



Instruções de Uso

XGEN MULTI MV

Kit MULTIPLEX para Detecção de Vírus Causadores de Meningite

1. USO PRETENDIDO

O Kit **MULTIPLEX MENINGITE VIRAL** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa de ácido nucleico viral em amostras de líquido cefalorraquidiano, sangue total, swab de garganta e fezes como auxílio para a avaliação de infecções pelo vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-Zoster, Enterovírus, Parechovírus humano e vírus da Parotidite (caxumba).

O kit foi otimizado para uso nos aparelhos de PCR em Tempo Real ABI 7500 (*Software Sequence Detection System*® Applied Biosystems™).

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*

2. INTRODUÇÃO

A meningite é um processo inflamatório das meninges, membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal. O quadro clínico caracteriza-se por febre, cefaléia, náusea, vômito, rigidez de nuca. Em geral, as meningites virais não estão associadas a complicações, a não ser que o indivíduo seja portador de alguma imunodeficiência.

A doença pode ser causada por diversos agentes infecciosos, entre eles os vírus. As Meningites Virais são também chamadas meningites assépticas ou serosas. Entre os principais vírus que podem causar meningite estão vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-zoster, Enterovírus, Parechovírus humano e vírus da Parotidite (caxumba).

No Brasil, a meningite é considerada uma doença endêmica, deste modo, casos da doença são esperados ao longo de todo o ano, com a ocorrência de

surtos e epidemias ocasionais, sendo mais comum a ocorrência das meningites virais no verão.

Os **Vírus herpes simplex** são vírus grandes, de cadeia dupla de DNA. O *vírus herpes simplex tipo 1* (HSV1) e *vírus herpes simplex tipo 2* (HSV2) podem causar meningite em crianças, especialmente de até 8 meses. O vírus Varicela-zoster (VZV) também pode causar meningite, porém somente em pacientes imunodeprimidos.

Os **Enterovírus** (EV) são a causa mais comum de meningite viral. Os vírus são pequenos, contêm cadeia simples de RNA, não possuem envelope e são responsáveis por mais de 75% dos casos da doença. Nesse grupo, destacam-se os *Echovirus*, os *Poliovirus* e os *Coxsackievirus* (Grupos A e B). As lactentes são mais suscetíveis e a reinfecção pode ocorrer por sorotipos diferentes. A duração da doença geralmente é menor que uma semana.

O **Vírus da Parotidite (caxumba)** (MV) é um vírus envelopado grande, de cadeia simples de RNA e altamente neurotrópico. A principal doença causada pelo vírus é a caxumba, sendo assintomática em 20% dos casos. Em casos mais graves, pode haver complicações e resultar em quadro de meningite. Após a introdução de programas de vacinação, houve queda drástica nos número de meningite associadas ao MV. Dessa forma, esse agente é comum somente em população não imunizada.

O **Parechovírus humano** (HPEV) é um vírus de cadeia simples de RNA, não envelopado. As infecções por HPEV são predominantes em crianças menores de 3 anos e estão associadas com doenças semelhantes às causadas por EV. A maioria das infecções ocorre durante o primeiro ano de vida, sem sintomas clínicos relevantes. O HPEV 3 é o principal subtipo relacionado a quadros de meningite.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O ácido nucleico viral é amplificado pela reação em cadeia de polimerase (PCR) por *primers* específicos. A detecção do produto de PCR é realizada através de uma sonda molecular duplamente marcada específica para cada agente patogênico dentro da PCR MULTIPLEX. A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, e é relatado como o valor limiar de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real. O ensaio utiliza o Vírus do Mosaico do Capim Bromo (BMV) como controle de extração - Controle Interno (CI), adicionado a cada amostra e ao controle negativo no estágio de tampão de lise do processo de extração.

Especificidade HSV1	100% para <i>vírus herpes simplex tipo 1</i>
Especificidade HSV2	100% para <i>vírus herpes simplex tipo 2</i>
Especificidade VZV	100% para Varicela-zoster
Especificidade MV	100% para Vírus da Parotidite (caxumba)
Especificidade HPeV	100% para Parechovírus humano
Especificidade EV	100% para Enterovírus
Sensibilidade (LOD) HSV1	10 ⁴ cópias/mL com probabilidade de 95%
Sensibilidade (LOD) HSV2	10 ⁴ cópias/mL com probabilidade de 95%
Sensibilidade (LOD) VZV	10 ⁴ cópias/mL com probabilidade de 95%
Sensibilidade (LOD) MV	10 ⁴ cópias/mL com probabilidade de 95%
Sensibilidade (LOD) HPeV	2 X 10 ⁵ cópias/mL com probabilidade de 100%
Sensibilidade (LOD) EV	3,2 X 10 ⁴ cópias/mL com probabilidade de 100%

4. COMPONENTES

O formato padrão do kit contém reagentes para 64 testes.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE
EZ MV	Solução de Enzima e dNTPS	2 x 64 µL
TAMPÃO MV	Mistura de Tampão	2 x 800 µL
PS MV 1	Mistura de Primers e Sondas para HSV1, HSV2, MV e VZV	2 x 48 µL
PS MV 2	Mistura de Primers e Sondas para EV, HPeV e Controle Interno	2 x 48 µL
CP MV	Controle Positivo Contendo Plasmídeos para a Detecção de HSV1, HSV2, EV, HPeV, MV e VZV	2 x 300 µL
CI MV	Controle Interno	2 x 128 µL
CN	Controle Negativo	4 x 1.000 µL

* Cada frasco contém um volume adicional para imprecisão de pipetagem.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Os componentes do kit devem ser armazenados na embalagem original à temperatura de -20°C e são estáveis até a data de vencimento indicada no rótulo. O produto é fornecido em embalagens com gelo seco que devem garantir uma temperatura de transporte abaixo de -20°C (satisfatória de acordo com os estudos de estabilidade). Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser evitado o congelamento e o descongelamento dos reagentes por mais de nove vezes, pois pode reduzir a sensibilidade do ensaio.

Recomenda-se realizar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS.

- ✓ Micropipetas calibradas (0,5 µL < volume < 200 µL);
- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Racks para tubos;



- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livres de nuclease;
- ✓ Microplacas de PCR, recomendados pelo fabricante do equipamento de PCR em Tempo Real;
- ✓ Filme selador;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real;
- ✓ Agitador tipo *Vortex* ou similar.

7. AVISOS E PRECAUÇÕES

1. O kit deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
2. O pessoal técnico deve ser profundamente treinado no uso dos termocicladores em Tempo Real, na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
3. Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. O uso de objetos perfuro-cortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
4. 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.
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 a -20°C , em um freezer ou câmara fria com temperatura controlada.

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 limpos e não contêm partículas visíveis pesadas ou grumos. 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 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. Realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes no gelo ou em reservatório refrigerado.

16. O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, começando na área de extração 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.

17. 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.

18. 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.

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.

20. Outros resíduos gerados (exemplo: ponteiras usadas para amostras) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.

8. AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

O ensaio deve ser realizado com ácido nucleico extraído de amostras líquido de cefalorraquidiano (LCR). Para Enterovírus e Parechovírus amostras de LCR são utilizadas frequentemente. Na maioria dos casos de meningite amostras de sangue podem ser positivas. Para o Vírus da Parotidite (caxumba) a amostra ideal para o testes é o *swab* de garganta. Para longos períodos de armazenamento recomenda-se que todas as amostras fiquem a -20°C até a extração.

ATENÇÃO: Amostras de pacientes heparinizados não devem ser utilizadas, uma vez que a heparina é substância interferente na reação de PCR.

OBSERVAÇÃO IMPORTANTE: Para utilização do kit com outras amostras deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

9. PREPARAÇÃO DOS COMPONENTES E AVISOS

Solução de Enzima e dNTPs - EZ MV

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

Solução Tampão - TAMPÃO MV

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

Primers e Sondas - PS MV

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

Controle Positivo - CP

Solução pronta para uso.

Não extrair o Controle Positivo, uma vez que a solução é constituída por plasmídeos e a reação será inibida.

Controle Negativo - CN

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

Controle Interno - CI

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

Na extração, para volume de eluição de 55 µL, recomenda-se adicionar 2 µL do Controle Interno ao tampão de lise em cada extração. Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra, ao menos que esteja diluída no tampão de lise. Caso seja utilizado volume de eluição diferente do descrito acima, adicionar o volume de Controle Interno proporcional.

ELUIÇÃO	CI
50 µL a 65 µL	2 µL
66 µL a 90 µL	3 µL
100 µL	4 µL

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

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS USADOS EM COMBINAÇÃO COM O KIT

1. Micropipetas

As micropipetas devem ser calibradas para dispensar o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a descontaminações regulares 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 uma exatidão de $\pm 5\%$.

2. Termociclador em Tempo Real

O **Kit XGEN MULTI MV** é direcionado para uso em combinação somente com o Termociclador ABI 7500 (*Software Sequence Detection System*[®], Applied Biosystems[™]).

Os usuários finais devem seguir estritamente a instrução de uso fornecida pelo fabricante.

Para utilização do kit em outros equipamentos deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

11. CONTROLE PRÉ-ENSAIO E OPERAÇÕES

1. Verificar a data de validade do kit impresso na etiqueta externa da caixa.
2. Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis a olho nu ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
3. Ligar os termocicladores e verificar as configurações e tenha certeza de usar o protocolo de ensaio correto.
4. Seguir estritamente o manual de equipamentos fornecidos pelo fabricante para a correta configuração dos termocicladores em Tempo Real.
5. Verificar se as micropipetas estão configuradas para o volume necessário.
6. Verificar se todos os outros equipamentos estão prontos para uso.
7. Em caso de problemas, não continuar o teste e comunicar ao supervisor.

12. PROTOCOLO

IMPORTANTE: Um exemplo de gabarito para dispensação dos reagentes é informado no item Gabarito do Teste. Favor consultar o item antes de iniciar o procedimento prático.

ATENÇÃO: Utilizar somente microplacas recomendadas pelo fabricante do termociclador em Tempo Real.

CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de Controle Negativo e Controle Positivo.

PREPARAÇÃO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

# Reações Componente	x 1	x 16	x 32	x 64
TAMPÃO MV	12,5 µL	200 µL	400 µL	800 µL
PS MV 1 ou PS MV 2	1,5 µL	24 µL	48 µL	96 µL
EZ MV	1 µL	16 µL	32 µL	64 µL
Volume Total	15 µL	240 µL	480 µL	960 µL

Tabela 1. Quantidade de Reagente Necessária para Número de Reações Especificado.

- Separar dois microtubos de 1,5 mL (não fornecidos) para preparar as misturas de amplificação.
- Descongelar os reagentes para a reação: PS MV 1, PS MV 2, Controle Positivo (CP) e TAMPÃO MV. Homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso). O CP deve ser descongelado em temperatura ambiente por 20-30 minutos e homogeneizado completamente antes do uso. Certificar-se de manter a EZ MV no freezer ou em bloco de refrigeração o tempo todo.
- Pipetar a quantidade requerida de TAMPÃO MV dentro dos dois microtubos. Trocar as ponteiros após cada passo de pipetagem.
- Pipetar a quantidade requerida de PS MV 1 e EZ MV dentro do primeiro microtubo.

- Pipetar a quantidade requerida de PS MV 2 e EZ MV dentro do segundo microtubo.
- Homogeneizar as misturas de amplificação em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).
- Certificar-se de congelar os volumes restantes dos reagentes não utilizados logo após a utilização.

PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

1. Dispensar 15 µL da mistura de amplificação (TAMPÃO MV + PS MV 1 ou PS MV 2 + EZ MV) em cada poço da microplaca.
2. Homogeneizar e adicionar 10 µL de cada amostra extraída, do Controle Negativo extraído e do Controle Positivo. Fechar a placa com filme adesivo óptico.
3. Homogeneizar a placa em *vortex* e centrifugar brevemente.
4. Colocar a placa no equipamento.
5. Após configurar as operações descritas no subitem "Programação da PCR", iniciar a corrida no termociclador.

Programação da PCR

A programação deve ser feita conforme descrito abaixo.

Etapa	Temperatura	Tempo	# Ciclos
Hold	50°C	15 min.	1
Hold	94°C	1 min.	1
Ciclo PCR	94°C	8 seg.	40
(*Coleta de Dados)	60°C (*)	1 min.	

AVISO: Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Seleção de Detectores

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

Primers e Sondas	Patógeno	Corante	Reporter
PS MV 1	HSV1	Verde	FAM
	HSV2	Amarelo	VIC
	MV	Laranja	ROX
	VZV	Vermelho	CY5
PS MV 2	EV	Verde	FAM
	HPeV	Amarelo	VIC
	BMV (CI)	Laranja	ROX

13. GABARITO DE TESTE

Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e controles para a análise com o kit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1 ₁	A2 ₁	A3 ₁	A4 ₁	A5 ₁	A6 ₁	A7 ₁	A8 ₁	A9 ₁	A10 ₁	A11 ₁	A12 ₁
B	A1 ₂	A2 ₂	A3 ₂	A4 ₂	A5 ₂	A6 ₂	A7 ₂	A8 ₂	A9 ₂	A10 ₂	A11 ₂	A12 ₂
C	CP	CN										
D	CP	CN										
E												
F												
G												
H												

LEGENDA:

A1 – A12 = Amostras

CP = Controle Positivo

CN = Controle Negativo

FUNDO AMARELO 1 = Mistura de Amplificação (TAMPÃO MV + PS MV1 + EZ MV)

FUNDO AMARELO 2 = Mistura de Amplificação (TAMPÃO MV + PS MV2 + EZ MV)

14. PROGRAMAÇÃO DO EQUIPAMENTO

Ligar o equipamento ABI® 7500 e posteriormente ligar o computador.



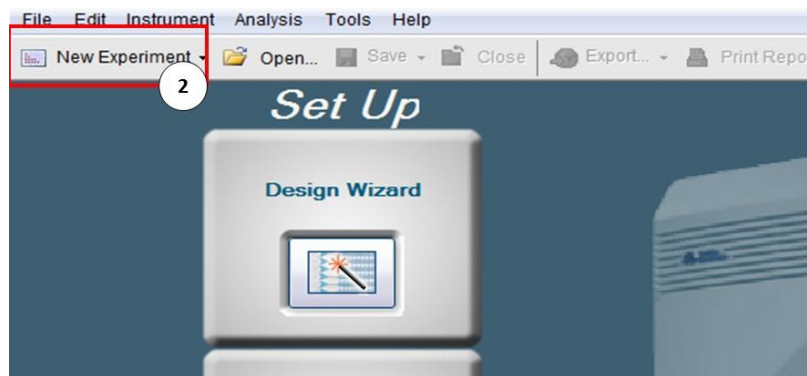
COMO CONFIGURAR UMA CORRIDA NO ABI 7500:

Se utilizar o equipamento ABI® 7500 Fast, NÃO utilizar o programa rápido.

1. Na área de trabalho, clicar no ícone do software ABI® 7500 para iniciar o programa.



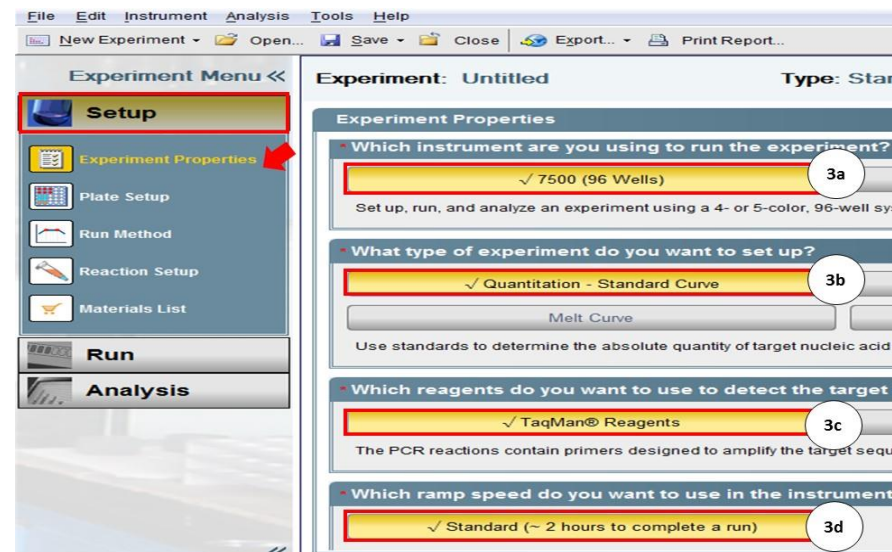
2. No menu superior, escolher a opção: “New Experiment”.



3. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Experiment Properties”:

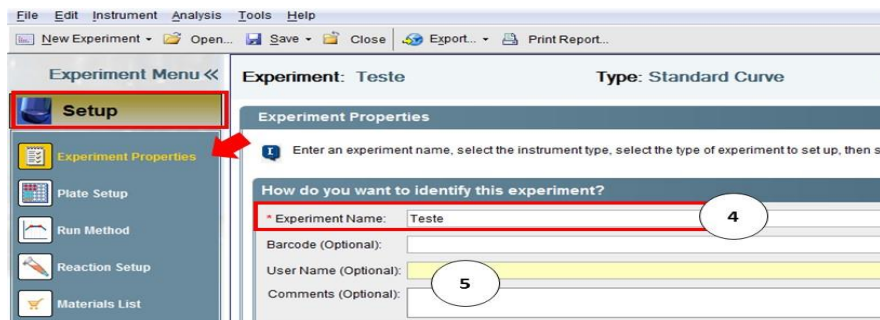
As seguintes opções devem ser selecionadas:

- a) Instrumento: “7500 (96 Wells)”.
- b) Tipo de experimento: “Quantitation – Standard Curve”.
- c) Tipo de reagente: “TaqMan® Reagents”.
- d) Rampa de velocidade: “Standard (~2 hours to complete a run)”.



4. Editar “Experiment Name” = Nome de experimento.

5. É opcional inserir código de barras, nome de usuário e comentários.



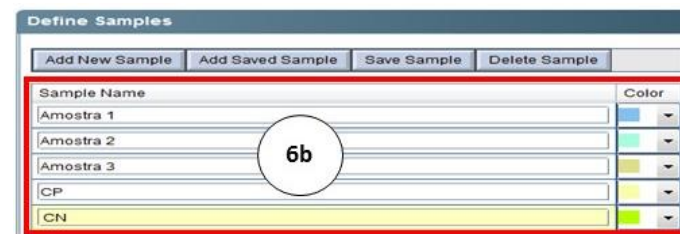
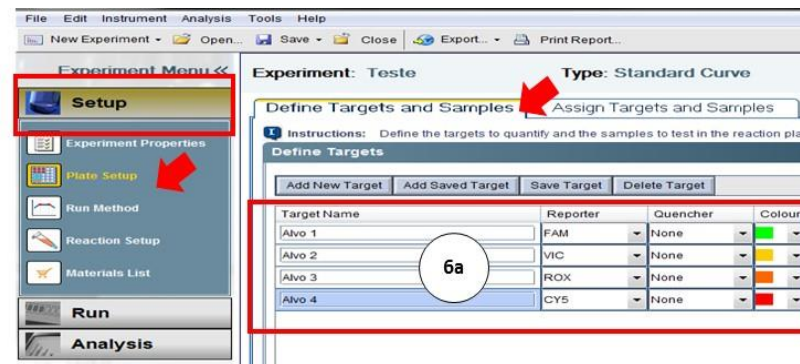
6. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Plate Setup”. Na aba “Define Targets and Samples” definir alvos e amostras:

a) Definir os alvos: alterar nome em “Target name”, selecionar o “Reporter”, selecionar o “Quencher” conforme Item 12 – Seleção de Detectores.

Para inserir novo alvo, clicar em “Add New Target”.

NOTA: recomenda-se a aplicação de cores próprias para cada repórter. (FAM= verde; ROX= laranja; VIC= amarelo; Cy5= vermelho).

b. Nomear as amostras conforme o mapa de trabalho.

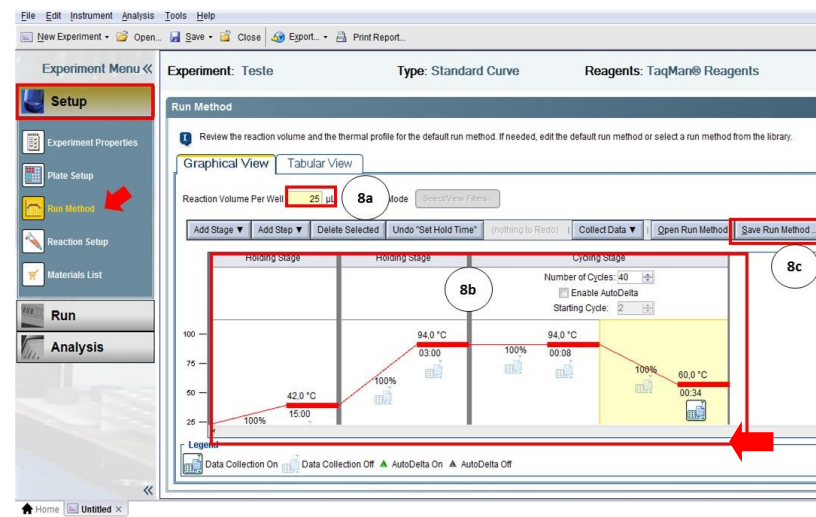
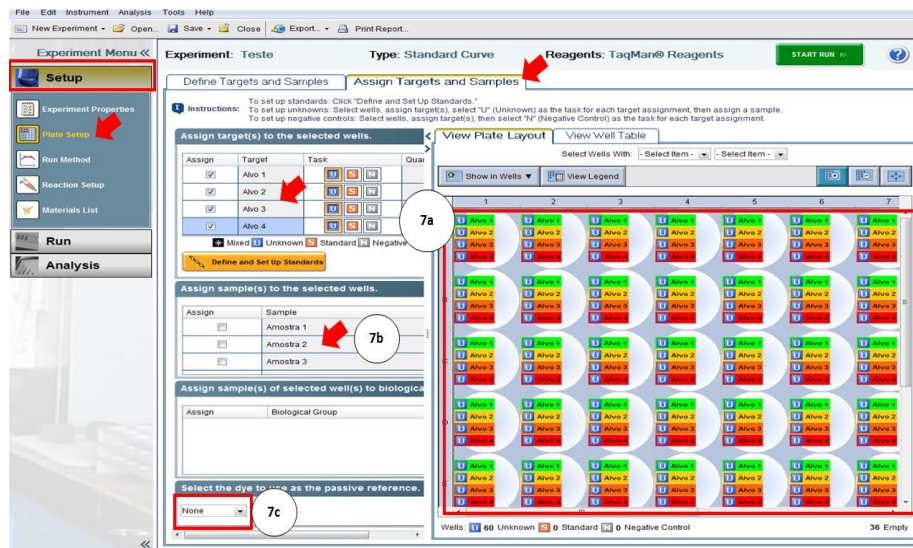


7. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Plate Setup”. Na aba “Assign Targets and Samples” especificar os alvos e amostras:

a) Escolher os poços da placa e selecionar os alvos correspondentes ao teste.

b) Nomear as amostras escolhendo o poço e nome da amostra.

c) Selecionar a referência passiva para “None”.



IMPORTANTE: A coleta de dados deve estar selecionada corretamente na etapa final de amplificação (“Data Collectin On”).

8. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Run Method” e configurar o programa de amplificação:

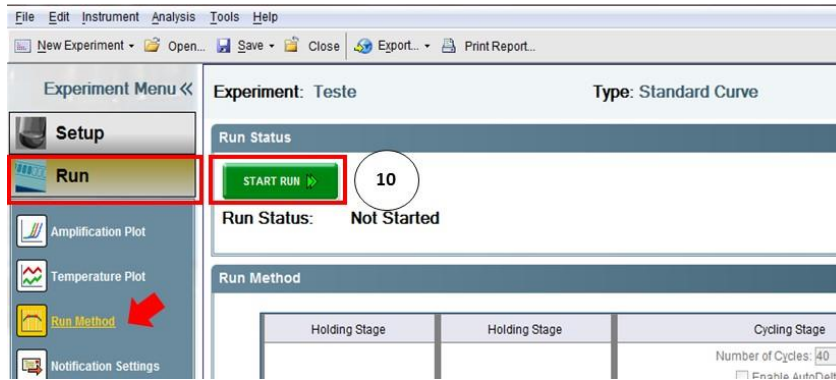
- Alterar “Reaction Volume Per Well” = volume de reação por poço (25 µl).
- Modificar diferentes fases/temperaturas/tempos conforme protocolo Item 12 – Programação da PCR.
- Pressionar “Save Run Method” e inserir um nome. Pressionar “Save”.

(Na próxima corrida de PCR, o programa da corrida estará salvo em “Open Run Method”).

9. Abrir o equipamento ABI® 7500 e colocar a microplaca.



10. Fechar o termociclador e no menu esquerdo, escolher a opção “Run” > “Run Method”. Pressionar “Start Run”. Então, salvar a corrida em uma pasta definida.



Ao final do protocolo, desligar o equipamento ABI® 7500 caso não seja mais utilizado no dia.

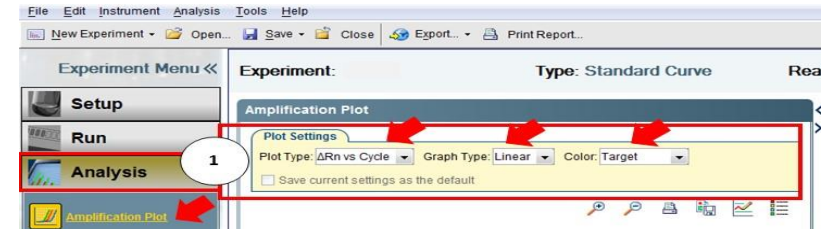
15. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

15.1 Configurações Pré-Análise no ABI 7500:

Os parâmetros *baseline* e *threshold* devem ser configurados para correta análise dos resultados.

Selecionar o experimento para análise:

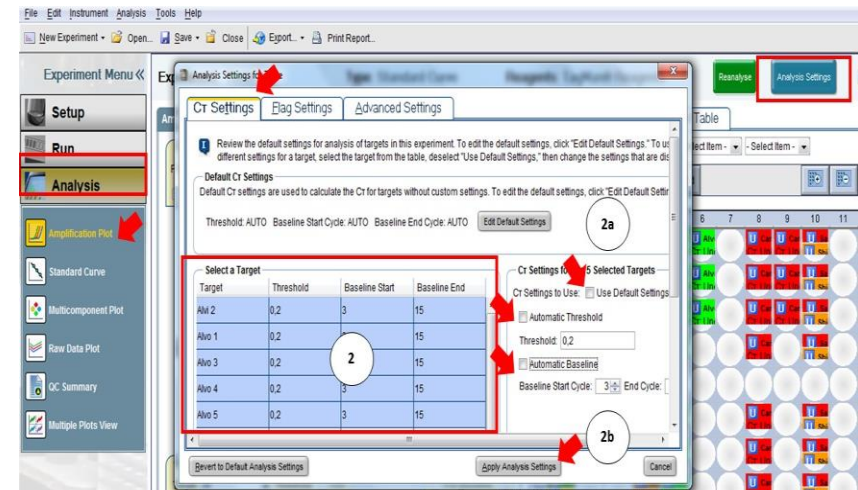
1. No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. Selecionar no campo “Plot Settings” as seguintes opções: “ ΔRn vs Cycle”, “Linear” e “Target”.



2. Para iniciar os ajustes dos parâmetros de análise, selecionar o ícone “Analysis Settings”. Na aba “Ct Settings” no campo “Select a Target” selecionar todos os alvos do teste:

a) Desmarcar “Use Default Settings, Automatic Threshold e Automatic Baseline”.

b) Clicar em “Apply Analysis Settings”.



15.2 Validação da Corrida no ABI 7500

Após configuração de *threshold* e *baseline*, no menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. Checar em “View Plate Layout” ou em “View Well Table” o Ct do(s) Controle(s) Positivo(s), Negativo(s) e Internos.

Validar a corrida como descrito na tabela abaixo:

ABI SDS 7500			
Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado do Ensaio
Controle Negativo	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct < 33 ⁽³⁾	Válido
	Ct Determinado/Detectado ⁽¹⁾	Ct < 33 ⁽³⁾	Inválido
	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct > 33	Inválido
Controle Positivo	Ct < 33 ^(2,4)	Ct Indeterminado/Não detectado	Válido
	Ct > 33 ^(2,4)	Ct Indeterminado/Não detectado	Inválido

NOTA:

¹ Se existir potencial contaminação (aparecimento de curva de amplificação ou conjunto de curvas em amostras com alto Ct, por exemplo, acima de 36) na amostra Controle Negativo, os resultados obtidos não são interpretáveis e toda a corrida (incluindo extração) deve ser repetida.

² Verificar o traço do "componente" antes de aceitar o traço exponencial como verdadeiro. Os Controles Positivos e qualquer amostra positiva irá mostrar um traçado de fluorescência exponencial. Qualquer amostra exibindo um traço exponencial é considerada como positiva.

³ Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (ou seja, exponencial) de amplificação. Se o Controle Interno apresentar Ct acima de 33, isso aponta para problema de purificação ou amostra fortemente positiva, causando a inibição do Controle Interno.

⁴ As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

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

15.3 Análise das Amostras Clínicas no ABI 7500

O usuário deve realizar uma análise cuidadosa no gráfico “Amplification Plot” e “Multicomponent Plot” em cada amostra e para todos os alvos após os parâmetros serem configurados, para confirmar a presença ou ausência do traço exponencial.

Analisar os resultados das amostras como descrito na tabela abaixo:

a) Amostras positivas válidas

Critério	Alvos		Controle Interno	Resultado
	Ct	Fluorescência	Ct	
Amostra	Ct < 35 Para Enterovírus (1,3)	>75.000	Ct < 33 (2)	Amostra Positiva Válida
	Ct < 34 Para Parechovírus humano (1,3)	>100.000		
	Ct < 35 Para Vírus Herpes Simplex tipo 1 (1,3)	>300.000		
	Ct < 36 Para Vírus Herpes Simplex tipo 2 (1,3)	>150.000		
	Ct < 36 Para Vírus Varicela-Zoster (1,3)	>150.000		
	Ct < 37 Para Vírus da Parotidite (caxumba) (1,3)	>150.000		

b) Amostras negativas válidas

Critério	Alvos		Controle Interno	Resultado
	Ct		Ct	
Amostra	Ct Indeterminado/ Não detectado Para patógenos: Vírus herpes simplex tipo 1 e 2, vírus Varicela-Zoster, Parechovírus humano, Vírus da Parotidite (caxumba) e Enterovírus.		Ct < 33 (2)	Amostra Negativa Válida (4)
	Ct > 35 Para Enterovírus (1,3)			
	Ct > 34 Para Parechovírus humano (1,3)		Ct < 33 (2)	Amostra Negativa Válida (4,5)
	Ct > 35 Para Vírus Herpes Simplex tipo 1 (1,3)			
	Ct > 36 Para Vírus Herpes Simplex tipo 2 (1,3)			
	Ct > 36 Para Vírus Varicela-Zoster (1,3)			
	Ct > 37 Para Vírus da Parotidite (1,3)			

c) Amostras inválidas

Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado
	Ct	Ct	
Amostra	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct Indeterminado/ Não detectado	Amostra Inválida

NOTA:

1 Verificar o traço do "componente" antes de aceitar o traço exponencial como verdadeiro. Os Controles Positivos e qualquer amostra positiva irá mostrar um traçado de fluorescência exponencial.

2 Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (ou seja, exponencial) de amplificação. Se o Controle Interno apresentar Ct acima de 33, isso aponta para problema de purificação ou amostra fortemente positiva, causando a inibição do Controle Interno.

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

4 O resultado negativo pode ser devido a ausência do alvo na amostra, presença de uma quantidade de cópias abaixo do limite de detecção do kit, ou presença de amplificações inespecíficas inerentes a técnica de PCR.

IMPORTANTE:

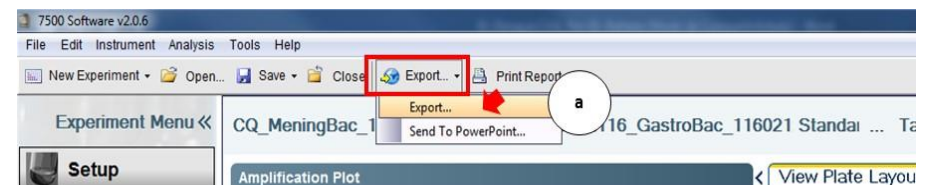
***Os valores de Ct e fluorescência mencionadas na tabela se aplicam apenas para uso nos equipamentos ABI 7500.**

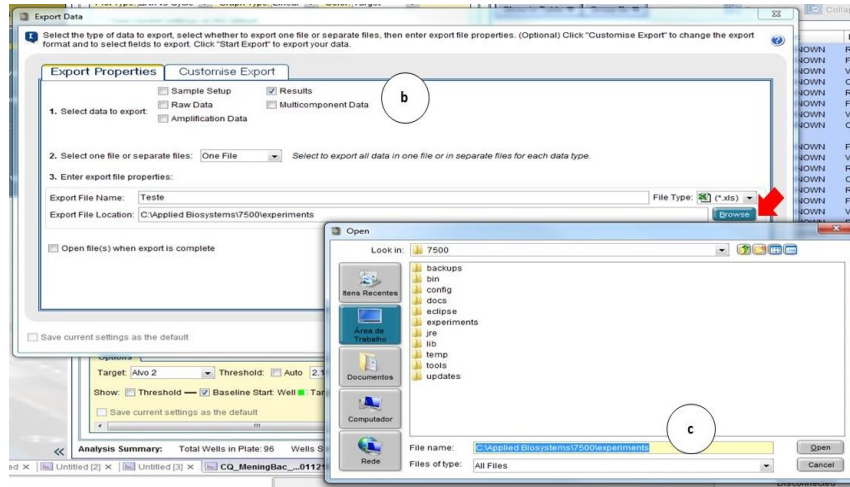
****Amostras dúbias próximo ao Ct de corte (+/- 1Ct) que apresentem um valor de fluorescência alto (acima dos valores considerados como positivos válidos), recomenda-se a repetição**

*****Se após ajuste dos thresholds permanecerem amostras positivas válidas dúbias (alvo com amplificação tardia e/ou curva de amplificação não definida, sendo confundida com ruído), verificar Item 15.4 para melhor interpretação do resultado.**

Após análise, para registro dos resultados, o usuário pode exportar os dados em planilha excel.

- a) No menu superior, selecionar a opção "Export" > "Export".
- b) Selecionar as opções na tela "Export Data" conforme preferências.
- c) Em "Browse" indicar a pasta escolhida para salvar o arquivo.





15.4 Análise Diferencial dos Resultados Positivos

No mix PS MV 1 um forte sinal positivo para Herpes simplex 2 (VIC) pode levar ao aparecimento de um sinal fraco não-específico para o vírus da Caxumba (ROX). Levar em consideração essa informação ao interpretar os resultados dos testes.

15.5 Interpretação de Amostra dúbia:

Para verificar a veracidade da curva do alvo dúbio, as telas “Amplification Plot”, “Multicomponent Plot” e “Raw Data Plot” do menu esquerdo “Analysis” poderão ser analisadas.

Após esclarecer o resultado das amostras dúbias, o usuário deve realizar o ajuste de *threshold* para adequação dos valores de Ct, positivando

(abaixando o *threshold*) ou negativando (subindo o *threshold*) as amostras que foram analisadas.

Se após estas verificações, o resultado ainda ficar duvidoso, repetir a amostra de preferência com nova extração.

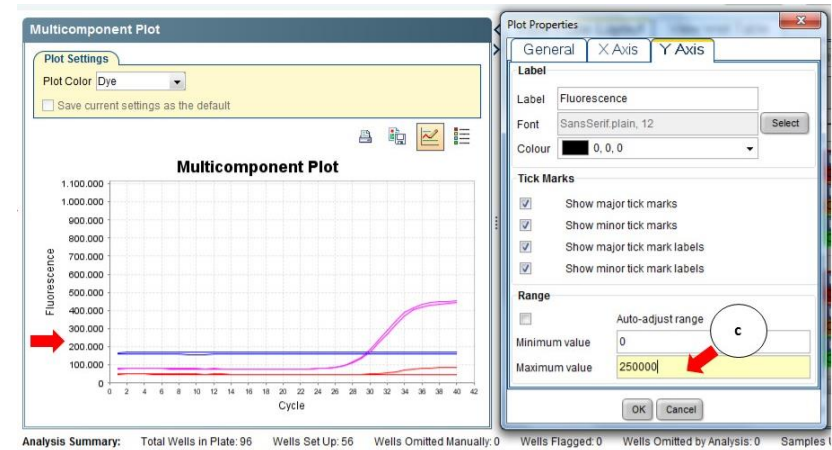
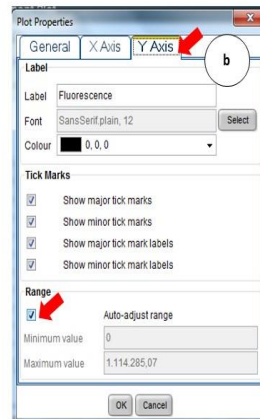
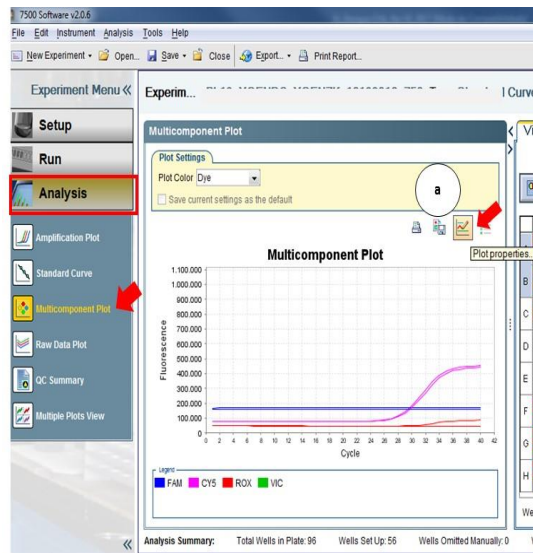
1. Análise na tela **“Amplification Plot”**: ajustar o baseline inicial para normalização do ruído.

No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. No campo “Options” escolher o “Target” (alvo) dúbio, então iniciar o ajuste manual do baseline inicial. A placa inteira deverá estar selecionada para este ajuste.

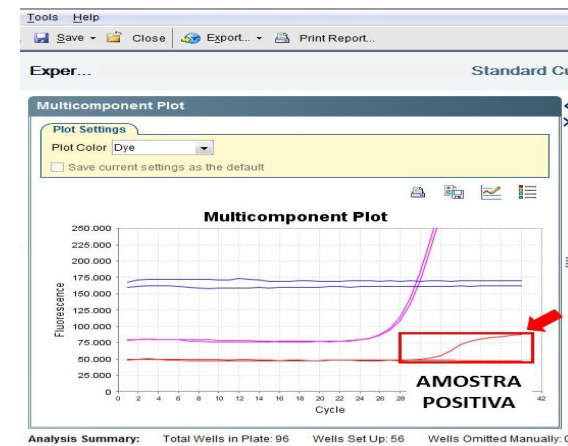
- a) Selecionar a opção “Baseline Start”.
- b) Arrastar a flecha verde com o *mouse* no plot de amplificação de modo que haja a compactação do ruído nos ciclos finais de amplificação. Esse ajuste deve ser mantido apenas se houver compactação do ruído.
- c) Após o ajuste do baseline, realizar a análise do “Multicomponent Plot”.

Se necessário, para melhor visualização, alterar a escala do gráfico.

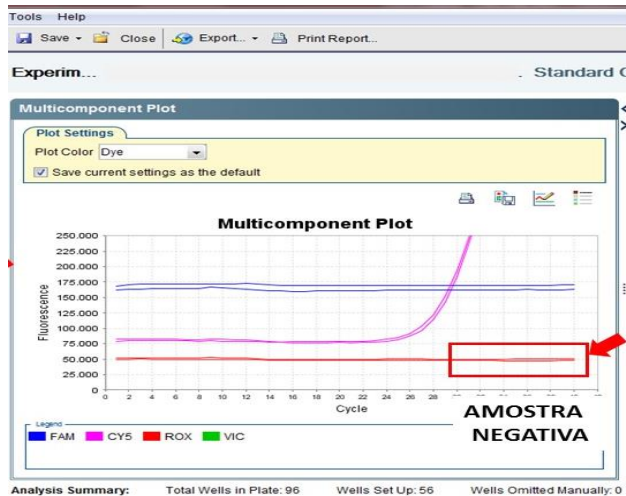
- Em "Multicomponent Plot", selecionar "Plot properties"
- Selecionar a aba "Y Axis". Desmarcar a opção "Auto-adjust range".
- No campo "Maximum value" adicionar um valor contido no eixo y que permita a maximização (zoom) da curva do alvo de interesse (adicionar apenas números e nenhum outro caracter).



Exemplo de amostra positiva:



Exemplo de amostra negativa:

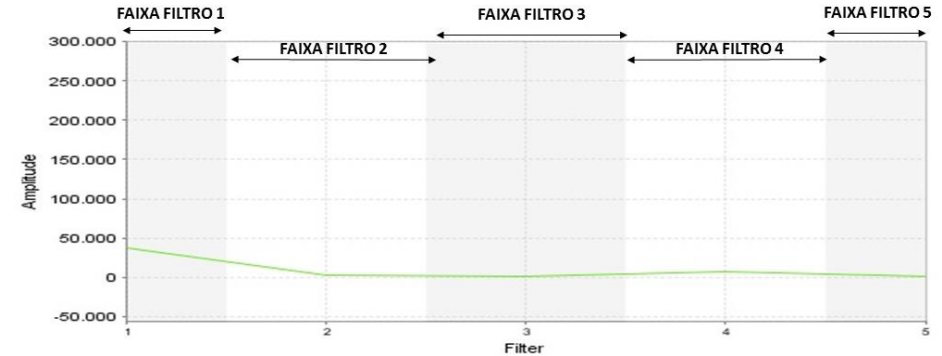


Se a análise do “Multicomponent Plot” não for suficiente para esclarecer a dúvida, analisar a tela “Raw Data Plot”.

3. **Análise na tela “Raw Data Plot”:** analisar a fluorescência não normalizada de cada filtro óptico durante a amplificação. Na tabela abaixo, segue as correspondências de corante e filtros:

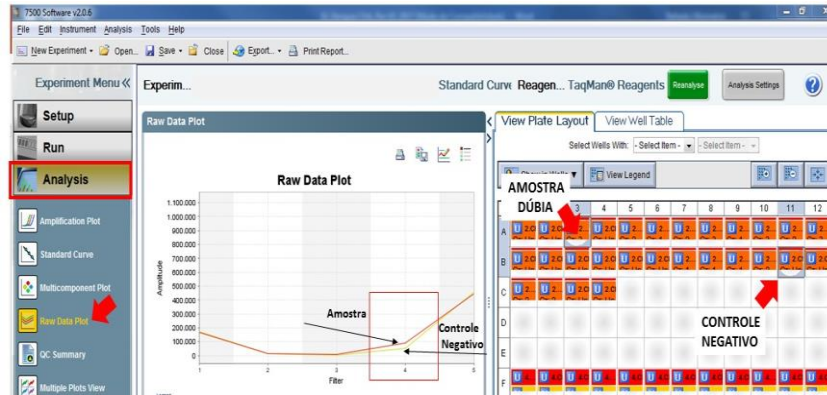
Filtro	1	2	3	4	5
Corante	FAM	VIC	---	ROX	Cy5

Para a análise do dado dúbio verificar o quadrante referente ao filtro alvo.



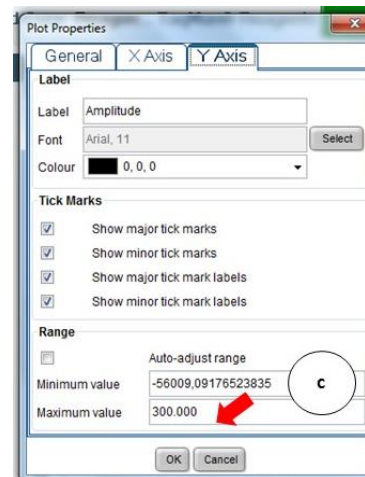
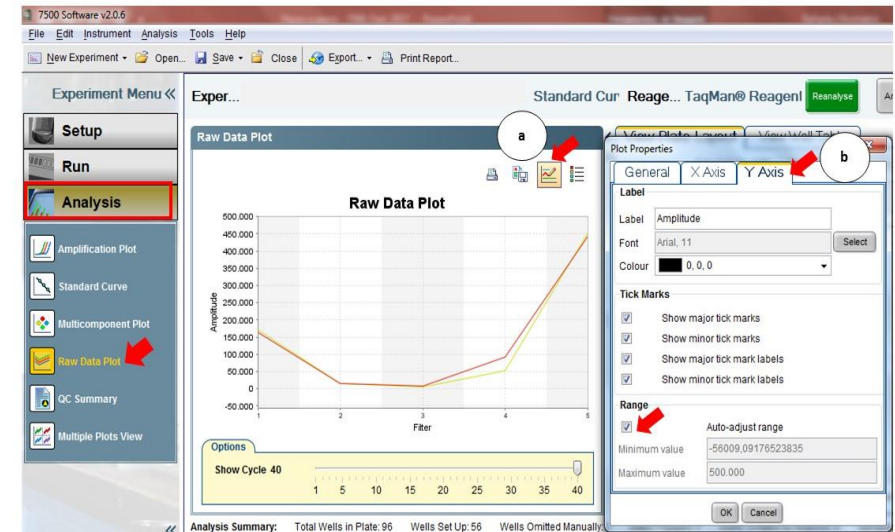
No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Raw Data Plot”. A amostra dúbia e o controle negativo deverão estar selecionados para comparação da fluorescência no filtro específico.

- Amostra positiva: apresenta linha de fluorescência acima da linha do controle negativo.
- Amostra negativa: apresenta mesmo perfil de fluorescência do controle negativo ou linha de fluorescência abaixo do controle negativo.

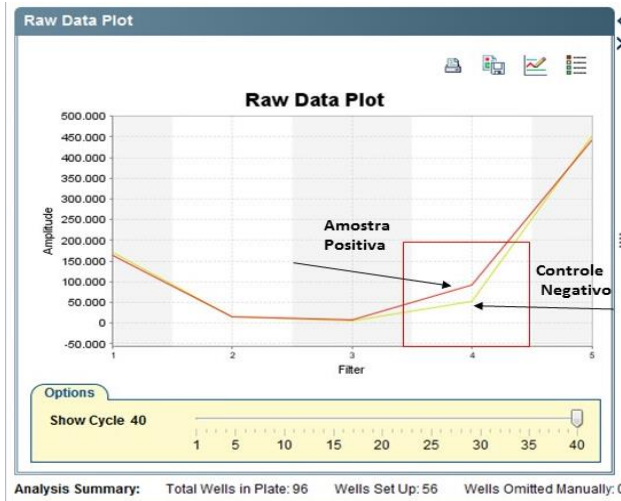


Se necessário, para melhor visualização, alterar a escala do gráfico.

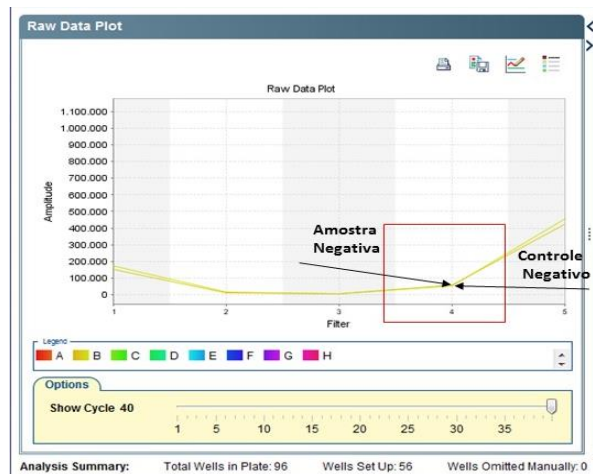
- Em "Raw Data Plot", selecionar "Plot properties"
- Selecionar a aba "Y Axis". Desmarcar a opção "Auto-adjust range".
- No campo "Maximum value" adicionar um valor contido no eixo y que permita a maximização (zoom) da curva do alvo de interesse (adicionar apenas números e nenhum outro caracter).



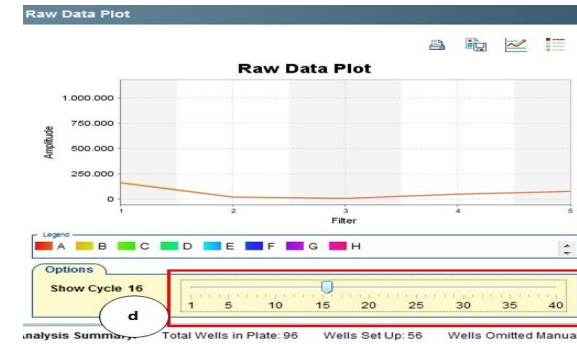
Exemplo de amostra positiva:



Exemplo de amostra negativa:



d) O usuário pode também movimentar a indicação de ciclo e acompanhar o aumento de fluorescência no decorrer da reação.



16. SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

CONTROLE POSITIVO SEM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.
 - Comparar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
- Configuração incorreta da reação de PCR.
 - Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o procedimento, se necessário.
 - Checar a calibração das micropipetas.
- Manuseio incorreto dos controles positivos.
 - Homogeneização inadequada ou descongelamento em temperatura diferente da ambiente.
- Condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não estão de acordo com a instrução de uso ou a data de validade do kit expirou.

- Checar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.

CONTROLE INTERNO COM SINAL FRACO OU SEM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- As condições da PCR não cumprem o protocolo.
 - Verificar as condições da PCR e repetir o procedimento de acordo com a instrução de uso, se necessário.
- A PCR foi inibida, não houve adição ou o volume de Controle Interno adicionado na etapa de extração não foi suficiente.
 - Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit.
 - Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.

CONTROLE NEGATIVO COM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.
 - Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas.
 - É recomendado realizar a pipetagem do Controle Positivo após todos os outros reagentes.
 - Certificar-se de que o local de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

IMPORTANTE: A interpretação dos resultados deve ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório para reduzir o risco de erros e resultados mal interpretados.

Quando os resultados do laboratório são transmitidos do laboratório para o centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erro na transferência de dados.

Se um ou mais dos problemas descritos na tabela acima acontecer, depois da investigação, informe qualquer problema residual ao supervisor para futuras ações.

17. 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 que a detecção 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 o **KIT XGEN MASTER MV** 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.

18. GARANTIA DA QUALIDADE

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

GARANTIA



O produto **KIT XGEN MULTI MV** é garantido 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.

EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.

Rua Paraíso do Norte, 866. CEP: 83.324-221 – Pinhais/PR – BRASIL

Fone: +55 41 3401-1850 | DDG: 0800-7101850

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

CNPJ: 04.645.160/0001-49

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

Telefone: (41) 3401-1850

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

CNPJ: 04.645.160/0002-20

20. REGISTRO ANVISA

80502070037

21. RESPONSÁVEL TÉCNICA

Larissa Lazzarotti

CRQ-PR nº. 09101487