

1. NOME COMERCIAL

KIT BIOMOL ZDC - Zika, Dengue e Chikungunya

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP

CNPJ: 03.585.986/0001-05

RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775

CEP 81350-010 - CURITIBA - PARANÁ - BRASIL

Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30 (exceto feriados)

Suporte e Assessoria Científica - 0800 400 4267

sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

KIT BIOMOL ZDC - 23 determinações de cada vírus (Zika, 4 sorotipos de Dengue e Chikungunya)

4. FINALIDADE

Teste molecular discriminatório, baseado na amplificação e detecção de ácidos nucleicos (RNA) dos vírus Zika, Dengue (4 sorotipos) e Chikungunya, além da detecção de um Controle Interno de reação (CI) e um Controle Positivo (CP).

As amostras a serem testadas são provenientes da extração de RNA de soro ou plasma de pacientes com suspeita de infecção por Zika, Dengue e Chikungunya, ou ainda, infecções mistas.

USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento específico em biologia molecular.

6. COMPOSIÇÃO

O Módulo é composto por duas caixas, sendo:

- BIOMOL ZDC I:
 - 01 microtubo contendo 70 µL de Iniciadores para os alvos moleculares Zika e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 70 µL de Iniciadores para os alvos moleculares Dengue sorotipos 1 e 4 e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 70 µL de Iniciadores para os alvos moleculares Dengue sorotipos 2 e 3 e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 70 µL de Iniciadores para os alvos moleculares Chikungunya e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 35 µL de Sondas para os alvos moleculares Zika e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 35 µL de Sondas para os alvos moleculares Dengue sorotipos 1 e 4 e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 35 µL de Sondas para os alvos moleculares Dengue sorotipos 2 e 3 e Controle Interno;
 - 01 microtubo contendo 35 µL de Sondas para os alvos moleculares Chikungunya e Controle Interno.

*Iniciadores (oligonucleotídeos).

*Sondas (oligonucleotídeos marcados com fluoróforos).

- BIOMOL ZDC II:

- 01 microtubo contendo 60 µL de Água RNase Free;
- 01 microtubo contendo 900 µL de Mistura de PCR (composto por reagentes necessários para a realização de reações de PCR em tempo real);
- 01 microtubo contendo 70 µL de Enzima Transcriptase Reversa (RT);
- 01 microtubo contendo 450 µL de Controle Positivo.

7. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- Equipamentos de Proteção Individual (EPI);
- Kit de Extração de RNA;
- Etanol absoluto (para o módulo de extração);
- Tubos para armazenamento das amostras;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da reação;
- Placa de PCR (96 poços) e adesivo óptico;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Ponteiras esterilizadas RNase e DNase Free com filtro (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Centrífuga para placas de 96 poços;
- Centrífuga para microtubos;
- Cabine de segurança biológica;
- 7500 Real-Time PCR Standard (Applied Biosystems).

8. DESCRIÇÃO DO PRINCÍPIO DE AÇÃO

Os testes realizados com o Kit BIOMOL ZDC são baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR).

A RT-qPCR permite a detecção de seqüências específicas em uma amostra de RNA extraído a partir de medidas de intensidade de fluorescência durante o andamento da reação. Nessa técnica, ocorre inicialmente uma transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA da amostra) seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), onde a fluorescência é captada para cada alvo.

O Kit BIOMOL ZDC permite a identificação dos vírus Zika, Dengue (sorotipos 1 a 4) e Chikungunya, além de detecção do Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos (RNA) dos patógenos e do Controle Interno é feita através do uso de sondas (oligonucleotídeos marcados com fluoróforos) específicas para cada alvo molecular. O teste para cada patógeno é realizado em uma reação *multiplex*, onde existem reagentes específicos para o alvo do patógeno e para o Controle Interno. Desta forma, o kit apresenta quatro reações *multiplex* distintas, sendo elas: Zika/CI, Dengue 1/Dengue 4/CI, Dengue 2/Dengue 3/CI e Chikungunya/CI.

A amplificação do Controle Interno indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador) e a qualidade do RNA extraído. Em resultados negativos apenas o Controle Interno é detectado. Caso esta amplificação não seja detectada, a amostra deve ser extraída novamente.

De acordo com os critérios de avaliação dos resultados descritos no item 10, a amplificação de alvos específicos (patógenos) e do Controle Interno indica a presença do RNA viral.

O kit possui um Controle Positivo que avalia todos os patógenos e o CI e comporta-se como referencial de qualidade dos reagentes e do processo como um todo, avaliando desde a extração até a análise dos resultados, sendo bioseguro.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia-se a presença ou ausência do alvo molecular.

9. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO

O transporte do Módulo de Amplificação BIOMOL ZDC deve ser realizado em gelo seco (em torno de -80°C) e o armazenamento deve ser feito entre -30 e -15°C. O estudo de estabilidade durante o uso demonstra que o produto pode ser utilizado até o terceiro ciclo de descongelamento dos componentes sem perda de atividade e/ou sensibilidade de detecções. Eventuais sobras após o 3º ciclo de descongelamento devem ser descartadas.

10. PRECAUÇÕES, CUIDADOS ESPECIAIS E RISCOS RELACIONADOS AO PRODUTO

- Este produto deve ser manipulado por profissionais de acordo com esta instrução de uso;
- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco e luvas descartáveis sem pó durante o uso deste produto;
- Não utilizar reagentes vencidos;
- A temperatura do ambiente indicada para manipulação do produto é entre 15 e 25°C;
- As reações possuem um Controle Interno como alvo de detecção uma região do genoma humano, sendo assim, é necessário manipular o produto com as precauções devidas para evitar contaminações das reações com material genético dos operadores. Medidas como realizar a limpeza adequada do ambiente e dos equipamentos em que o produto será utilizado, além do uso de tubos e plásticos estéreis

RNase/DNase *Free* e descartáveis. A utilização de EPIs, como luvas, máscaras e toucas, reduzem o risco de contaminação do produto com material genético que não seja proveniente da amostra;

- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva para todos os vírus alvo e Controle Interno desse conjunto. Mesmo não apresentando risco para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras reais que possam estar sendo manipuladas em paralelo, evitando resultados falso positivos;
- Para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações, é necessário realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, preparo de reações e PCR em áreas separadas;
- A etapa de extração de RNA é de extrema importância para a eficiência da reação, portanto, é imprescindível seguir as instruções do fabricante do kit de extração;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação ter ocorrido, para reduzir risco de contaminação do ambiente com produtos de PCR;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em cabines de segurança biológica;
- As amostras de soro de pacientes e/ou amostras de RNAs extraídos de soro de pacientes devem ser armazenadas em temperatura adequada para evitar sua degradação e invalidação do teste antes de sua utilização;
- Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinados ao tratamento adequado de acordo com a legislação vigente local;
- Para um melhor desempenho do teste, seguir corretamente as instruções e utilizar equipamentos de medição calibrados.

11. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

É necessária a extração do Controle Positivo. É preconizado que as extrações de RNA das amostras de soro e do Controle Positivo devem ser realizadas com o kit sugerido adotando o protocolo estabelecido pelo fabricante, sem modificações, utilizando o volume de eluição fixado em 60 μ L.

11.1. PREPARO DA REAÇÃO

Importante: Descongelar os reagentes e centrifugá-los, manter os reagentes em gelo durante todo o processo de preparo das reações.

Importante: Realizar a extração do Controle Positivo como preconizado na Instrução de uso.

Uma placa de PCR de 96 poços é utilizada para 23 reações de amplificação e detecção de amostras de pacientes para cada conjunto de alvos (totalizando 92 poços), além de 04 reações para o Controle Positivo (uma para cada tipo de reação *multiplex*).

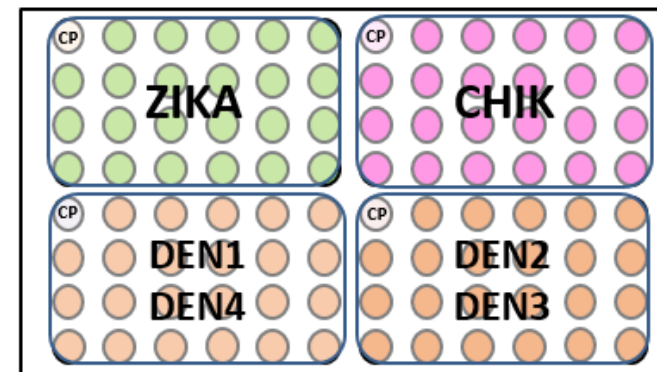
- 11.1.1. Identificar 04 microtubos de 1,5 ou 2,0 mL: um com “ZIKA”, outro com “DEN1/4”, outro com “DEN2/3” e o último com “CHIK”. Estes serão usados para o preparo de cada mistura de reação específica para cada conjunto de alvos moleculares;
- 11.1.2. É necessário preparar um volume suficiente para 28 reações de cada alvo. Adicionar em cada um dos 04 microtubos recém-identificados os volumes presentes na Tabela 01, sendo que os reagentes específicos devem ser adicionados a partir de seus tubos correspondentes (por exemplo: no tubo CHIK, serão adicionados o conjunto de iniciadores Chikungunya e o conjunto de sondas Chikungunya);

Tabela 01: Reagentes e volumes indicados para o preparo da mistura de reação.

REAGENTE	VOLUME (μ L)
Mistura de PCR	186,48
Conjunto de Iniciadores específico	56,0
Conjunto de Sondas específico	28,0
Enzima RT	14,0
Água RNase <i>Free</i>	9,52
TOTAL	294,0

- 11.1.3. Misturar os reagentes tamborilando e invertendo cada tubo de mistura de reação;

- 11.1.4. Após o preparo das misturas de reação, centrifugar os tubos e distribuir **10,5 μ L** de cada uma das preparações nos poços da placa de acordo com o modelo sugerido abaixo:



- 11.1.5. Adicionar **9,5 μ L** de RNA de amostra de pacientes previamente extraídas em cada poço, de acordo com o desenho da placa. Cada paciente terá sua amostra pipetada 4 vezes na placa, uma vez para cada reação *multiplex*. Utilizar uma ponteira nova a cada poço da placa;
- 11.1.6. Adicionar **9,5 μ L** de RNA extraído de Controle Positivo nos poços reservados para o CP;
- 11.1.7. Selar a placa com adesivo óptico e centrifugá-la;

11.2. PCR EM TEMPO REAL

- 11.2.1. Ligar a máquina 7500 Real-Time PCR *Standard* (Applied Biosystems) e seu computador;
- 11.2.2. Abrir o programa do equipamento (7500 Software) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas;
- 11.2.3. Inserir a placa no equipamento com as posições dos poços dispostas como na figura acima;
- 11.2.4. Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 02;

Tabela 02: Alvos e fluorescências/canais a serem configurados na análise.

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
ZIKA	FAM	NFQ-MGB	lime
DEN1	VIC	NFQ-MGB	orange
DEN2	FAM	NFQ-MGB	aqua
DEN3	VIC	NFQ-MGB	orange
DEN4	FAM	NFQ-MGB	aqua
CHIK	FAM	NFQ-MGB	rose
CI1	VIC	NFQ-MGB	blue
CI2	CY5	NFQ-MGB	blue

- 11.2.5. Definir as amostras e nomeá-las de acordo como serão testadas;
- 11.2.6. Configurar alvos e amostras conforme Tabela 03;

Tabela 03: Alvos e Amostras para configuração no equipamento.

Poços	Alvos		
A1 a D6	ZIKA (FAM)	CI1 (VIC)	---
A7 a D12	CHIK (FAM)	CI1 (VIC)	---
E1 a H6	DEN1 (VIC)	DEN4 (FAM)	CI2 (CY5)
E7 a H12	DEN2 (FAM)	DEN3 (VIC)	CI2 (CY5)



- 11.2.7. Selecionar a referência passiva ou interna de equipamento como “ROX”;
11.2.8. Alterar o volume de reação para 20 µL e alterar o número de ciclos para 40 e configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 04;

Tabela 04: Parâmetros de ciclagem da reação de PCR para serem inseridos na programação da corrida.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (mm:ss)
Holding Stage	51	30:00
Holding Stage	95	15:00
Cycling Stage (40x)	95	00:15
	60	01:00

- 11.2.9. Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

12. ANÁLISE DOS RESULTADOS

- 12.1. Os parâmetros de análise devem ser ajustados conforme Tabela 05;

Tabela 05: Configurações de parâmetros de análise.

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
CHIK	1,0	6	15
CI1	0,2	6	15
CI2	0,2	6	15
DEN1	0,2	6	15
DEN2	0,5	6	15
DEN3	0,4	6	15
DEN4	0,4	6	15
ZIKA	0,5	6	15

12.2. Interpretação dos resultados

- Os poços de CP devem apresentar amplificação com Ct abaixo de 28 para todos os vírus testados e para o CI mimetizando uma infecção mista com amplificação de todos os alvos em todas as reações multiplex testadas com os alvos específicos de cada reação;
 - Em Zika ocorre a amplificação do patógeno e do CI;
 - Em Chikungunya ocorre a amplificação do patógeno e do CI;
 - Em Dengue 1 e Dengue 4 ocorre a amplificação dos patógenos Dengue 1 e Dengue 4 e do CI;
 - Em Dengue 2 e Dengue 3 ocorre a amplificação dos patógenos Dengue 2 e Dengue 3 e do CI;
- A amplificação de patógenos com Ct menor que 36 juntamente com a amplificação do CI menor ou igual a 28 caracteriza um paciente positivo;
- A não amplificação do Controle Interno ou amplificação com CT maior que 28 para este alvo indica que a reação não ocorreu de forma adequada e implica em repetição do teste para a amostra em questão;
- Os valores de *Cycle threshold* (Ct) dos vírus podem ser usados para a determinação qualitativa dos resultados, conforme Tabela 06;

Tabela 06: Cts dos vírus para determinação qualitativa dos resultados.

RESULTADO	Ct dos vírus
POSITIVO	Ct < 36
INDETERMINADO	Ct ≥ 36
NEGATIVO	Ausência de amplificação

- Excesso de ruído ou sinal de fluorescência muito baixos indicam que pode ter ocorrido degradação de RNA de amostra ou um processo de extração de RNA malsucedido (principalmente quando não há amplificação do Controle Interno no teste de uma amostra). Nesse caso, recomenda-se repetir o processo de extração para a amostra e testá-la novamente;
- A falta de sinal de amplificação também pode ser causada por ausência de amostra no poço utilizado para o teste. Nesse caso, recomenda-se realizar a reação novamente certificando-se de que a amostra foi adicionada;
- Caso a carga viral do paciente seja muito alta (Cts muito baixos), o Ct do Controle Interno pode ter um resultado muito alto, ou ainda, não apresentar amplificação. Nesse caso, recomenda-se fazer uma diluição 1:10 da amostra em água e testá-la novamente.

13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Esse kit é capaz de distinguir Zika, Chikungunya e Dengue (todos os sorotipos) não apresentando reações cruzadas com outros patógenos que apresentam sintomas clínicos semelhantes (vírus Mayaro, vírus Oropouche, vírus da Febre Amarela, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*)

O produto foi desenvolvido para detectar amostras de soro positivas para os vírus Zika, Dengue e Chikungunya com amplificação em Cts menores do que 36.

As reações foram validadas com RNA de plasma sabidamente negativo para os agentes do kit. Nessas reações one-step RT qPCR ocorreu somente a amplificação do controle interno devido a presença de plasma humano. Para cada patógeno alvo deste kit foram avaliadas reações cruzadas entre cada um dos vírus através da utilização de amostras provenientes de cultivo viral e amostras de soro de pacientes e não houve a presença de amplificação inespecífica, ocorrendo apenas a amplificação do controle interno e do alvo em questão.

12.1 Desempenho analítico e diagnóstico do teste

O desempenho analítico e diagnóstico do teste está descrito na Tabela 07.

Tabela 07: Desempenho analítico e diagnóstico do teste.

Alvos	Sensibilidade analítica	Especificidade analítica (%)	Sensibilidade diagnóstica (%)	Especificidade diagnóstica (%)
Zika	≥ 5 PFU/mL	100	100	100
Chikungunya	≥ 5 PFU/mL	100	100	100
Dengue 1	129 cópias/reação	100	94,7	100
Dengue 2	494 cópias/reação	100	100	100
Dengue 3	95 cópias/reação	100	100	100
Dengue 4	684 cópias/reação	100	100	100

14. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados quando os insumos não forem armazenados nas condições determinadas;
- As instruções de uso devem ser seguidas. Caso contrário, o fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos;
- Para que o teste funcione de forma adequada, é necessário que os instrumentos de medição de volume (pipetas) estejam calibrados para o uso das quantidades indicadas e que o equipamento de detecção seja calibrado e mantido conforme instruções do fabricante;
- Para o procedimento de extração de RNA viral que será utilizado nas reações de amplificação e detecção deste kit, é recomendado utilizar o QiAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).