

Instrução de Uso- Kit IBMP Biomol Trio**Pox**

IU-IVD-021

Revisão: 03

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Trio Pox

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 IBMP Biomol Trio Pox para detecção dos vírus Monkeypox, Orthopox e Varicella Zoster, além do controle interno (CI), um gene constitutivo humano – RNaseP (RP). O Conjunto de Reagentes para detecção molecular e diagnóstico diferencial de Kit IBMP Biomol Trio Pox se destina ao diagnóstico e vigilância epidemiológica de Monkeypox, Orthopox e Varicella Zoster.

4. FINALIDADE

O Kit IBMP Biomol Trio Pox baseia-se na tecnologia de PCR em tempo Real e é indicado para o processamento de amostras clínicas, previamente submetidas a etapa de extração de ácidos nucleicos. O produto é um ensaio multiplex que detecta as regiões genômicas dos vírus Monkeypox, Orthopox e Varicella Zoster, além do controle interno (CI), um gene constitutivo humano – RNaseP (RP). O Conjunto de Reagentes para detecção molecular e diagnóstico diferencial de Kit IBMP Biomol Trio Pox se destina ao diagnóstico e vigilância epidemiológica de Monkeypox, Orthopox e Varicella Zoster.

O kit também é capaz de identificar o alvo MOCV (*Molluscum Contagiosum*), porém a detecção deste alvo não tem finalidade diagnóstica por ainda estar em validação dos dados clínicos.**PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.****5. USUÁRIO PRETENDIDO**

Profissional técnico capacitado para processamento de amostras clínicas, utilização de insumos/kit e manuseio de equipamentos necessários para o diagnóstico molecular baseado na PCR em Tempo Real.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

Conjunto de Reagentes deve ser armazenado entre -30 °C e -10 °C.

Não são de responsabilidade do fabricante:

- Insumos armazenados fora da temperatura especificada;
- Os procedimentos da etapa de extração;



- Ocorrência de contaminação ambiental (amplicon);

Observações:

*Todos os reagentes deverão ser armazenados nas temperaturas indicadas no rótulo externo, desde o ato do recebimento até a utilização do conjunto, observando a data de validade.

*Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização do kit de acordo com os procedimentos de cada laboratório.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A metodologia para amplificação e detecção dos alvos MPXV, OPXV, VZV e RP tem como base a metodologia de PCR em tempo real.

7.1. Etapa de Extração

Vide Manual de Instruções do fabricante do Kit de Extração de DNA.

Nota: Se os DNAs extraídos das amostras clínicas não forem imediatamente utilizados após a extração, deverão ser armazenados de -30 °C a -10 °C.

7.2. Etapa de Amplificação e Detecção

A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência é usada para determinar a presença dos alvos virais MPXV, OPXV, VZV e do gene endógeno RP. Os equipamentos que podem ser utilizados na etapa de amplificação e de detecção são:

ABI 7500 Real Time PCR System, ou QuantStudio 7 Flex da Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, em placas de 96 poços.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Este produto deve ser utilizado com DNA extraído a partir de amostras clínicas como swabs de material vesicular (secreção de vesícula), tecido de lesão de pele (crosta de lesão) e exsudato.

A temperatura do espaço físico destinado ao teste deve ser monitorada e mantida entre 10 °C e 25 °C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

- 2 frascos com 275µL de Mistura de PCR;
- 2 frascos com 550 µL de Mix MPXV/OPXV/VZV/RP;
- 1 frasco com 50 µL de Controle Negativo;
- 1 frasco com 50 µL de Controle Positivo.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Kit de extração de ácido nucleico;

- Acessórios para automação das etapas de extração e de preparo da Mistura de PCR;
- Luva descartável sem talco;
- Sacos de descarte de lixo biológico;
- Microcentrífuga;
- Ponteiras para uso único, com filtro e estéreis, de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL;
- Pipetas de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL;
- Microtubo 1,5mL;
- Placa óptica de 96 reações;
- Selo óptico;
- Vórtex.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O uso do Kit IBMP Biomol Trio Pox processa uma rotina com 1 a 92 amostras clínicas ou 2 rotinas de 1 a 46 amostras clínicas, mais os controles positivo e negativo; não permitindo uso parcial ou interrupções durante o seu processamento.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

- Retirar do freezer os reagentes descritos abaixo e aguardar o descongelamento dos mesmos à temperatura ambiente;
- Imediatamente após o descongelamento e antes do preparo da mistura de PCR MPXV/OPXV/VZV/RP, homogeneizar e centrifugar (spin) os tubos de todos os insumos.

12. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO**12.1 Procedimento de Amplificação - ABI 7500 Real Time ou QuantStudio 7 Flex em placa de 96 poços.****Preparo Manual das misturas de PCR****MPXV/OPXV/VZV/RP:**

- Adicionar no microtubo de mistura de PCR, todo o volume de Mix MPXV/OPXV/VZV/RP de acordo a Tabela 01 (para 48 amostras):

Tabela 01: Volumes de mistura de PCR

Conjunto de reagentes	Volume 1 reação	Volume 48 reações
Mistura de PCR	5 µL	275 µL *
Mix MPXV/OPXV/VZV/RP	10 µL	550 µL *

*Valores incluindo o volume morto de reação.

- Homogeneizar a mistura de PCR MPXV/OPXV/VZV/RP com uma pipeta (evitando formação de bolhas) ou com o auxílio de um vórtex;
- Fazer uma rápida centrifugação (spin);



- Distribuir a mistura de PCR MPXV/OPXV/VZV/RP na placa de amplificação, de acordo com a sugestão do desenho abaixo:
-Adicionar 15µL da mistura de PCR MPXV/OPXV/VZV/RP em cada poço da placa óptica.
- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes, conforme indicado Figura 01:
 - Adicionar 5 µL de amostras de pacientes para detecção de MPXV/OPXV/VZV/RP de acordo com o esquema abaixo na Figura 01.
 - Adicionar 5 µL de Controle Positivo no poço H6 (e H12 no caso de 96 amostras); e adicionar 5 µL de Controle Negativo no G6 (e G12 no caso de 96 amostras).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41							
B	Amostra 2	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42							
C	Amostra 3	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43							
D	Amostra 4	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44							
E	Amostra 5	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45							
F	Amostra 6	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46							
G	Amostra 7	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	CNEG							
H	Amostra 8	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	CPOS							

Figura 01: Esquema de distribuição da mistura de PCR MPXV/OPXV/VZV/RP na placa de amplificação 1 x 48 reações.
Legenda: CNEG – Controle Negativo CPOS – Controle Positivo

- Após a adição na placa óptica da mistura PCR MPXV/OPXV/VZV/RP, dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa óptica com selo óptico. Utilizar o vórtex para homogeneizar as misturas por 4 minutos a 1200 rpm;
- Verificar se em todos os poços o material está homogeneizado com coloração azul claro;
- Centrifugar a placa selada por 30 segundos e iniciar a reação de PCR no equipamento de PCR em tempo real.

12.2 Amplificação e detecção

- Ligar o computador do equipamento de PCR em tempo real (ABI 7500 Real Time PCR System ou QuantStudio 7 Flex);
- Colocar a placa óptica no equipamento de PCR em tempo real;
- Evitar tocar no fundo da placa. Certificar-se de que a posição A1 da placa está no canto superior esquerdo;

- No computador do equipamento, clicar no ícone para abertura do software do equipamento 7500 Real Time PCR System ou QuantStudio 7 Flex;
- Após a inicialização, configurar o software do equipamento conforme desenho de placa estabelecido pelo usuário, as amostras, o controle negativo e o controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 02.

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

Target Name	Reporter	Quencher
MOCV	Cy5	NFQ-MGB
MPXV GERAL	FAM	NFQ-MGB
OPXV	VIC	NFQ-MGB
RP	NED	NFQ-MGB
VZV	ROX	NFQ-MGB

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE
- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 03.

Tabela 03: Parâmetros de ciclagem da reação de PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 minutos	1x
95°C	10 segundos	40x
60°C*	30 segundos	

* Certificar-se de que a captura de fluorescência ocorra neste estágio.

- Antes de iniciar a corrida, salvá-la;
- Clicar no ícone Start Run;
- Após o término da corrida, salvar a corrida (.eds).

13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

13.1. Parâmetros de análise dos resultados

Os parâmetros de análise devem ser ajustados conforme Tabela 04:

Tabela 04: Parâmetros de análise

		MOCV	MPXV Geral	OPXV	RP	VZV
7500 Real-Time PCR System	Threshold	12.000	18.000	18.000	18.000	12.000
	Baseline start	AUTO	AUTO	1	AUTO	AUTO
	Baseline End	AUTO	AUTO	11	AUTO	AUTO

Quant Studio 7 Flex	Threshold	15.000	30.000	30.000	30.000	15.000
	Baseline start	1	3	3	AUTO	5
	Baseline End	10	11	11	AUTO	18

Na Tabela 05 estão relacionados os critérios de aceitação para aprovação da rotina de PCR para os Controles Negativo e Positivo.

Tabela 05: Critérios de aceitação para Controles Positivos e Negativos

Controle	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado para todos os alvos virais. Ct ≤ 37 para o alvo RP	Rotina válida
	Detectado com Ct ≤ 37 para qualquer um dos alvos virais	Rotina inválida Repetir o teste. Possível contaminação.
Positivo MPXV/OPXV/VZV/RP	Ct ≤ 37 para os alvos MPXV/OPXV/VZV/RP	Rotina válida
	Ct >37 para os alvos MPXV/OPXV/VZV/RP	Rotina inválida Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de PCR.

13.2. Interpretação dos resultados

Na Tabela 06, estão descritos os critérios de aceitação para detecção dos alvos com relação ao valor de Ct obtido no ensaio de PCR em tempo real, onde se pode definir a análise como detectado ou não detectado.

Tabela 06: Critérios de aceitação para os alvos

Alvo	Valor de CT	Resultado
MPXV	Ct ≤ 37	Detectado
OPXV	Ct ≤ 37	Detectado
VZV	Ct ≤ 37	Detectado
RP	Ct ≤ 37	Detectado

OBS: Valores de 37 < Ct ≤ 40 são considerados "Não Detectado".

Na Tabela 07, estão descritos os critérios de interpretação de cada alvo com relação ao diagnóstico (detectado ou não detectado).



Tabela 07: Interpretação dos resultados

Alvo MPXV	Alvo OPXV	Alvo VZV	Alvo RP	Resultado
Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Detectado	Não Detectado para MPXV/OPXV/VZV
Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	MPXV Detectado
Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	MPXV Detectado ³
Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	OPXV detectado ⁴ Repetir amostra ⁵
Não Detectado	Não Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	VZV Detectado
Detectado	Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	VZV e MPXV detectado
Não detectado	Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado ¹	OPXV Detectado ⁴ VZV Detectado Repetir amostra ⁵
Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Inválido ² Repetir Amostra ⁵

Legenda:

- Quando os alvos MPXV/OPXV/VZV apresentarem o resultado "Detectado", o alvo RP poderá não ser avaliado para a conclusão do ensaio;
- Quando o alvo RP apresentar o resultado como "Não Detectado", e os alvos MPXV/OPXV/VZV/RP também forem "Não Detectados", é imprescindível que a repetição do ensaio seja realizada a partir de uma nova extração e uma nova amplificação com o Mix MPXV/OPXV/VZV/R, pois é indicativo de possíveis problemas na etapa de extração, devido a qualidade da amostra coletada e/ou volume insuficiente de extração (volumes inferiores a 200 µL). Neste caso, a extração deverá ser repetida e se o mesmo resultado permanecer, deve ser solicitada uma nova coleta;
- Quando o alvo MPXV apresentar o resultado "Detectado", com valor de Ct >35, devido a carga viral baixa, o alvo OPXV pode apresentar resultado "Não Detectado", pois apresentam cinética de amplificação diferentes;
- Quando o alvo OPXV apresentar resultado "Detectado" e o alvo MPXV apresentar resultado "Não Detectado", pode ser que a amostra seja positiva para um vírus do gênero Orthopox, mas não da espécie Monkeypox;

- Em caso de repetição do ensaio, se o resultado se mantiver, a amostra deverá ser encaminhada, para análise, ao Laboratório de Referência.

- O alvo MOCV não possui finalidade diagnóstica;

14. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

Evitar o uso de swabs alginatados ou de algodão para a coleta, pois interferem na PCR.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

15.1. Sensibilidade analítica e clínica

As análises PROBIT (IBM SPSS Statistics v16.0), considerando uma taxa de 95% de positividade e um intervalo de confiança (IC) de 95%, apresentaram sensibilidade estimada de:

1,15 cópias/µL (5,75 cópias/reacção) para o alvo OPXV, 0,08 cópias/µL (0,4 cópias/reacção) para o alvo MPXV e 0,14 cópias/µL (0,7 cópias/reacção) para o alvo VZV.

Observação: A quantificação das amostras foi realizada através da técnica de PCR digital ou kit de quantificação (PCR em tempo real) comercial, e as diluições seriadas foram extraídas utilizando o equipamento extrator Chemagic Prime (PerkinElmer). Sendo, os resultados obtidos aplicáveis somente a este kit e os números de cópias definidos por outros métodos não são necessariamente equivalentes.

Foram testadas 161 amostras MPXV e OPXV verdadeiras positivas, todas com qRT-PCR detectável e, destas, 96 amostras foram sequenciadas. Foram testadas, também, 50 amostras VZV verdadeiras positivas. O Kit IBMP Biomol Trio Pox apresentou 100% de concordância com os resultados.

15.2. Especificidade analítica e clínica

Não houve reação cruzada quando analisadas amostras verdadeiras positivas para Influenza A, Influenza B, RSV, Adenovírus, HIV, HCV, HBV, Zika, Chikungunya, Dengue, Sífilis, Parapox, Orthopox não Monkeypox, Sarampo, Rubéola.

Não foi observada similaridade significativa com Smallpox, Vaccinia e Cowpox em ensaios realizados por bioinformática. O Kit IBMP Biomol Trio Pox apresentou especificidades analítica de 100% e clínica de 99,9%. Foram testadas um total de 700 amostras, para MPXV, OPXV e VZV, destas 500 amostras de pacientes, verdadeiras negativas, com sintomatologia compatível com a clínica.

15.3. Exatidão

Conforme esperado, os valores de exatidão expressos pelo Erro Padrão Relativo (EPR %) mínimo foi de 0,04% e máximo de -2,27% para o alvo OPXV; mínimo foi de 0,09% e máximo de -3,56% para o alvo MPXV; mínimo foi de -0,34% e máximo de -3,17% para o alvo VZV.

15.4. Precisão

Para cálculo e avaliação da precisão do teste, foram utilizadas nos ensaios, replicatas de 6 diferentes concentrações, da diluição seriada da amostra clínica, previamente quantificada por PCR Digital. Foram obtidos os valores do coeficiente de variação (CV) de diluições para cada um dos alvos MPXV, OPXV e VZV.

Tabela 08: Coeficiente de variação de diluições para os alvos MPXV, OPXV e VZV

Kit IBMP Biomol Trio Pox MPXV						
Cópias / µL	2,67E+00	5,34E-01	2,67E-01	1,34E-01	6,68E-02	3,34E-02
CV (%)	1,03	1,53	2,23	3,15	3,08	3,85
Kit IBMP Biomol Trio Pox OPXV						
Cópias / µL	2,05E+03	1,02E+03	5,12E+02	2,56E+02	8,00E+00	1,60E+00
CV (%)	0,29	0,56	0,16	0,34	1,41	1,83
Kit IBMP Biomol Trio Pox VZV						
Cópias / µL	3,00E+02	1,50E+02	7,50E+01	3,75E+01	1,88E+01	9,38E+00
CV (%)	0,34	0,66	0,69	0,71	0,68	0,89

16. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Ao manusear qualquer um dos reagentes, observe as precauções necessárias. A qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento às boas práticas de laboratório tais como:

- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI): luvas descartáveis (sem talco) e jaleco em todas as etapas do teste;
- Após o uso, desprezar ponteiros, tubos, placas, reagentes, insumos/produtos no descarte de risco biológico;
- Desprezar a placa óptica, após a amplificação e detecção, em descarte biológico;
- Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização de cada módulo do kit, de acordo com os procedimentos de cada laboratório;
- Não usar reagentes com a validade vencida;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;



- O teste deve ser usado somente para monitoramento in vitro e USO PROFISSIONAL, de acordo com as instruções fornecidas no kit.

17. DESCARTE DE RESÍDUOS

Após o uso, os componentes do produto devem ser descartados em recipientes destinados ao lixo biológico. Os reagentes da etapa de extração (manual ou automatizada) devem ser descartados de acordo com a orientação do fabricante, conforme com a legislação vigente e regulamentos locais aplicáveis.

18. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO COMERCIAL

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e em instalações de acordo com normas internas de Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório. O fabricante garante a qualidade do kit mediante seu uso adequado, descrito nestas Instruções de Uso, bem como orientações dadas durante o treinamento fornecido ao usuário.