

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MULTI IST CHIP

FAMÍLIA DE KITS MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS CAUSADORES DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (ISTs) POR PCR E HIBRIDIZAÇÃO REVERSA

1. FINALIDADE E MODO DE USO

Os kits XGEN MULTIPLEX IST CHIP são testes qualitativos *in vitro* para detecção de patógenos causadores de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em humanos. Os micro-organismos que causam estas infecções muitas vezes são difíceis de detectar e incluem vírus, bactérias e fungos, podendo ocorrer coinfeções. Os kits detectam simultaneamente 11 patógenos: *Chlamydia trachomatis*¹, *Haemophilus ducreyi*, *Herpes simplex*² (HSV1/HSV2), *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis* e *Ureaplasma*³ (*urealyticum*/*parvum*).

O teste pode ser realizado em diferentes tipos de amostras clínicas (urina, sêmen, swabs uretral, endocervical, anal e de garganta) sem a necessidade de extração prévia de DNA, bem como utilizando DNA purificado destes tipos de amostras. 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*®.

¹Biovars e Sorovares da espécie *Chlamydia trachomatis* detectados com o kit MULTIPLEX IST CHIP:

- *Chlamydia trachomatis* Biovar Trachoma: Sorovares A-K.
- *Chlamydia trachomatis* Biovar LGV: Sorovares L1-L3.

*O organismo 0318 notificado só intervém na avaliação do cumprimento dos testes de *Chlamydia trachomatis* Biovars A-K em amostras de urina, swab uretral, endocervical e anal. A detecção de *Chlamydia trachomatis* Biovars L1-L3, bem como a detecção de Biovars A-K em amostras de sêmen e swab de garganta não são reguladas pela certificação do organismo notificado 0318.

NOTA: Na literatura, é comum o uso dos termos Biovar ou Sorovar indistintamente para se referir aos Sorovares A-K de Trachoma Biovar e L1-L3 de Biovar LGV da espécie *C. trachomatis*.

²O kit Multiplex IST CHIP faz a diferenciação dos vírus HSV1 e HSV2.

³Ureaplasmas detectados pelo kit:

- *Ureaplasma urealyticum*: UUR2, UUR4, UUR5, UUR7, UUR8, UUR9, UUR10, UUR11, UUR12, UUR13.
- *Ureaplasma parvum*: UPA1, UPA3, UPA6, UPA14.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

1.1 INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) podem ser causadas por vírus, bactérias e outros micro-organismos. São transmitidas principalmente pelo contato sexual ou ainda podem passar da mãe para o filho durante o parto e/ou amamentação.

Antigamente chamadas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs), tiveram sua denominação alterada para ISTs, pois o termo “doença” implica em sintomas e sinais visíveis no indivíduo. Já as infecções podem apresentar períodos assintomáticos ou podem se manter assim ao longo da vida.

A falta de informação combinada com a despreocupação, principalmente entre a população de jovens, são os fatores determinantes para o aumento da transmissão das ISTs. Segundo a OMS/Brasil, a maioria dos brasileiros (94%) sabe que o preservativo é a melhor forma de prevenção às ISTs e AIDS, mesmo assim 45% da população sexualmente ativa não usou preservativo nas relações sexuais casuais nos últimos 12 meses. Por esse motivo, cerca de 2,5% (aproximadamente 5 milhões) da população brasileira sexualmente ativa já foi contaminada, em alguma ocasião, por algum tipo de IST.

O diagnóstico adequado destas infecções é de suma importância para o paciente, promovendo tratamento adequado e diminuindo os riscos de transmissão da infecção, assim como para os estudos epidemiológicos destes microrganismos na população.

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

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 em metodologia que envolve simultaneamente à amplificação multiplex do DNA de bactérias, vírus e protozoários por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de hibridização reversa (*Dot Blot*) com sondas específicas imobilizadas em um chip composto por membrana de nylon (Tecnologia Flow Chip). O processo de hibridização permite a ligação dos produtos de PCR biotinizados 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 roxa, na posição em que o fragmento amplificado hibridiza com a sonda específica, e este sinal é automaticamente capturado e analisado pelo software *HybriSoft*.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O ensaio pode ser realizado com diferentes tipos de amostras clínicas como urina, sêmen, citologia líquida, swab uretral, endocervical, anal e de garganta sem extração prévia de DNA. De acordo com o tipo de amostra clínica, seguir os protocolos de processamento abaixo. Para coleta de amostras, seguir o **GUIA DE COLETA E MANUSEIO DE AMOSTRAS PARA TESTES DE NAAT - IST**.

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

A coleta, armazenamento e transporte de amostras devem ser realizadas de acordo com as condições validadas pelo usuário. No geral, 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. As amostras devem ser transportadas refrigeradas (2°C a 8°C). Para transporte mais longo (maior do que 2 horas), recomendamos o transporte a -20°C ou inferior.

4.3 PREPARO

Cada tipo de amostra deve ser preparado conforme os itens abaixo. Se a amostra clínica não for processada imediatamente após o recebimento, é recomendado o armazenamento a 4°C por um período máximo de 1 semana. Em caso de interesse na validação de amostras não citadas nesta instrução, solicita-se que entre em contato com a equipe de suporte ao cliente para auxílio no procedimento.

4.3.1 URINA

- Homogeneizar as amostras de urina utilizando um *vortex*. Pegar 400 µL da amostra homogeneizada e transferir para um microtubo.
- Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm. Após a centrifugação descartar o sobrenadante cuidadosamente. É recomendado a utilização de uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta de 1 mL.
- Fazer a lavagem dos sedimentos celulares colocando 400 µL de água livre de DNase/RNase. Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm. Remover o sobrenadante cuidadosamente.
- Ressuspender as células em 400 µL de água livre de DNase/RNase para obter uma suspensão homogênea de células.
- Homogeneizar em *vortex* e utilizar 30 µL da suspensão de células para a reação de PCR. Caso o processamento não seja realizado imediatamente, armazenar a -20°C por no máximo dois meses.

4.3.2 AMOSTRAS DE SÊMEN

- Homogeneizar a amostra utilizando uma pipeta. Pegar um volume de 400 µL da amostra homogeneizada e transferir para um microtubo de centrifugação.
- Centrifugar a amostra por 3 minutos a 12.000 rpm. Após a centrifugação descartar o sobrenadante cuidadosamente. É recomendado a utilização de uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta de 1 mL.
- As amostras clínicas de sêmen precisam de um tratamento enzimático para a correta lise celular. Para isso é necessário utilizar os reagentes *DNA Release* e o Tampão de Extração incluídos no Kit de Processamento de Tecido em Parafina, conforme o seguinte protocolo:
- Adicionar 100 µL da solução de lise em cada amostra de sêmen e homogeneizar [diluição 1:50 do DNA release no tampão de extração (2 µL de DNA *Release* em 98 µL de Tampão de Extração)].
- Adicionar 100 µL de solução de lise ao sedimento celular e homogeneizar.
- Incubar a amostra a 55 °C por 30 minutos. Se possível, incubar as amostras em um banho seco com agitação a 1.000 rpm.
- Incubar a 95 °C por 10 minutos e depois centrifugar a 2.000 rpm por 1 minuto. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
- Adicionar 27 µL de água livre de DNase/RNase e 3 µL do sobrenadante na mix liofilizada para a reação de PCR. Caso o processamento não seja realizado imediatamente, armazenar a -20°C por no máximo dois meses.

4.3.3 AMOSTRAS DE SWAB URETRAL, ENDOCERVICAL, ANAL E DE GARGANTA

- Agitar o swab em 400 µL de água livre de DNase/RNase em um microtubo de 1,5-2 mL.
- Homogeneizar em *vortex* e utilizar 30 µL da suspensão de células para a reação de PCR.
- Se o swab tiver algum meio de transporte (PBS ou outro), é recomendado seguir o protocolo abaixo:
- Agitar em *vortex* e transferir a suspensão homogênea para um microtubo de centrifugação.
- Centrifugar amostra por 3 minutos a 12.000 rpm.
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante cuidadosamente utilizando uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta de 1 mL.
- Ressuspender as células em 400 µL de água livre de DNase/RNase para obter uma suspensão homogênea de células.
- Agitar em *vortex* e utilizar 30 µL da suspensão de células para a reação de PCR.

NOTA: Para amostras de swab anal pode ser necessária uma lavagem adicional com água livre de DNase/RNase, dependendo da turbidez dada pelo material orgânico, a fim de minimizar a ação inibitória de PCR.

4.3.4 AMOSTRAS ENDOCERVICAIS DE CITOLOGIA LÍQUIDA

- Transferir 400 µL da amostra homogeneizada em *vortex* e para um microtubo.
- Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm.
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante cuidadosamente. É recomendado a utilização de uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta de 1 mL.
- Ressuspender os sedimentos celulares em 400 µL de água livre de DNase/RNase.
- Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm. Remover o sobrenadante cuidadosamente. É recomendado a utilização de uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta de 1 mL.
- Ressuspender as células em 400 µL de água livre de DNase/RNase para obter uma suspensão homogênea de células.
- Homogeneizar em *vortex* e utilizar 30 µL da suspensão de células para a reação de PCR.

Além de seguir cuidadosamente as indicações dos protocolos de processamento de cada um dos tipos de amostras clínicas para as quais este kit foi validado, algumas incidências habituais podem ocorrer ao processar qualquer tipo de amostra clínica. Para evitar estes incidentes, verificar a tabela abaixo.

INCIDENTES	CONSEQUÊNCIAS	COMO EVITAR
Utilização de uma solução aquosa diferente de água livre de DNase/RNase.	Inibição da PCR.	Utilizar apenas água livre de DNase/RNase.
Células no fundo do tubo.	Ao pipetar a quantidade requerida para a PCR existe um risco de a quantidade de células não ser suficiente.	Agitar o tubo contendo a amostra para ressuspender antes da aspiração do volume para PCR. O usuário deve confirmar a presença dos sedimentos visualmente.
A amostra possui muitos sedimentos celulares em forma de grumos.	Ao pipetar um grupo a ponteira pode ficar entupida e não aspirar o volume	O usuário deve confirmar visualmente se a amostra foi aspirada devidamente.

	necessário para a reação de PCR.	
Amostra com poucas células.	Se o pellet é ressuspensionado em um alto volume de água, existe um risco de resultados falso-negativo ou sem resultados devido à falta de material.	Ressuspender o pellet em um volume menor de água.
A amostra foi adicionada no tubo de PCR e não foram colocadas diretamente no termociclador.	As células começam a quebrar e a proteases podem destruir a polimerase dando resultados nulos.	Uma vez adicionada a amostra ao mix de PCR amplificar imediatamente.
Amostras armazenadas em água por mais de 1 semana a 4 °C.	As células começam a quebrar e a proteases podem inibir a polimerase dando resultados nulos.	Utilizar as amostras ressuspensionadas em água logo após a coleta; congelar as amostras se não for utilizar imediatamente.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

A apresentação padrão dos kits contém reagentes e chips para 24 testes.

A família XGEN MULTI IST FLOW CHIP é composta por kits que possuem componentes em dois diferentes formatos:

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

Para todos os formatos de apresentação dos kits, o gerenciamento de amostras, a captura de imagens e a análise bem como o relatório dos resultados são realizados pelo *software* HybriSoft.

COMPONENTES	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	
		24 TESTES MANUAL (XG-ISTM-MB)	24 TESTES AUTOMATIZADO (XG-ISTA-MB)
MM IST	Solução de Primers e Sondas liofilizadas	3 <i>strips</i> x 8 tubos	3 <i>strips</i> x 8 tubos
Reagente A	Solução de Hibridização	40 mL	60 mL
Reagente B	Solução de Bloqueio	10 mL	10 mL
Reagente C	Estreptavidina-Fosfatase Alcalina	10 mL	10 mL
Reagente D	Tampão de Lavagem I	35 mL	35 mL
Reagente E	Solução de substrato e cromógeno	10 mL	10 mL
Reagente F	Tampão de Lavagem II	18 mL	-
CHIP IST	Chip IST	24 unidades	24 unidades

5.1 PREPARO E PRESERVAÇÃO

5.1.1 MM IST

Componentes prontos para uso, comercializados 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 IST estão dispostos na cor azul e possuem esfera liofilizada branca.

NOTA: Após a abertura da embalagem, armazenar a 2°C a 8°C os tubos nas strips com os reagentes liofilizados em até no máximo 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.

NOTA: Para o manuseio, tocar somente na lateral do chip, nunca tocar sobre a membrana do chip.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

6.1 MATERIAIS E REAGENTES

6.1.1 MATERIAIS COMUNS PARA AS PLATAFORMAS HS12, HS24 E HS12 AUTO

- Luvas descartáveis sem talco;
- Microtubos 1,5 - 2,0 mL livres de nucleases;
- Ponteiros com filtro livres de DNase/RNase.

6.1.2 REAGENTES COMUNS PARA AS PLATAFORMAS HS12, HS24 E HS12 AUTO

- Água livre de DNase/RNase.
- Kit para Processamento de Tecido em Parafina (aplicável às amostras de sêmen).

6.1.3 REAGENTES ESPECÍFICOS PARA AS PLATAFORMAS HS24 E HS12 AUTO

- Solução de Lavagem Automação.

6.2 EQUIPAMENTOS

6.2.1 EQUIPAMENTOS COMUNS PARA AS PLATAFORMAS HS12, HS24 E HS12 AUTO

- Micropipetas calibradas (0,5 µL < volume < 1.000 µL).

As micropipetas devem ser 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. As micropipetas devem ser certificadas e estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e uma exatidão de +/- 5%.

6.2.2 EQUIPAMENTOS ESPECÍFICOS

HS12

- Banho seco ou banho maria;
- Equipamento HS12;
- Termociclador*.

HS24

- Equipamento HS24;
- Termociclador*.

*Os kits XGEN MULTI MDR FLOW CHIP são direcionados para uso em combinação com qualquer termociclador convencional com capacidade para tudo de 0,2 mL.

HS12 AUTO

- Equipamento HS12 AUTO.

7. ESTABILIDADE EM USO

Os reagentes de PCR devem ser armazenados em áreas livres 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 a 2°C a 8°C por no máximo uma semana.

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.
- 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.

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 os equipamentos, 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 equipamento.
- 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.

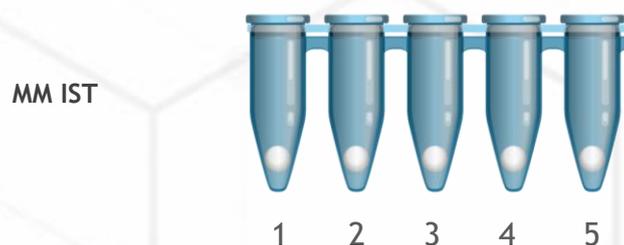
- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.

10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

10.1 REAÇÃO PCR MULTIPLEX

A MM IST liofilizada já vem pronta para uso. A reação de PCR é realizada com um volume final de 30 μL em cada tubo de reação.

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.

IMPORTANTE: 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.

10.1.1 PREPARO DA MIX PARA A REAÇÃO DE PCR - PLATAFORMAS HS12, HS24 E HS12 AUTO

- Pegar um tubo da MM IST 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 item “4.3 PREPARO”.
- Homogeneizar a mistura agitando manualmente e centrifugar por alguns segundos.

IMPORTANTE: Se for utilizado DNA purificado para a PCR, 3 μL desse DNA pode ser adicionado diretamente no tubo com a mix de PCR liofilizada e o volume deve ser completado com 27 μL de água livre de DNase/RNase.

10.2 PROTOCOLO DE PCR

10.2.1 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
95 °C	3 min	1 ciclo
95 °C	30 s	40 ciclos
55 °C	45 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 a 8 °C por 1 ou 2 dias. Armazenar a -20 °C para armazenamento por longos períodos (até o máximo de uma semana).

10.2.2 PLATAFORMA HS12 AUTO

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

10.3 REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO

10.3.1 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 as membranas 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 adicionando 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.

10.3.2 PLATAFORMA HS24

O processo completo de hibridização é executado automaticamente na plataforma HS24 em conjunto com kit XGEN MULTI IST 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.

10.3.3 PLATAFORMA HS12 AUTO

O processo completo de hibridização é executado automaticamente na plataforma HS12 AUTO em conjunto com kit XGEN MULTI IST 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.

10.4 GABARITO DO TESTE

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	MG				CT-S1		B	
B	B		MH				CT-S2		
C	CI	TV		UU-P		MG		UU-P	
D	BG		HD				MH		
E		HSV-1 / HSV-2		NG	B	TV		NG	
F			HSV-1		CI		HD		
G		CT-S1		TP	BG	HSV-1 / HSV-2		TP	
H			CT-S2				HSV-1		
I		B		pcCT				pcCT	

Legenda:

- **B:** Controle de hibridização.
- **CI:** Controle de amplificação exógeno.
- **BG:** Controle de amplificação endógeno (fragmento B-Globina humana).
- **X:** Sondas específicas para cada patógeno.

10.5 CONTROLES DO ENSAIO

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

No chip, todas as sondas são duplicadas para garantir a confiabilidade nos resultados. O controle de hibridização (B) é repetido 5 vezes e permite que o software se oriente corretamente no painel de sondas no momento da análise.

SONDAS	CONTROLE	POSIÇÃO
B	Controle de Hibridização	1A - 1B - 2I - 5E - 8A
CI	Controle de Amplificação Exógeno	1C - 5F
BG	Controle de Amplificação Endógeno (β -globina)	1D - 5G

10.5.1 CONTROLE DE HIBRIDIZAÇÃO (B)

Um sinal intenso deve aparecer nas cinco posições de controle de hibridação (B), que servem como controle de qualidade. Este sinal indica que o processo de hibridização funcionou corretamente. Se o sinal não aparecer, indicada que ocorreu um erro durante o processo de hibridização ou que o reagente não foi utilizado adequadamente.

10.5.2 CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO EXÓGENO (CI)

Sonda para a detecção de DNA sintético incluído na mistura de PCR. Esse DNA será co-amplificado junto com o material genético da amostra. Dois sinais positivos no controle de amplificação exógena (CI) indicarão que a reação de PCR funcionou corretamente. Um resultado negativo nesse controle não invalida o resultado se o controle endógeno (BG) foi amplificado corretamente e/ou a amostra foi positiva para qualquer um dos organismos incluídos no painel.

10.5.3 CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO ENDÓGENO (BG)

Sonda para a detecção do DNA do gene da beta-globina humana (BG) amplificada durante a PCR. Todas as amostras em que o DNA testado foi amplificado corretamente terão um sinal positivo no controle de amplificação endógena (BG). 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. Um resultado negativo nesse controle não invalida o resultado se a amostra for positiva para qualquer um dos organismos incluídos no painel. Caso não haja detecção desse controle e demais sondas do chip (resultado negativo para todos os patógenos), é provável que a amostra clínica contenha poucas células humanas ou que seja imprópria para realização do teste.

NOTA: Quando uma amostra é positiva para qualquer um dos patógenos incluídos no kit, com um resultado negativo para os controles de amplificação exógenos e endógenos, o relatório para a análise automática dos resultados com o *software HybriSoft* mostra um aviso de “nenhum controle exógeno/nenhum ser humano Controle de DNA” para o usuário executar as verificações apropriadas antes de validar o resultado.

O usuário é responsável por determinar os procedimentos apropriados de controle de qualidade para o laboratório e cumprir a legislação aplicável.

10.6 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 IST:

RESULTADO	ID DA SONDA	SONDA/POSIÇÃO (COLUNA-LINHA)			
		SONDA	B	CI	BG
<i>Mycoplasma genitalium</i>	MG	2A-6C	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Mycoplasma hominis</i>	MH	3B-7D	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TV	2C-6E	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Ureaplasma urealyticum/parvum</i>	UU-P	4C-8C	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Haemophilus ducreyi</i>	HD	3D-7F	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
Herpes simplex 1*	HSV1/HSV2 + HSV-1	2E-6G-3F-7H	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
Herpes simplex 2	HSV1/HSV2	2E-6G	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Treponema pallidum</i>	TP	4G-8G	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NG	4E-8E	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovars A-K)**	CT-S1 + CT-S2	2G-6A-3H-7B	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovars L1-L3)	CT-S2	3H-7B	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
<i>Chlamydia trachomatis</i> **	pcCT	4I-8I	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	F -- /1D-5G
Amostra Negativa	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	1D-5G
Amostra Negativa	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	-- /1C-5F	-- /1D-5G
Resultados Inválidos	--	--	1A-1B-2I-5E-8A	--	--
Erro de Hibridização	--	--	--	--	--

NOTA: A identificação do *Herpes Simplex vírus 1* é obtida quando, simultaneamente, os sinais de hibridização da sonda HSV-1/HSV-2 (posições 2E-6G) e da sonda HSV-1 (posições 3F-7H) ocorrerem no chip IST. Quando apenas o sinal de hibridização da sonda HSV-1/HSV-2 (posições 2E-6G) ocorre, ele corresponde ao vírus *Herpes simplex 2*. As co-infecções dos dois tipos de vírus *Herpes simplex 1* e 2 mostram o mesmo padrão como uma infecção pelo vírus *Herpes simplex 1* (2E-6G-3F-7H). Situações reais nas quais apenas o sinal da sonda HSV-1 no chip IST não são considerados.

NOTA: Pelo menos um sinal positivo para a sonda pcCT (posições 4I-8I) deve aparecer em uma amostra positiva para CT. Quando apenas se detecta positividade para a sonda pcCT (posições 4I-8I), não é possível discriminar a sorovar de *Chlamydia trachomatis*. A identificação positiva das sorovares A-K da espécie *Chlamydia trachomatis* é obtida quando há positividade para as três sondas pcCT (posições 4I-8I), CT-S1 (posições 2G-6A) e CT-S2 (3H-7B) no chip IST. Quando apenas os sinais correspondentes às sondas pcCT (posições 4I-8I) e CT-S2 (posições 3H-7B) estão presentes, a identificação corresponde às sorovares L1-L3 da mesma espécie. Não são contempladas situações reais nas quais as sondas pcCT (posições 4I-8I) e CT-S1 dão positividade no chip IST.

11. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

Para o usuário dos kits 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, é essencial para que a detecção do ácido nucleico dos patógenos seja precisa e reprodutível. A determinação do ácido nucleico destes patógenos em uma amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os resultados obtidos com os kits XGEN MULTI IST 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

Para estabelecer a sensibilidade analítica do kit XGEN MULTI IST CHIP, foram utilizados oligonucleotídeos sintéticos de DNA fita dupla contendo regiões alvo e regiões específicas de cada um dos patógenos incluídos no painel. A determinação do número mínimo de cópias detectadas (limite de detecção do kit, LoD) para cada um dos patógenos foi realizada por amplificação e subsequente hibridização e análise com o software *HybriSoft (Vitro SA)*, a partir de várias diluições seriadas em tampão TE de cada um dos genes sintéticos. Foram realizadas 12 réplicas de cada uma das concentrações dos genes sintéticos.

Os testes (PCRs) foram hibridizados usando a plataforma *HybriSpot 12* e as imagens resultantes de cada uma das réplicas foram analisadas com o software *HybriSoft* usando um ponto de corte de positividade de 4.

ALVO	SONDAS	N° CÓPIAS/ REAÇÃO	POSITIVOS/ TESTADOS	SENSIBILIDADE (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95% (%)	ESPECIFICIDADE (%)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95% (%)
<i>M. genitalium</i>	MG	50	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>M. hominis</i>	MH	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>U. urealyticum/ U. parvum</i>	UU-P	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>N. gonorrhoeae</i>	NG	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>T. vaginalis</i>	TV	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
HSV 1	HSV- 1/HSV-2 + HSV-1	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
HSV 2	HSV1/HS V-2	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>T. pallidum</i>	TP	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>H. ducreyi</i>	HD	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>C. trachomatis</i>	CT-S1 + CT-S2	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>C. trachomatis</i>	CT-S2	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%
<i>C. trachomatis</i>	CT-S2	10	12/12	100%	69,87 - 100%	100%	98,10 - 100%

12.2 ESPECIFICIDADE

O ensaio começou com 10^6 cópias/reação de DNA sintético projetado para cada marcador. Não foram observadas reações cruzadas entre os genes incluídos no teste.

ALVO	ESPECIFICIDADE
<i>M. genitalium</i>	100%
<i>M. hominis</i>	100%
<i>U. urealyticum/parvum</i>	100%
<i>N. gonorrhoeae</i>	100%
<i>T. vaginalis</i>	100%
HSV-1	100%
HSV-2	100%
<i>T. pallidum</i>	100%
<i>H. ducreyi</i>	100%
<i>C. trachomatis</i>	100%

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

12.4 PRECISÃO

12.4.1 REPETIBILIDADE

A repetibilidade do método foi analisada utilizando fragmento de DNA sintético de cada um dos alvos específicos dos patógenos do painel. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de DNA sintético e de cada uma delas, foram obtidas pelo menos seis réplicas. O teste foi realizado pelo mesmo operador, em um único local e utilizando o mesmo lote de reagentes.

ALVO	Nº CÓPIAS/REAÇÃO	POSITIVOS/REALIZADOS	% POSITIVOS
<i>M. genitalium</i>	50	6/6	100%
<i>M. hominis</i>	10	6/6	100%
<i>U. urealyticum/parvum</i>	10	6/6	100%
<i>N. gonorrhoeae</i>	10	6/6	100%
<i>T. vaginalis</i>	10	6/6	100%
HSV-1	10	7/7	100%
HSV-2	10	7/7	100%
<i>T. pallidum</i>	10	7/7	100%
<i>H. ducreyi</i>	10	6/6	100%
<i>C. trachomatis</i> (sorovares L1-L3)	10	6/6	100%
<i>C. trachomatis</i> (sorovares A-K)	10	6/6	100%

13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

15. REQUISITOS

Para uso por profissionais com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
Ausência de Sinal/ 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. 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 destruídas 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.	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.
Presença de precipitados cromogênicos no chip após o protocolo de hibridização	Alto conteúdo de células e/ou sangue na amostra.	Repetir a PCR diluindo a amostra inicial
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. Repetir o ensaio.
	Volume de amostra utilizado para ressuspender a 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.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

- 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.
- 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.
- 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.
- 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:

- Os kits XGEN MULTI IST CHIP são 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 EXTIÇÃO 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

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

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

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070086