

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MULTI PR24

FAMÍLIA DE KITS MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS ATRAVÉS DE PCR E HIBRIDIZAÇÃO REVERSA

1. USO PRETENDIDO

Os kits **XGEN MULTI PR FLOW CHIP** são kits de diagnóstico in vitro para a detecção simultânea dos patógenos: vírus *Influenza A* (FLuA), vírus *Influenza A* - subtipo H3 (FluA-H3), vírus *Influenza A* - subtipo H1N1 (FluA-H1N1), vírus *Influenza B* (FluB), *Adenovírus*¹ (AdV), *Bocavírus* (BoV), *Coronavírus 229E* (CoV-229E), *Coronavírus HKU-1* (CoV-HKU1), *Coronavírus OC43* (CoV-OC43), *Coronavírus NL63* (CoV-NL63), *Coronavírus SARS (SARS)*², *Coronavírus SARS-CoV-2* (CoV-2)³, *Enterovírus*⁴ (EV), *Metapneumovírus* (MPV), vírus *Parainfluenza 1* (PIV-1), vírus *Parainfluenza 2* (PIV-2), vírus *Parainfluenza 3* (PIV-3), vírus *Parainfluenza 4* (PIV-4), vírus Sincicial Respiratório - subtipo A (RSV-A), vírus Sincicial Respiratório - subtipo B (RSV-B), *Rinovírus* (RhV), *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) e *Mycoplasma pneumoniae*.

NOTAS:

¹Os sorotipos de *Adenovírus* identificados com o kit, mas não detectados individualmente são: Tipo 1; Tipo 2; Tipo 3; Tipo 4; Tipo 6; Tipo 7; Tipo 8; Tipo 11; Tipo 12; Tipo 16; Tipo 18; Tipo 21; Tipo 31; Tipo 34.

²*Coronavírus SARS*: detecção gene E (genérico para *Sarbecovírus*).

³*Coronavírus SARS-CoV-2*: detecção gene RdRP (específico para SARS-CoV-2).

⁴As espécies de *Enterovírus* identificadas com o kit, mas não detectadas individualmente são: EV-A, EV-B, EV-D (EV-D68 incluída).

Os kits permitem identificar esses agentes infecciosos a partir de material genético purificado de vários tipos de amostras clínicas (swab nasofaríngeo, exsudatos nasofaríngeos, aspirado nasofaríngeo e lavado broncoalveolar), utilizando amplificação de DNA/RNA por transcrição reversa e PCR multiplex (RT-PCR) com subsequente hibridização reversa em uma membrana contendo sondas específicas para cada patógeno.

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®.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

2. INTRODUÇÃO

O vírus *Influenza* é um vírus de RNA da família *Orthomyxoviridae*. A infecção pelo vírus ***Influenza A* (FluA)** está associada a infecções respiratórias severas de gravidade variável que vão desde infecções assintomáticas a doenças fatais. Os sintomas típicos da *Influenza* incluem febre, dor de garganta, tosse, dor de cabeça e mialgia. Complicações das infecções pelo vírus *Influenza* incluem pneumonia viral primária, pneumonia bacteriana e exacerbação das doenças crônicas subjacentes. A infecção tende a ser mais grave em pacientes idosos, crianças nos primeiros anos de vida, crianças pequenas e em pacientes imunocomprometidos. As viroses causadas pelo vírus ***Influenza B* (FluB)** apresentam os mesmos sintomas da infecção por

Influenza A, o que dificulta sua correta diferenciação utilizando somente a clínica do paciente. No entanto, os vírus *Influenza B* não são associados a pandemias.

Os **Adenovírus (AdV)** são vírus DNA fita dupla e são uma causa comum de doenças respiratórias. Os sintomas podem variar desde um resfriado comum a pneumonia, infecções do trato respiratório superior e bronquite. Dependendo do tipo, o *Adenovírus* pode causar outras doenças como gastroenterites, conjuntivites, cistites, e menos comum, doenças neurológicas. O AdV infecta crianças com mais frequência do que adultos. Infecções graves e disseminadas podem ocorrer em pacientes imunocomprometidos. O *Adenovírus* é responsável por cerca de 15% das crianças hospitalizadas com gastroenterites.

O **Bocavírus (BoV)** é um vírus DNA fita simples pertencente à família *Parvoviridae* e pode ser encontrado em crianças de todas as idades com doenças no trato respiratório. São relatados sintomas de infecção no trato respiratório, sintomas gastrointestinais e erupções cutâneas. Sugere-se que o BoV é transmitido através de secreções respiratórias. Entretanto, ele também pode ser encontrado em fezes e sangue, permitindo assim a infecção por via oral-fecal.

Os cinco **Coronavírus (CoV-NL63, CoV-229E, CoV-OC43, CoV-HKU1 e SARS-CoV-2)** são associados a uma gama de consequências respiratórias, incluindo bronquiolite e pneumonia. São vírus com genoma de RNA. O **CoV-NL63** é associado com infecções das vias aéreas superiores em crianças e uma provável causa de resfriado comum em adultos. O **CoV-229E** é comprovadamente o causador da gripe comum em adultos saudáveis, por isso é provável que ambos os vírus induzam sintomas similares em adultos, mesmo que os modos de infecção sejam diferentes. O **CoV-OC43** é geralmente caracterizado pelas dores de garganta. O **CoV-HKU1** provoca doenças leves nas vias respiratórias superiores como o resfriado comum, bronquiolite e pneumonia, com sintomas como rinorréia, febre, convulsão febril, tosse e respiração ofegante. O **SARS-CoV-2** foi identificado pela primeira vez na China em dezembro de 2019 como um agente viral que causa infecções do trato respiratório com sintomas como febre, tosse seca e insuficiência respiratória. Em casos mais graves, a infecção pode causar pneumonia, insuficiência renal e morte.

O **Enterovírus (EV)** é um vírus RNA fita simples. Ele é o segundo vírus que mais causa resfriados comuns em humanos. As infecções por EV normalmente acontecem no outono e verão e afetam milhões de pessoas por ano no mundo inteiro. Os vírus são encontrados em secreções respiratórias como saliva, expectoração e muco. Também são encontrados nas fezes de uma pessoa infectada. Ainda não existe vacina disponível para o EV não pólio.

O **Metapneumovírus (MPV)** é um membro da família *Paramyxoviridae* associado com infecções respiratórias agudas que variam desde o comprometimento do trato respiratório superior até formas graves de bronquiolite e pneumonia. Ocorrem principalmente no inverno e apesar de serem diagnosticados em todos os grupos etários, afeta principalmente crianças.

O vírus **Parainfluenza (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4)** é um vírus RNA associado com doenças do trato respiratório superior, incluído resfriados comuns com febre, laringotraqueobronquite, bronquiolite e pneumonia. O **PIV-1** e **PIV-2** são os patógenos mais comuns associados com a inflamação das vias aéreas superiores, e o **PIV-3** é associado na maioria dos casos de bronquiolite e pneumonia em crianças. Pouco se sabe sobre a epidemiologia do **PIV-4**, porém tem-se observado que a taxa de infecção geralmente é relativamente a mesma entre crianças pequenas e adultos. A doença é normalmente transmitida de pessoa para pessoa através do ar (tosse e espirros) e contato pessoal, com um período de incubação de aproximadamente 4 dias.

Os vírus **Respiratórios Sinciciais (RSV-A e RSV-B)** são importantes causadores de infecção no trato inferior respiratório em todos os grupos etários. O genoma do vírus é constituído por RNA, sendo que a maioria das infecções ocorre durante o inverno. O RSV é de particular

importância como causa de infecções severas no trato respiratório inferior em crianças nos primeiros anos de vida (causando bronquiolite e pneumonia), imunocomprometidos e idosos. Sua transmissão ocorre quando gotículas nasais e de saliva contendo o vírus são encontrados no ar. As pessoas infectadas com RSV são geralmente contagiosas durante 3 a 8 dias; pessoas saudáveis normalmente se recuperam da infecção por RSV entre 1 e 2 semanas.

O **Rinovírus (RhV)** é o agente infeccioso viral mais comum em humanos e a causa predominante do resfriado comum. O *Rinovírus* é um vírus RNA e é comum em todas as faixas etárias podendo causar infecções no trato respiratório inferior e superior. O aumento dos testes recentemente associou este vírus a doenças graves como asma e DPOC. Embora as infecções ocorram o ano todo, a incidência é maior no outono e na primavera. Existem dois modos de transmissão: via aerossóis de gotículas respiratórias, diretamente de pessoa para pessoa e via superfícies contaminadas.

A ***Bordetella pertussis (BP)*** é um bacilo gram negativo aeróbio, não esporulado com cápsula e fímbrias. É responsável pela coqueluche ou tosse convulsa. Sua transmissão ocorre por contacto com gotículas respiratórias da pessoa infectada e o maior risco de contágio é na fase catarral. Outra espécie de *Bordetella*, a ***Bordetella parapertussis (BPP)***, é responsável por uma forma mais rápida da doença, não sendo rara a co-infecção pelos dois agentes. Nem a infecção nem a vacinação providenciam imunidade permanente.

Mycoplasma pneumoniae (MP) é um comum causador de infecções do trato respiratório superior com febre, tosse, mal-estar e dor de cabeça. Esta bactéria não possui parede celular de peptidoglicanos e não pode, portanto, ser detectada pela coloração de gram. Radiologicamente confirmada a pneumonia, 5-10% dos casos se desenvolve em síndromes extrapulmonares raras, incluindo casos cardiológicos, neurológicos e dermatológicos. A transmissão é por contato pessoa-a-pessoa através de secreções respiratórias. O período de incubação é de entre 1 e 4 semanas.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio do ensaio é baseado em metodologia que envolve, simultaneamente, a amplificação multiplex de diferentes patógenos causadores de infecções respiratórias 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 roxo, na posição em que o fragmento amplificado hibridiza com a sonda específica, e este sinal é automaticamente capturado e analisado pelo software *HybriSoft*.

4. COMPONENTES

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

A família **XGEN MULTI PR24 FLOW CHIP** é composta por kits que possuem componentes em dois diferentes formatos:

- **XGEN MULTI PR24 FLOW CHIP MANUAL:** utilizado com a plataforma manual (HS12).
- **XGEN MULTI PR24 FLOW CHIP AUTOMATIZADO:** utilizado com as plataformas semiautomatizada (HS24) e automatizada (HS12A).

COMPONENTES	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE 24 TESTES (XG-PR24M-MB-24)	QUANTIDADE 48 TESTES (XG-PR24M-MB-48)	QUANTIDADE 24 TESTES (XG-PR24A-MB-24)
MM1 PR24	Solução de Primers e Sondas liofilizadas	3 <i>strips</i> x 8 poços (branco)	6 <i>strips</i> x 8 poços (branco)	3 <i>strips</i> x 8 poços (branco)
MM2 PR24	Solução de Primers e Sondas liofilizadas	3 <i>strips</i> x 8 poços (amarelo)	6 <i>strips</i> x 8 poços (amarelo)	3 <i>strips</i> x 8 poços (amarelo)
Água Livre de DNase e RNase	Água Livre de DNase e RNase	2 x 1 mL	4 x 1 mL	2 x 1 mL
Solução de Hibridização (Reagente A)	Solução de Hibridização	40 mL	80 mL	60 mL
Solução de Bloqueio (Reagente B)	Solução de Bloqueio	10 mL	18 mL	10 mL
Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Reagente C)	Estreptavidina-Fosfatase Alcalina	10 mL	18 mL	10 mL
Tampão de Lavagem I (Reagente D)	Tampão de Lavagem I	35 mL	70 mL	35 mL
Substrato Cromogênico (Reagente E)	Substrato Cromogênico	10 mL	18 mL	10 mL
Tampão de Lavagem II (Reagente F)	Tampão de Lavagem II	18 mL	35 mL	-
CHIP PR24	Chip PR24	24 unidades	48 unidades	24 unidades

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

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).

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

6.1 REAGENTES E MATERIAIS

a) Materiais comuns para as plataformas HS12, HS24 e HS12 AUTO

- ✓ Kit de extração de ácidos nucleicos*;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Ponteiras com filtro livre de DNase/RNase.

*Para a extração do material genético de lavado broncoaveolar, aspirado nasofaríngeo e exsudato nasofaríngeo recomenda-se utilizar um kit de extração e purificação de DNA/RNA.

b) Reagentes específicos para o HS24 e HS12 AUTO

- ✓ Solução de Lavagem Automação.

6.2 EQUIPAMENTOS

a) Equipamentos comuns para as plataformas HS12, HS24 e HS12 AUTO

- ✓ Microcentrífuga;
- ✓ Micropipetas calibradas (0,5 µL < volume < 1.000 µL);
- ✓ Rack termostável (4°C);
- ✓ Termociclador.

b) Equipamentos específicos

HS12

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

HS24

- ✓ Equipamento HS24;
- ✓ Termociclador.

HS12 AUTO

- ✓ Equipamento HS12 AUTO.

7. AVISOS E PRECAUÇÕES

- 7.1** Os kits devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- 7.2** 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.
- 7.3** 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.
- 7.4** 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.
- 7.5** O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.
- 7.6** Evitar vibração na superfície da bancada onde o teste é realizado.
- 7.7** Após o recebimento, armazenar o kit em geladeira em 2°C a 8°C.
- 7.8** Não trocar os componentes entre diferentes lotes dos kits. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
- 7.9** Verificar se os reagentes estão limpos e não contém partículas visíveis pesadas ou grumos. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição do kit.

- 7.10 Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada amostra.
- 7.11 Evitar contaminação cruzada entre os reagentes do kit utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as entre o uso de cada uma.
- 7.12 Não utilizar os kits da família após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- 7.13 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.
- 7.14 Armazenar e extrair as amostras separadamente de outros reagentes e utilizar sala dedicada para o manuseio.
- 7.15 Recomenda-se realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes de PCR em gelo ou em rack termostável.
- 7.16 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.
- 7.17 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.
- 7.18 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.
- 7.19 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.
- 7.20 Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.

8. AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

Os kits XGEN MULTI PR24 FLOW CHIP foram validados para uso com ácido nucleico extraído de amostras de lavado broncoalveolar, aspirado nasofaríngeo e exsudato nasofaríngeo.

Para as amostras do lavado broncoalveolar, recomenda-se coleta com broncoscópio para aspiração de líquido de um ou dois segmentos ou sub-seguintos pulmonares. Nos aspirados nasofaríngeos, recomenda-se a aspiração da maior quantidade de secreção nasofaríngea possível. No caso de exsudatos nasofaríngeos, recomenda-se coleta com swab com ponta de poliéster, rayon ou nylon, com cabo de plástico macio e flexível (não devem ser utilizados swabs com ponta de alginato de cálcio ou algodão).

Após a coleta, inserir as amostras coletadas em um recipiente estéril e mantidas de 2°C a 8°C por um período máximo de 48 horas. Para períodos longos de armazenamento recomenda-se que todas as amostras fiquem a -20°C até a extração.

IMPORTANTE: 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.

9. PREPARAÇÃO DOS COMPONENTES E AVISOS

9.1 MM1 PR24 e MM2 PR24

Componentes prontos para uso, comercializados em formato de *strips* de 8 tubos de 0,2 mL contendo os reagentes liofilizados correspondendo a dois mixes de PCR (MM1 PR24 e MM2 PR24).

Os tubos correspondentes a MM1 PR24 estão dispostos na cor natural e possuem esfera liofilizada branca. Os tubos correspondentes a MM2 PR24 estão dispostos em cor amarela e possuem esfera liofilizada branca.

NOTA: Após a abertura da embalagem, armazenar os tubos nas *strips* com os reagentes liofilizados em até no máximo uma semana.

9.2 Reagentes A, B, C, D, E e F (Hibridização)

Reagentes prontos para uso.

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

9.3 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.

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS USADOS EM COMBINAÇÃO COM OS KITS

10.1 Micropipetas

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%.

10.2 Termociclador

Os kits XGEN MULTI PR24 FLOW CHIP são direcionados para uso em combinação com qualquer termociclador convencional.

10.3 *HybriSpot*

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

11. CONTROLE DE PRÉ-ENSAIO E OPERAÇÕES

- 11.1 Verificar a data de validade do kit impresso na etiqueta externa da caixa.
- 11.2 Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis a olho nu ou grumos.
- 11.3 Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
- 11.4 Ligar os equipamentos (termociclador e *HybriSpot*) e verificar as configurações. Atentar-se para utilização do protocolo de ensaio correto.
- 11.5 Seguir estritamente o manual de equipamentos fornecidos pelo fabricante para a correta configuração dos termocicladores e *HybriSpot*.
- 11.6 Verificar se as micropipetas estão configuradas para o volume necessário.
- 11.7 Verificar se todos os outros equipamentos estão prontos para uso.

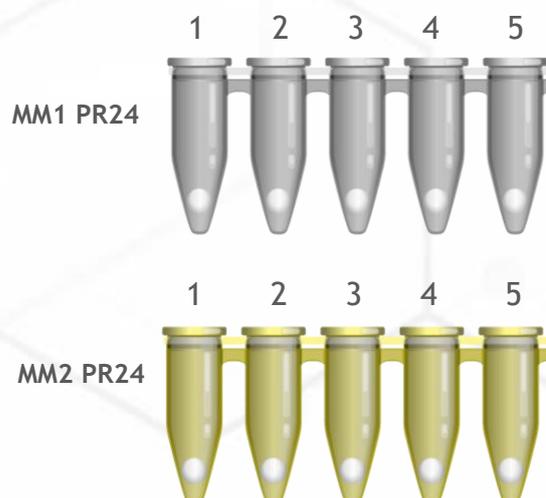
11.8 Em caso de problemas, não continuar o teste e comunicar ao supervisor.

12. PROTOCOLO

12.1 REAÇÃO PCR MULTIPLEX

A reação de PCR é realizada com um volume final de 30 μ L para cada mix de PCR. As esferas liofilizadas MM1 PR24 e MM2 PR24 são fornecidas em *strips* separadas.

IMPORTANTE: Dois tubos de PCR devem ser usados para cada amostra (um para cada *strip*). Caso o número de amostras a serem analisadas seja menor ou maior que 8, os tubos necessários podem ser separados de cada *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 para a MM1 PR24 e MM2 PR24, 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 antes da reação de PCR - Plataformas HS12, HS24 e HS12 AUTO

1. Pegar um tubo da MM1 PR24 e um tubo da MM2 PR24 contendo as misturas liofilizadas de PCR para cada amostra a ser analisada.
2. Adicionar 27 μ L de água livre de DNase e RNase na MM1 PR24 e MM2 PR24, em seguida acrescentar 3 μ L do material genético de cada amostra previamente extraída (o eluído da extração) a cada um dos tubos correspondentes.
3. Homogeneizar a mistura agitando manualmente e centrifugar por alguns segundos.

NOTA: Dependendo da coleta da amostra, o volume de material genético pode mudar, sendo possível aumentar o volume para até 30 μ L da amostra extraída. O volume de amostra aplicada deverá estar entre 3 e 30 μ L. Caso a aplicação de material genético, na reação,

seja menor que 30 µL, o volume restante da reação deverá ser completado com água livre de DNase e RNase.

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	5 min	1 ciclo
50 °C	20 min	1 ciclo
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	30 s	45 ciclos
60 °C	1 min	
8 °C	∞	-

NOTA: Se o produto de PCR não for hibridizado imediatamente, eles podem ser armazenados 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 PR24 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.

12.2 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 pôr 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.

- Misturar os produtos de PCR obtidos com a MM1 PR24 e MM2 PR24 e aliquotar 50 µL da mistura em um novo tubo, sendo este o material utilizado nas etapas a seguir.

4. 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;
5. 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.

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

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

8. Remover o reagente do chip por vácuo (30 segundos);
9. Em um novo microtubo 1,5mL, adicionar 230 µL do Reagente A (41 °C) e 50 µL do produto de PCR desnaturado. Adicionar a solução diretamente no chip;
10. Incubar por 8 minutos a 41 °C;
11. Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
12. Lavar 3 vezes adicionando 300 µL do Reagente A (41 °C) e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
13. Programar o HS12 para 29 °C;
14. Dispensar 300 µL do Reagente B;
15. Incubar por 5 minutos;
16. Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
17. Assim que a temperatura atingir 29 °C, dispensar 300 µL do Reagente C;
18. Incubar por 5 minutos a 29 °C;
19. Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
20. Programar o HS12 para 36 °C;
21. Lavar as membranas 4 vezes dispensando 300 µL do Reagente D e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
22. Assim que a temperatura atingir 36 °C, dispensar 300 µL do Reagente E;
23. Incubar por 10 minutos a 36 °C;
24. Remover o reagente por vácuo (30 segundos);
25. Lavar as membranas 2 vezes dispensando 300 µL do Reagente F e removendo o reagente por vácuo (30 segundos);
26. Caso o Chip esteja muito úmido mesmo após a aplicação do vácuo, repetir o processo de vácuo;
27. 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 PR24 FLOW 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:

1. 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;
2. Colocar as amostras amplificadas e desnaturadas, os chips e os reagentes em suas posições correspondentes no HS24.
3. 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 PR24 FLOW 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.

13. GABARITO DO TESTE

O esquema a seguir mostra a disposição das sondas no CHIP PR24:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	FluA	PIV-1	CoV-OC43		RNase P	RSV-A	B	
B	B	FluA-H1N1	PIV-2	BP		BG	RSV-B	CoV-229E	
C	CI-1	FluA-H3	PIV-3	BPP			RhV	CoV-HKU1	
D	CI-2	FluB	PIV-4	MP			PIV-1	CoV-NL63	
E	RNase P	MPV	Adv	EV	B	FluA	PIV-2	BPP	
F	BG	RSV-A	BoV	CoV-2	CI-1	FluA-H1N1	PIV-3	MP	
G		RSV-B	CoV-229E	SARS	CI-2	FluA-H3	PIV-4	EV	
H		RhV	CoV-HKU1		CoV-OC43	FluB	Adv	CoV-2	
I		B	CoV-NL63		BP	MPV	BoV	SARS	

Legenda:

- **B**: Controle de hibridização;
- **CI-1**: Controle de amplificação exógeno MM1 PR24;
- **CI-2**: Controle de amplificação exógeno da MM2 PR24;
- **RNase P**: Controle de amplificação endógeno MM1 PR24 (fragmento RNase P humano);
- **BG**: Controle de amplificação endógeno MM2 PR24 (fragmento B-Globina humana);
- **X**: Sondas específicas para cada patógeno.

14. CONTROLES

Os kits XGEN MULTI PR24 FLOW 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	Controle de Hibridização	1A - 1B - 2I - 5E - 8A
CI-1	Controle de Amplificação Exógeno MM1 PR24	1C - 5F
CI-2	Controle de Amplificação Exógeno MM2 PR24	1D - 5G
RNase P	Controle de Amplificação Endógeno MM1 PR24	1E - 6A
BG	Controle de Amplificação Endógeno MM2 PR24	1F - 6B

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 Exógeno (CI-1): Sonda para a detecção de DNA sintético incluído na MM1 PR24. Esse DNA será co-amplificado junto com o material genético da amostra. Dois sinais positivos no controle de amplificação exógena 1 (CI-1) indicarão que a reação de PCR na MM1 PR24 funcionou corretamente. Um resultado negativo nesse controle não invalida o resultado se o controle endógeno 1 (RNase P) foi amplificado corretamente e/ou a amostra foi positiva para qualquer um dos organismos incluídos no painel.

Controle de Amplificação Exógeno (CI-2): Sonda para a detecção de DNA sintético incluído na MM2 PR24. Esse DNA será co-amplificado junto com o material genético da amostra. Dois sinais positivos no controle de amplificação exógena 2 (CI-2) indicarão que a reação de PCR na MM2 PR24 funcionou corretamente. Um resultado negativo nesse controle não invalida o resultado se o controle endógeno 2 (BG) foi amplificado corretamente e/ou a amostra foi positiva para qualquer um dos organismos incluídos no painel.

Controle de Amplificação Endógeno 1 (RNase P): Sonda para detecção do gene da RNase P humana que é amplificada durante a PCR quando a MM1 PR24 é utilizada. Todas as amostras em que o DNA testado for amplificado corretamente terão um sinal positivo no controle de amplificação endógeno 1 (RNase P). 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 foram adequadas. 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 neste controle não invalida o resultado se o controle exógeno 1 foi amplificado corretamente e/ou a amostra foi positiva para qualquer um dos organismos incluídos na mistura. É provável que este último caso ocorra com tipos de amostras clínicas contendo um menor número de células humanas.

Controle de Amplificação Endógeno 2 (BG): Sonda para detecção do gene da beta-globulina humana que é amplificada durante a PCR quando a MM2 PR24 é utilizada. Todas as amostras em que o DNA testado for amplificado corretamente terão um sinal positivo no controle de amplificação endógeno 2 (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 foram adequadas. 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 o controle exógeno 2 foi amplificado corretamente e/ou a amostra foi positiva para qualquer um dos organismos incluídos nessa mistura. É provável que este último caso ocorra com tipos de amostras clínicas contendo um menor número de células humanas.

15. 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 PR24:

Resultados Esperados	Mix	ID da Sonda	Sonda/Posição (coluna-linha)					
			Sonda	B	CI-1 ³	CI-2 ³	RNase P ³	BG ³
Influenza A	1	FluA	2A-6E	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B

<i>Influenza A - Subtipo H1N1¹</i>	1	FluA-H1N1	2B-6F	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Influenza A - Subtipo H3²</i>	1	FluA-H3	2C-6G	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Influenza B</i>	1	FluB	2D-6H	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Metapneumovirus</i>	1	MPV	2E-6I	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Vírus Sincicial Respiratório - Subtipo A</i>	1	RSV-A	2F-7A	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Vírus Sincicial Respiratório - Subtipo B</i>	1	RSV-B	2G-7B	1A-1B-2I-5E-8A	-- / 1C-5F	-- / 1D-5G	-- / 1E-6A	-- / 1F-6B
<i>Rinovírus</i>	1	RhV	2H-7C	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Parainfluenza Tipo 1</i>	2	PIV-1	3A-7D	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Parainfluenza Tipo 2</i>	2	PIV-2	3B-7E	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Parainfluenza Tipo 3</i>	2	PIV-3	3C-7F	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Parainfluenza Tipo 4</i>	2	PIV-4	3D-7G	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Adenovírus</i>	2	AdV	3E-7H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Bocavírus</i>	2	BoV	3F-7I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus 229E</i>	2	CoV-229E	3G-8B	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus HKU-1</i>	2	CoV-HKU1	3H-8C	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus NL63</i>	2	CoV-NL63	3I-8D	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus OC43</i>	2	CoV-OC43	4A-5H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus SARS</i>	2	SARS	4G-8I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Coronavírus SARS-CoV2-24</i>	2	SARS + CoV-2	4G-8I - 4F-8H	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Enterovírus</i>	1	EV	4E-8G	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Bordetella pertussis</i>	2	BP	4B-5I	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Bordetella parapertussis</i>	2	BPP	4C-8E	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2	MP	4D-8F	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--/1D-5G	-- /1E-6A	-- /1F-6B
Amostra Negativa	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	1E-6A	1F-6B
Branco	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	-	-

Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	-	1D-5G	-	-
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-	-	-
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--	--/1E-6A	--
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	--	--/1D-5G	--	-- /1F-6B
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	1E-6A	--
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G	--	1F-6B
Amostra negativa	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	--	--/1D-5G	1E-6A	1F-6B
Amostra Negativa	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	--/1C-5F	--	1E-6A	1F-6B
Resultados inválidos	-	-	-	1A-1B-2I-5E-8A	-	-	-	-
Erro de Hibridização	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTAS:

¹A identificação positiva do vírus *Influenza A* subtipo H1N1 é obtida através da positividade da sonda FluA-H1N1, juntamente com a positividade da sonda FluA (embora um resultado negativo para a FluA não invalide o resultado).

²A identificação positiva do vírus *Influenza A* subtipo H3 é obtida através da positividade da sonda FluA-H3, juntamente com a positividade da sonda FluA (embora um resultado negativo para a FluA não invalide o resultado).

³Quando 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* exibe um aviso de “nenhum controle exógeno/nenhum controle de DNA humano” para o usuário executar as verificações apropriadas e validar o resultado.

⁴ A identificação positiva do *Coronavírus SARS-CoV-2* é obtida através da dupla positividade da sonda CoV-2 (específica para SARS-CoV-2, projetada para detectar o gene RdRP) juntamente com a positividade para a sonda SARS (genérica para *Sarbecovirus*, projetado para detectar o gene E). Um resultado positivo para a sonda CoV-2 e um resultado negativo para a sonda SARS devem ser considerados positividade incerta para a SARS-CoV-2. Recomenda-se repetir o teste ou iniciar uma nova extração de RNA. Se o resultado da repetição permanecer incerto, devem ser realizados testes de confirmação adicionais (para sequenciar a amostra), se clinicamente indicado. Um resultado positivo para a sonda SARS e um resultado negativo para a sonda CoV-2 deve ser considerado como suposto positivo para SARS-CoV-2 em estado pandêmico. Recomenda-se repetir o teste ou iniciar uma nova extração de RNA. Se o resultado da repetição não for claro, devem ser realizados testes de confirmação adicionais (para sequenciar a amostra), se clinicamente indicado.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O limite de detecção para cada patógeno foi calculado utilizando diluições seriadas de amostras de DNA sintéticos (plasmídeos) misturados com 20ng 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 *hibrySoft*. Foi estabelecido um valor corte igual a 4 (intensidade de cinza) para considerar as amostras positivas.

Alvo	Sondas	N° cópias/ Reação	Positivos/ Testados	Sensibilidade (%)	Intervalo de Confiança 95% (%)	Especificidade (%)	Intervalo de Confiança 95% (%)
<i>Influenza A*</i>	FluA	100	12/12	100%	80.5%-100%	99%	97.8%-99.7%
	FluA	50	2/3	67%	20.8%-93.9%	99%	97.8%-99.7%
<i>Influenza A - Subtipo H1N1 (pandemia 2009) *</i>	FluA-H1N1	100	3/3	100%	43.8%-100%	100%	99.2%-100%
	FluA-H1N1	10	10/10	100%	77.2%-100%	100%	99.2%-100%
<i>Influenza A - Subtipo H3</i>	FluA-H3	250	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	FluA-H3	100	17/21	81%	60%-92.3%	100%	98.5%-100%
<i>Influenza B</i>	FluB	500	12/12	100%	69%-100%	100%	98.5%-100%
	FluB	250	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
<i>Metapneumovirus</i>	MPV	500	10/10	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	MPV	250	3/6	50%	18.8%-81.2%	100%	98.5%-100%
Vírus Sincicial Respiratório - Subtipo A	RSV-A	100	10/10	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	RSV-A	50	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
Vírus Sincicial Respiratório - Subtipo B	RSV-B	50	8/8	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	RSV-B	10	0/3	0%	0%-69%	100%	98.5%-100%
<i>Rinovirus</i>	RhV	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	RhV	50	11/13	66.7%	30%-90.3%	100%	98.5%-100%
<i>Parainfluenza Tipo 1</i>	PIV-1	100	13/13	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-1	50	0/6	0%	0%-48%	100%	98.5%-100%
	PIV-2	50	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%

<i>Parainfluenza</i> Tipo 2	PIV-2	10	2/3	67%	20.8%- 93.9%	100%	98.5%-100%
<i>Parainfluenza</i> Tipo 3	PIV-3	250	13/13	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-3	100	11/15	73.3%	48%-89.1%	100%	98.5%-100%
<i>Parainfluenza</i> Tipo 4	PIV-4	250	7/7	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	PIV-4	100	2/3	66.7%	20.8%- 93.9%	100%	98.5%-100%
<i>Adenovirus</i>	AdV	100	10/10	100%	77.2%- 100%	100%	98.5%-100%
	AdV	50	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
<i>Bocavirus</i>	BoV	100	15/15	100%	61%-100%	99%	97.6%- 99.82%
	BoV	50	5/6	83.3%	43.6%-97%	99%	97.6%- 99.82%
<i>Coronavírus</i> 229E	CoV-229E	250	15/15	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-229E	100	3/5	66.7%	20.8%- 93.9%	100%	98.5%-100%
<i>Coronavírus</i> HKU-1	CoV-HKU1	250	7/7	100%	61%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-HKU1	100	11/15	73.3%	48%-89.1%	100%	98.5%-100%
<i>Coronavírus</i> NL63	CoV-NL63	250	10/10	100%	77.2%- 100%	100%	98.5%-100%
	CoV-NL63	100	2/6	33.3%	9.7%-70%	100%	98.5%-100%
<i>Coronavírus</i> OC43	CoV-OC43	100	10/10	100%	77.2%- 100%	100%	98.5%-100%
	CoV-OC43	50	5/6	83.3%	43.6%-97%	100%	98.5%-100%
SARS-CoV-2	CoV-2	100	12/12	100%	69%-100%	100%	98.5%-100%
	CoV-2	50	9/12	75%	42.8%- 93.3%	100%	98.5%-100%
	SARS	50	12/12	100%	69%-100%	100%	98.5%-100%
	SARS	10	3/12	25%	6.7%- 57.1%	100%	98.5%-100%
<i>Enterovirus**</i>	EV-A	50	9/9	100%	62.8%- 100%	100%	98.5%-100%
		10	6/9	66.6%	31%-91%	100%	98.5%-100%
	EV-B	1000	9/9	100%	62.8%- 100%	100%	98.5%-100%
		500	3/9	33.3%	9.04%-70%	100%	98.5%-100%
	EV-D	10	9/9	100%	62.8%- 100%	100%	98.5%-100%
	BP	250	10/10	100%	77.2%- 100%	100%	98.5%-100%

<i>Bordetella pertussis</i>	BP	100	0/3	0%	0%-69%	100%	98.5%-100%
<i>Bordetella parapertussis</i>	BPP	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	BPP	50	4/6	66.7%	30%-90.3%	100%	98.5%-100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP	100	10/10	100%	77.2%-100%	100%	98.5%-100%
	MP	50	2/3	66.7%	20.8%-93.9%	100%	98.5%-100%

Teste de repetibilidade para cada um dos patógenos incluídos no painel do kit PR24 FLOW CHIP

* O Influenza A alvo contém duas sondas diferentes, cada uma delas com sensibilidade diferente.

** O Enterovírus alvo contém três sondas diferentes, cada uma delas com sensibilidade diferente.

17. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
Ausência de Sinal/ Ausência de sinal no Controle de Hibridização.	<ol style="list-style-type: none"> 1-Falha no protocolo de hibridização; 2-Reagentes fora do prazo de validade ou que não foram devidamente armazenados; 3-Sondas no Chip degradadas por restos de reagentes contaminantes nos poços. 	<ol style="list-style-type: none"> 1-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. 2-Verificar a data de validade e condições de armazenamento dos reagentes e do Chip, e repetir o ensaio; 3-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.	<ol style="list-style-type: none"> 1-Quantidade insuficiente de DNA na amostra clínica ou problemas na extração; 2-Presença de inibidores de PCR na amostra. 	<ol style="list-style-type: none"> 1-Repetir o ensaio utilizando uma quantidade maior de amostra; 2-Purificar o DNA da amostra e repetir o teste.
Sinal fraco de Hibridização.	<ol style="list-style-type: none"> 1-Reagentes de PCR e/ou Hibridização fora do prazo de validade; 2-Volume de amostra utilizado na mix liofilizada. 3-Falha no protocolo de hibridização; 4-Baixa concentração ou qualidade do DNA da amostra; 5-Falha no processo de amplificação da amostra, 	<ol style="list-style-type: none"> 1-Checar a data de validade de todos os reagentes e condições de armazenamento. Repetir o ensaio; 2-Repetir o ensaio utilizando o volume correto de amostra; 3-Checar o funcionamento correto dos equipamentos HS12/HS24/HS12A e protocolo de hibridização. Repetir o ensaio; 4-Concentrar a amostra durante o processamento adicionando menos volume de água; 5-Verificar a ciclagem e a calibração do termociclador. Realizar um teste utilizando uma amostra sabidamente positiva.

18. 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 PR24 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.

19. GARANTIA DA QUALIDADE

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

19.1 GARANTIA

Os kits XGEN MULTI PR24 FLOW 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.

19.2 EXCEÇÕES NA GARANTIA

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

19.3 EXTINÇÃO DA GARANTIA

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

20. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Mobius Life Science Comércio de Produto 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: 04.645.160/0002-20

Rua Paraíso do Norte, 866 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-221

Telefone: (41) 3401-1850 | 0800-7101850

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

CNPJ: 04.645.160/0001-49

21. REGISTRO ANVISA

80502070089