posições e permite ao *software* orientar corretamente o painel da sonda para sua posterior análise.

| SONDAS   | CONTROLE  | POSIÇÃO                |
|----------|---|------------------------|
| <b>B</b> | Controle de Hibridização                              | 1A - 1B - 2I - 5E - 8A |
| <b>C</b> | Controle de Amplificação Endógeno ( $\beta$ -globina) | 1C - 5F                |
| <b>U</b> | Sonda Universal para HPV                              | 1D - 5G                |

**Controle de Hibridização (B):** Um sinal intenso deve aparecer nas cinco posições de controle de hibridização, que servem como controle de qualidade. Este sinal indica que o processo de hibridização funcionou corretamente. A falta do sinal indica que ocorreu um erro durante o processo de hibridização ou que algum reagente não foi utilizado adequadamente.

**Controle de Amplificação Endógeno  $\beta$ -globina (C):** Sonda para detecção do gene da beta-globina humana. Todas as amostras em que o DNA testado for amplificado corretamente terão um sinal positivo no controle de amplificação endógeno (C). Este sinal mostra a qualidade/quantidade do DNA usado na amplificação. Um sinal positivo indica que a amplificação funcionou corretamente e que a qualidade e quantidade do DNA usado para ela foram ótimas. A falta de sinal para esse controle indica erros durante a amplificação, devido à baixa qualidade/quantidade do DNA utilizado na amplificação ou falta de DNA humano na amplificação. É provável que este último caso ocorra com tipos de amostras clínicas onde o número de células humanas está abaixo do limite de detecção.

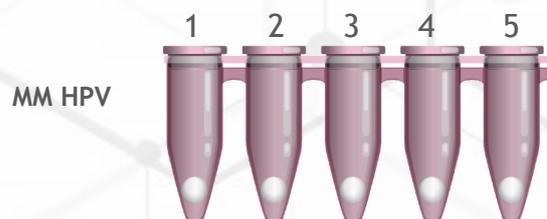
**Sonda Universal para HPV (U):** Inclui um conjunto de sondas dentro da região amplificada L1 do vírus. Esta sequência é compartilhada por todos os genótipos do painel e por outros genótipos de mucosa não incluídos neste kit. Deve-se levar em consideração que a sensibilidade de cada genótipo com essa sonda é diferente da sensibilidade de cada uma das sondas específicas. Por esse motivo, pode haver resultados de positividade com uma sonda específica para genótipo e não com a sonda U. Nesses casos, a ausência de positividade na sonda U não invalida a análise ou o resultado positivo para um genótipo específico. Quando apenas o sinal HPV (U) aparecer, não associado à positividade com a sonda específica, o *software* interpreta a amostra como "HPV POSITIVO, GENÓTIPO NÃO DETERMINADO". Esse resultado indicaria que a amostra é positiva, mas que o genótipo específico não foi identificado e pode ser um genótipo diferente dos incluídos no painel.

## 10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

### 10.1 REAÇÃO PCR MULTIPLEX

A reação de PCR é realizada com um volume final de 30  $\mu$ L em tubos de reação contendo a mix de PCR liofilizada.

**IMPORTANTE:** Um tubo de PCR deve ser usado para cada amostra. Caso o número de amostras a serem analisadas seja menor ou maior que 8, os tubos necessários podem ser separados da *strip*, sem a necessidade de utilizar *strips* completas. O diagrama a seguir mostra um exemplo da distribuição de amostras/*strips*, caso sejam utilizadas 5 amostras de teste:



As *strips* devem ser inseridas nos equipamentos HS12 Auto e HS24 seguindo a mesma ordem de amostras, como indicado no exemplo acima.

Uma vez que a embalagem das *strips* tenha sido aberta, os tubos contendo as esferas liofilizadas, que não serão utilizados naquele momento, devem ser armazenados por no máximo uma semana de 2 °C a 8 °C em sua embalagem original.

#### a) Preparo da mix para a reação de PCR - Plataformas HS12, HS24 e HS12 AUTO

- Pegar um tubo da MM HPV contendo a mistura liofilizada de PCR para cada amostra a ser analisada.
- Adicionar 3 a 30 µL de material genético previamente preparado à mix de PCR. Volumes específicos para cada tipo de amostra estão descritos no tópico 8 “AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E RECOMENDAÇÕES”.
- Homogeneizar a mistura agitando manualmente e centrifugar por alguns segundos.

**IMPORTANTE:** Se for utilizado DNA purificado para a PCR, 30 µL desse DNA pode ser adicionado diretamente no tubo com a mix de PCR liofilizada.

Se a quantidade de amostra inicial não estiver disponível, um volume menor pode ser utilizado (mínimo de 3 µL / reação de PCR), desde que seja completado o restante até 30 µL com água livre de DNase/RNase.

As especificações do kit em termos de da sensibilidade e especificidade clínicas são baseadas no uso de 30 µL da amostra inicial.

#### b) Protocolo de PCR - Plataformas HS12 e HS24

- Colocar os tubos no termociclador e programar as seguintes condições de amplificação:

| PROGRAMA DE PCR |        |           |
|-----------------|--------|-----------|
| 25 °C           | 10 min | 1 ciclo   |
| 94 °C           | 3 min  | 1 ciclo   |
| 94 °C           | 30 s   | 15 ciclos |
| 47 °C           | 30 s   |           |
| 72 °C           | 30 s   |           |
| 94 °C           | 30 s   | 35 ciclos |
| 65 °C           | 30 s   |           |
| 72 °C           | 30 s   |           |
| 72 °C           | 5 min  | 1 ciclo   |
| 8 °C            | ∞      | -         |

**NOTA:** Se o produto de PCR não for hibridizado imediatamente, ele pode ser armazenado na sala de pós-PCR entre 2 °C e 8 °C por 1 ou 2 dias. Armazenar a -20 °C para armazenamento por longos períodos (até o máximo de uma semana).

#### c) Protocolo de PCR - Plataforma HS12 AUTO

O processo completo de amplificação é executado automaticamente na plataforma HS12 AUTO em conjunto com o kit XGEN MULTI HPV FLOW CHIP AUTOMATIZADO.

**NOTA:** Antes de começar o processo, recomenda-se a leitura com atenção do manual do equipamento (incluído no HS12 AUTO) e seguir as instruções para a colocação das *strips* de tubos, chips e reagentes de hibridização no instrumento.

## 10.2 REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO

### a) Protocolo de Hibridização - Plataforma HS12

O processo completo de hibridização é realizado pelo *HybriSpot* (HS12) seguindo as instruções fornecidas pelo assistente do sistema. O gerenciamento de amostras, a captura de imagens e a análise bem como o relatório dos resultados são realizados pelo *software HybriSoft*.

Antes de iniciar o processo de hibridização:

- Ligar o Banho Maria a 41 °C, e pré-aquecer o Reagente A por pelo menos 20 minutos;
- Ligar e programar o equipamento HS12 a 41 °C;

**NOTA:** Retirar as tampas das posições dos chips que serão utilizadas antes de aquecer o equipamento. Os poços vazios do equipamento devem estar fechados para o correto funcionamento do vácuo.

- Certificar-se que a bomba *Waste* esteja conectada no *plug Waste* atrás do equipamento. A bomba *Clean* não deverá estar conectada.
- Desnaturar os produtos de PCR aquecendo em termociclador a 95 °C por 10 minutos e no mesmo equipamento adicionar um *hold* de 4 °C a 2 minutos para resfriamento da amostra;
- Posicionar os chips no HS12;

**NOTA:** Utilizar um chip por amostra e posicioná-los de maneira que a primeira fileira inicialmente seja preenchida; só após estar completa, preencher a segunda fileira e posteriormente a terceira; dessa forma, otimiza-se a utilização dos canais de vácuo.

- Dispensar 300 µL do Reagente A (41 °C) em cada chip;
- Incubar por pelo menos 2 minutos a 41 °C;

**NOTA:** Todas as etapas de incubação deverão ser realizadas com o equipamento devidamente fechado.

- Remover o reagente do chip por vácuo (30 segundos);
- Em um novo microtubo 1,5mL, adicionar 230 µL do Reagente A (41 °C) e 30 µL do produto de PCR desnaturado. Adicionar a solução diretamente no chip;

**NOTA:** Devido à ausência de extração de algumas amostras, alguns detritos de células podem ficar depositados no fundo do microtubo, por isso, deve-se evitar pipetar estes detritos para manter os chips “limpos”.

- Incubar por 8 minutos a 41 °C;
- Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
- Lavar 3 vezes adicionando 300 µL do Reagente A (41 °C) e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
- Programar o HS12 para 29 °C;
- Dispensar 300 µL do Reagente B;
- Incubar por 5 minutos;
- Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
- Assim que a temperatura atingir 29 °C, dispensar 300 µL do Reagente C;
- Incubar por 5 minutos a 29 °C;

- Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
- Programar o HS12 para 36 °C;
- Lavar as membranas 4 vezes dispensando 300 µL do Reagente D e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
- Assim que a temperatura atingir 36 °C, dispensar 300 µL do Reagente E;
- Incubar por 10 minutos a 36 °C;
- Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
- Lavar as membranas 2 vezes dispensando 300 µL do Reagente F e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
- Caso o chip esteja muito úmido mesmo após a aplicação do vácuo, repetir o processo de vácuo;
- Colocar os chips no sistema de captura do *HybriSpot* e fazer a análise pelo *software HybriSoft*.

**NOTA:** Para mais informações sobre como usar o *software* de análise, verificar o manual do equipamento.

#### b) Protocolo de Hibridização - Plataforma HS24

O processo completo de hibridização é executado automaticamente na plataforma HS24 em conjunto com kit XGEN MULTI HPV LYO CHIP AUTOMATIZADO. O gerenciamento de amostras, a captura de imagens, a análise e o relatório dos resultados são realizados através do *software HybriSoft*.

Antes de iniciar o processo de hibridização

- Desnaturar os produtos de PCR em termociclador a 95 °C por 10 minutos, seguido de um *hold* no termociclador a 4 °C por, pelo menos, 2 minutos;
- Colocar as amostras amplificadas e desnaturadas, os chips e os reagentes em suas posições correspondentes no HS24.
- Selecionar o protocolo correspondente no equipamento para iniciar o processo automático.

#### c) Protocolo de Hibridização - Plataforma HS12 AUTO

O processo completo de hibridização é executado automaticamente na plataforma HS12 AUTO em conjunto com kit XGEN MULTI HPV LYO CHIP AUTOMATIZADO. O processamento da amostra, a captura de imagens e a análise dos resultados são realizados com o *software HybriSoft*.

**NOTA:** Antes de iniciar o processo, recomenda-se a leitura com atenção do manual do equipamento (incluído no HS12 AUTO) e seguir as instruções para colocar as *strips*, chips e reagentes de hibridização no instrumento. Selecionar o protocolo correspondente no equipamento para iniciar o processo automático.

### 10.3 GABARITO DO TESTE

O esquema a seguir mostra a disposição das sondas no CHIP HPV:

|   | 1  | 2  | 3  | 4     | 5  | 6  | 7  | 8     | 9  |
|---|----|----|----|-------|----|----|----|-------|----|
| A | B  | 33 | 58 | 42    | 71 | 16 | 52 | B     |    |
| B | B  | 35 | 59 | 43    | 72 | 18 | 53 | 6     | 69 |
| C | C  | 39 | 66 | 44/45 |    | 26 | 56 | 11    | 70 |
| D | U  | 45 | 68 | 54    | 84 | 31 | 58 | 40    | 71 |
| E | 16 | 51 | 73 | 61    | B  | 33 | 59 | 44/45 | 72 |
| F | 18 | 52 | 82 | 62/81 | C  | 35 | 66 | 54    |    |
| G | 26 | 53 | 6  | 67    | U  | 39 | 68 | 61    | 84 |
| H | 31 | 56 | 11 | 69    | 42 | 45 | 73 | 62/81 |    |
| I |    | B  | 40 | 70    | 43 | 51 | 82 | 67    |    |

**Legenda:**

- **B:** Controle de hibridização.
- **C:** Controle de amplificação endógeno MM HPV (fragmento B-Globina humana).
- **U:** Sonda Universal para HPV.
- **X:** Sondas específicas para cada genótipo.

#### 10.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A interpretação dos resultados é feita automaticamente utilizando o *software* de análise *HybriSoft*. O esquema a seguir mostra o arranjo das sondas no CHIP HPV:

| Resultados Esperados | Sonda/Posição (coluna-linha) |                |       |            |
|----------------------|------------------------------|----------------|-------|------------|
|                      | Sonda                        | B              | C     | U          |
| HPV 16               | 1E-6A                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 18               | 1F-6B                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 26               | 1G-6C                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 31               | 1H-6D                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 33               | 2A-6E                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 35               | 2B-6F                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 39               | 2C-6G                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 45               | 2D-6H                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 51               | 2E-6I                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 52               | 2F-7A                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 53               | 2G-7B                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 56               | 2H-7C                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 58               | 3A-7D                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 59               | 3B-7E                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 66               | 3C-7F                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 68               | 3D-7G                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 73               | 3E-7H                        | 1A-1B-2I-5E-8A | 1C-5F | -- / 1D-5G |

|   |       |                 |       |            |
|---|-------|-----------------|-------|------------|
| HPV 82  | 3F-7I | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 6   | 3G-8B | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 11  | 3H-8C | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 40  | 3I-8D | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 42  | 4A-5H | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 43  | 4B-5I | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 44/55   | 4C-8E | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 54  | 4D-8F | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 61  | 4E-8G | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 62/81   | 4F-8H | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 67  | 4G-8I | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 69  | 4H-9B | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 70  | 4I-9C | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 71  | 5A-9D | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 72  | 5B-9E | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV 84  | 5D-9G | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | -- / 1D-5G |
| HPV Positivo, Genótipo Não Determinado                            | -     | 1A-1B-2I-5E-8A  | 1C-5F | 1D-5G      |
| Resultado Negativo  | -     | 1A-1B-2K-6F-10A | 1C-5F | -          |
| Branco. Material Inapropriado. Material Insuficiente. PCR Inibida | -     | 1A-1B-2K-6F-10A | -     | -          |
| Erro De Hibridização  | -     | -               | -     | -          |

## 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 Multi HPV Lyo Chip 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

O limite de detecção para cada genótipo de HPV foi calculado utilizando diluições seriadas de amostras de DNA sintéticos de cada genótipo incluído no painel contendo 10ng de DNA genômico humano. Cada amostra foi repetida diversas vezes para calcular a sensibilidade, especificidade e intervalos de confiança.

Todas as PCRs foram hibridizadas no equipamento *HybriSpot* e os resultados foram analisados com o *software* do *HybriSoft*. Foi estabelecido um valor corte igual a 6 (intensidade de cinza) para considerar as amostras positivas.

| Genótipo HPV | GE/Reação De PCR | Positivos/ Testados | Sensibilidade (%) | Intervalo De Confiança 95% (%) | Especificidade (%) | Intervalo De Confiança 95% (%) |
|--------------|------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| 16           | 5                | 4/10                | 40                | 16.8-68.8                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 18           | 5                | 5/10                | 50                | 29.9-70.1                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 26           | 50               | 5/10                | 50                | 29.8-70.1                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 500              | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 31           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 33           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 35           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 39           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 45           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 51           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 52           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 53           | 50               | 0/10                | 0                 | 0-27.8                         | 100                | 98.5-100                       |
|              | 500              | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 56           | 50               | 5/10                | 50                | 29.9-70.1                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 500              | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 58           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 59           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 66           | 50               | 4/10                | 40                | 16.8-68.8                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 500              | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 68           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 73           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 82           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 6            | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 11           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 40           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.5-100                       |
| 42           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 43           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 44/45        | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 54           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 61           | 50               | 5/10                | 50                | 29.9-70.1                      | 100                | 98.5-100                       |
|              | 500              | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 62/81        | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 67           | 50               | 10/10               | 100               | 72.3-100                       | 100                | 98.6-100                       |
| 69           | NT               |                     |                   |                                |                    |                                |

|    |    |       |     |          |     |          |
|----|----|-------|-----|----------|-----|----------|
| 70 | 50 | 10/10 | 100 | 72.3-100 | 100 | 98.6-100 |
| 71 | 50 | 10/10 | 100 | 72.3-100 | 100 | 98.6-100 |
| 72 | 50 | 10/10 | 100 | 72.3-100 | 100 | 98.6-100 |
| 84 | 50 | 10/10 | 100 | 72.3-100 | 100 | 98.6-100 |

NT: Não testado.

## 12.2 ESPECIFICIDADE

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

Cada genótipo de HPV foi analisado pelo Kit XGEN MULTI HPV FLOW CHIP com 5 x 10<sup>6</sup> GE/Reação.

A hibridização foi realizada através do equipamento *HybriSpot* e analisado pelo *software HybriSoft* com valor de corte de 6.

Não foram observadas reações cruzadas entre os genótipos de HPV, exceto para os genótipos 44/45 e genótipos 62 /81 que apresentam reação de hibridização cruzada. Devido a isso, as sondas 62/81 e as sondas 44/45 estão localizadas na mesma posição no chip. O software não realiza diferenciação entre os genótipos 44-55 e 62-81.

| Vírus  | Especificidade |
|--------|----------------|
| HPV 16 | 100%           |
| HPV 18 | 100%           |
| HPV 26 | 100%           |
| HPV 31 | 100%           |
| HPV 33 | 100%           |
| HPV 35 | 100%           |
| HPV 39 | 100%           |
| HPV 45 | 100%           |
| HPV 51 | 100%           |
| HPV 52 | 100%           |
| HPV 53 | 100%           |
| HPV 56 | 100%           |
| HPV 58 | 100%           |
| HPV 59 | 100%           |
| HPV 66 | 100%           |
| HPV 68 | 100%           |
| HPV 73 | 100%           |
| HPV 82 | 100%           |
| HPV 6  | 100%           |
| HPV 11 | 100%           |
| HPV 40 | 100%           |
| HPV 42 | 100%           |
| HPV 43 | 100%           |
| HPV 55 | 100%           |
| HPV 54 | 100%           |
| HPV 61 | 100%           |
| HPV 62 | 100%           |
| HPV 67 | 100%           |
| HPV 69 | 100%           |

|        |      |
|--------|------|
| HPV 70 | 100% |
| HPV 81 | 100% |
| HPV 71 | 100% |
| HPV 72 | 100% |
| HPV 89 | 100% |
| HPV 84 | 100% |

Da mesma forma, não foram observadas reações cruzadas com outros vírus e bactérias analisados.

| Bactéria                        | Vírus                  |
|---------------------------------|------------------------|
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i>    | Herpes simplex vírus 1 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i>    | Herpes simplex vírus 2 |
| <i>Salmonella enteritidis</i>   |                        |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>  |                        |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>     |                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    |                        |
| <i>Escherichia coli</i>         |                        |
| <i>Gardnerella vaginalis</i>    |                        |
| <i>Candida albicans</i>         |                        |
| <i>Proteus penneri</i>          |                        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |                        |
| <i>Citrobacter freundii</i>     |                        |
| <i>Citrobacter koseri</i>       |                        |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    |                        |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    |                        |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> |                        |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   |                        |
| <i>Kluyvera ascorbata</i>       |                        |
| <i>Providencia rettgeri</i>     |                        |
| <i>Campylobacter jejuni</i>     |                        |
| <i>Enterobacter cloacae</i>     |                        |
| <i>Morganella morganii</i>      |                        |
| <i>Proteus mirabilis</i>        |                        |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> |                        |
| <i>Serratia ureilytica</i>      |                        |
| <i>Providencia stuartii</i>     |                        |

### 12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

### 12.4 PRECISÃO

O ensaio de precisão mostra o grau de confiança do sistema. Cada procedimento de medição tem uma variação aleatória inerente chamada “erro aleatório”. Estes erros aleatórios não tem um valor numérico, mas são determinados pela dispersão das medidas do desvio padrão e pelo coeficiente de variação (%).

Normalmente a precisão de um ensaio se refere à concordância entre medições replicadas de um mesmo material.

Para determinar a precisão do método, foram avaliados vários fatores que poderiam contribuir para a imprecisão, como: modelos distintos de equipamentos, operadores.

### Repetibilidade

A repetibilidade indica a variação das medidas obtidas por um mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento de medição e método, sob as mesmas condições.

Para o teste de repetibilidade foi realizado o método no mínimo 4 vezes para cada um dos genótipos incluídos no painel.

O ensaio foi realizado pelo mesmo operador, na mesma localização e usando o mesmo lote de reagentes (Tabela 1). Todos os resultados foram analisados com o software HybriSoft v2.1, com um cut-off positivo de 6.

| Genótipo HPV | GE/ Reação | Número de Positivos/testados | % Positivos |
|--------------|------------|------------------------------|-------------|
| HPV 16       | 5          | 2/4                          | 50%         |
|              | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 18       | 5          | 2/4                          | 50%         |
|              | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 26       | 50         | 2/4                          | 50%         |
|              | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 31       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 33       | 50         | 3/4                          | 75%         |
|              | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 35       | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 39       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 45       | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 51       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 52       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 53       | 50         | 0/4                          | 0%          |
|              | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 56       | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 58       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 59       | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 66       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 68       | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 73       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 82       | 50         | 4/4                          | 100%        |
|              | 500        | 4/4                          | 100%        |
| HPV 6        | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 11       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 40       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 42       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 43       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 55       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 54       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 61       | 50         | 2/4                          | 50%         |
| HPV 62       | 50         | 4/4                          | 100%        |
| HPV 67       | 50         | 4/4                          | 100%        |
|              | 500        | 4/4                          | 100%        |

|        |    |     |      |
|--------|----|-----|------|
| HPV 69 | NT |     |      |
| HPV 70 | 50 | 4/4 | 100% |
| HPV 71 | 50 | 4/4 | 100% |
| HPV 72 | 50 | 4/4 | 100% |
| HPV 84 | 50 | 4/4 | 100% |

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é a variação das médias obtidas por diferentes operadores e equipamento de medição para medir repetidamente uma mesma grandeza, ou seja, é a capacidade de se reproduzir uma técnica de medição.

A reprodutibilidade deste método foi analisada através do processamento de 10 amostras de DNA positivas para HPV, preparadas com genes sintéticos quantificados contendo 10ng de DNA genômico humano. As amostras foram processadas em dois laboratórios diferentes, com diferentes lotes de reagentes, equipamentos e operadores. Cada amostra foi testada 3 vezes em diferentes dias utilizando a plataforma HybriSpot e o software *HybriSoft* para análise, com um cut-off positivo de 6.

| Amostra                  | GE/reação | Laboratório 1     |             | Laboratório 2     |             |
|--------------------------|-----------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                          |           | Positivos/Válidos | % Positivos | Positivos/Válidos | % Positivos |
| HPV 16                   | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 5         | 2/3               | 66%         | 1/3               | 33%         |
| HPV 18                   | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 5         | 2/3               | 66%         | 1/3               | 33%         |
| HPV 31                   | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 35                   | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 6                    | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 11                   | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 16 + HPV 18          | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 31 + HPV 6           | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 16 + HPV 45 + HPV 6  | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
| HPV 18 + HPV 31 + HPV 42 | 500       | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |
|                          | 50        | 3/3               | 100%        | 3/3               | 100%        |

### 13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

### 14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

## 15. REQUISITOS

Não aplicável.

## 16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

| PROBLEMA  | CAUSA   | SOLUÇÃO  |
|---|---|--|
| Ausência de Sinal/<br>Ausência de sinal no Controle de Hibridização | Falha no protocolo de hibridização.   | Verificar se todos os reagentes foram adicionados corretamente durante o processo de hibridização.<br>Verificar a performance do equipamento HS12, HS24, HS12A e repetir o ensaio. |
|   | Reagentes fora do prazo de validade ou que não foram devidamente armazenados. | Verificar a data de validade e condições de armazenamento dos reagentes e do Chip, e repetir o ensaio.   |
|   | Sondas no Chip degradadas por restos de reagentes contaminantes nos poços.    | Caso a descontaminação da área de trabalho tenha sido realizada com água sanitária, o DNA pode ter sido degradado. Limpar a bancada com água destilada e repetir o ensaio.         |
| Ausência de sinal do Controle Endógeno                              | Quantidade insuficiente de DNA na amostra clínica ou problemas na extração.   | Repetir o ensaio utilizando uma quantidade maior de amostra.   |
|   | Presença de inibidores de PCR na amostra.                                     | Purificar o DNA da amostra e repetir o teste.  |
| Sinal fraco de Hibridização   | Reagentes de PCR e/ou Hibridização fora do prazo de validade.                 | Checar a data de validade de todos os reagentes e condições de armazenamento.<br>Repetir o ensaio.   |
|   | Volume de amostra utilizado na mix liofilizada.                               | Repetir o ensaio utilizando o volume correto de amostra.   |
|   | Falha no protocolo de hibridização  | Checar o funcionamento correto dos equipamentos HS12/HS24/HS12A e protocolo de hibridização. Repetir o ensaio.   |
|   | Baixa concentração ou qualidade do DNA da amostra.                            | Concentrar a amostra durante o processamento adicionando menos volume de água.   |
|   | Falha no processo de amplificação da amostra.                                 | Verificar a ciclagem e a calibração do termociclador. Realizar um teste utilizando uma amostra sabidamente positiva.   |

## 17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

- Os kits devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- O pessoal técnico deve ser profundamente treinado na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR, bem como os equipamentos *HybriSpot*® para realização dos ensaios.
- Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. O uso de objetos perfurocortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- 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.

5. O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.
6. Evitar vibração na superfície da bancada onde o teste é realizado.
7. Após o recebimento, armazenar o kit em geladeira em 2 °C a 8 °C.
8. Não trocar os componentes entre diferentes lotes dos kits. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
9. Verificar se os reagentes estão límpidos e sem partículas visíveis pesadas ou grumos, com exceção do Reagente A que poderá apresentar partículas visíveis, entretanto estas partículas devem desaparecer quando o reagente for aquecido durante o protocolo de utilização no equipamento. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição do kit.
10. Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada amostra.
11. Evitar contaminação cruzada entre os reagentes do kit utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as entre o uso de cada uma.
12. Não utilizar o kit após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
13. Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras clínicas devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor.
14. Armazenar e extrair as amostras separadamente de outros reagentes e utilizar sala dedicada para o manuseio.
15. O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, começando na área de extração (quando aplicável) e passando para a amplificação e área de análises de dados. Não retornar as amostras, equipamentos e reagentes para a área onde as primeiras etapas foram realizadas.
16. O uso de plásticos descartáveis é recomendado na preparação dos componentes líquidos ou na transferência dos componentes para sistemas automatizados, a fim de evitar contaminação cruzada.
17. 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.
18. Outros resíduos gerados (exemplo: ponteiras utilizadas para amostras) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.
19. Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.

## 18. GARANTIA

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

### 18.1 GARANTIA

Os kits XGEN MULTI HPV LYO CHIP são garantidos pela Mobius contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

## 18.2 EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

## 18.3 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@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br  
CNPJ: 04.645.160/0001-49

## 20. REGISTRO ANVISA

80502070090