

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

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

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

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

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

3. APRESENTAÇÃO

Kit contendo um módulo de amplificação, suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético do vírus Mayaro (MAYV) e do vírus Oropouche (OROV), extraído de amostras de soro e plasma, obtidas de indivíduos com suspeita de febre do Mayaro e/ou febre do Oropouche.

Este produto também é destinado à detecção do material genético de MAYV e OROV em *pools* de mosquitos vetores dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Culicoides* e *Haemagogus*.

USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento em biologia molecular, especificamente em testes diagnósticos baseados em PCR em tempo real.



6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -15°C. A temperatura indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 30°C.

A manipulação do conteúdo de cada módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One utiliza a técnica da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

A reação de RT-qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma dos patógenos, em RNA extraído de soro ou plasma de humanos e em *pools* de mosquitos vetores. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA extraído da amostra biológica) seguida da qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One permite a identificação de MAYV e OROV, além de um controle interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do CI é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo molecular (oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em reação multiplex.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Amostras com resultados não detectáveis para os alvos moleculares pesquisados devem apresentar amplificação apenas do CI. A amplificação do CI indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador), além de refletir a qualidade do RNA extraído da amostra. Caso o CI não seja detectado, a amostra deve ter seu material genético extraído novamente. Entretanto, é importante ressaltar que amostras apresentando amplificação para os alvos

moleculares dos patógenos devem ter seu resultado considerado válido independente da amplificação do CI.

O kit possui um Controle Positivo (CP) sintético biosseguro (que não oferece risco biológico aos operadores ou ao ambiente), que deve apresentar resultado detectável para todos os alvos moleculares pesquisados, incluindo o CI. O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para o alvo pesquisado, exceto CI.

Esse kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência do alvo molecular. O produto não é validado para análise quantitativa.

Produto validado para uso com os seguintes termocicladores: 7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio 5 (Applied Biosystems), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e Amplio 96 (Loccus).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de soro ou plasma de humanos e de *pools* de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Culicoides* e *Haemagogus*.

8.1. Condições para coleta, manuseio, preparo e preservação de amostras

Amostra de soro

As amostras devem ser coletadas conforme métodos convencionais de punção venosa em tubo sem anticoagulante ou com ativador de coágulo. Processar a amostra para obtenção do soro conforme métodos convencionais.

Após a coleta e processamento, as amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C e 8°C por



até 6 horas. Após esse período, as amostras devem ser armazenadas entre -90°C e -70°C.

Amostra de plasma

As amostras devem ser coletadas conforme métodos convencionais de punção venosa em tubo com anticoagulante (EDTA). Processar a amostra para obtenção do plasma conforme métodos convencionais.

Após a coleta e processamento, as amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C a 8°C por até 6 horas. Após esse período, as amostras devem ser armazenadas entre -90°C e -70°C.

Amostra de vetores

As amostras de vetores dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Culicoides* e *Haemagogus* podem ser usadas com os mosquitos inteiros isolados ou em *pool* com até 20 indivíduos por tubo.

Após a coleta, as amostras de vetores devem ser conservadas e transportadas entre -90°C e -70°C até o processamento.

8.2. Extração de RNA

Deve-se realizar a extração de RNA das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter RNA cuja qualidade e integridade resultem no atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do RNA extraído

– RNA extraído deve ser armazenado entre -90°C e -70°C;
– Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear microrganismos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;

– Manter os tubos contendo RNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Master Mix contendo 650 µL;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 950 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 30 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 30 µL.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vórtex;
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga para placas de 96 posições;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, touca, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de RNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);

- Ponteiras livres de RNases e DNases com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0 mL.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Esse é um produto de uso múltiplo.

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até cinco ciclos de descongelamento, após os quais, eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas. Não é recomendado o congelamento/descongelamento da mistura de reação após o preparo.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

No momento do uso, os reagentes e amostras de RNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
- A utilização das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras de RNA no interior de cabines tipo PCR *Workstation*.



13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da mistura de reação

- Identificar o número de reações a serem realizadas, considerando a necessidade de inclusão de, pelo menos, um controle positivo e um controle negativo em cada corrida;
- Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, do CP e do CN;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes necessários para realização da corrida.

OBS.: Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 1. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

Componente	Volume para uma reação
Master Mix	6 µL
Oligomix	9 µL
Total	15 µL

- Na área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustado ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 15 µL da mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, seguindo o mapa da placa de reação;
- Selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

13.2. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5 µL de cada amostra de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL de Controle Negativo (CN) no poço correspondente na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo	Quencher
MAYV	ROX	None
OROV	FAM	MGB
CI	CY5	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE, quando aplicável;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01

Estágio 2	95	02 minutos	01
Estágio 3	95	15 segundos	40
	60*	60 segundos	

*Estágio para captura de fluorescência.

- Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 4, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 4. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500	MAYV	20.000	3 – 15
	OROV	100.000	3 – 15
	CI	20.000	3 – 15
7500 Fast	MAYV	20.000	6 – 15
	OROV	100.000	6 – 15
	CI	20.000	6 – 15
QuantStudio 5	MAYV	10.000	3 – 15
	OROV	50.000	AUTO
	CI	10.000	AUTO
CFX96	MAYV	70	6 – 15
	OROV	200	6 – 15
	CI	70	6 – 15
Amplio 96	MAYV	50	AUTO
	OROV	200	AUTO
	CI	50	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados



- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os alvos avaliados, apresentando $Ct \leq 33$;
 - Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os alvos MAYV e OROV e deve apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 33$;
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação dos alvos MAYV e OROV, e deve apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 36$;
 - Para que uma amostra seja considerada positiva para o vírus Mayaro, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo MAYV com $Ct \leq 40$, mesmo se não houver amplificação do controle interno;
 - Para que uma amostra seja considerada positiva para o vírus Oropouche, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo OROV com $Ct \leq 40$, mesmo se não houver amplificação do controle interno.
- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

Amostra			CP	CN		Resultado
MAYV	OROV	CI		Alvos virais	CI	
-	-	+	+	-	+	Vírus Mayaro e Oropouche não detectáveis
+	-	+/-	+	-	+	Vírus Mayaro detectável
-	+	+/-	+	-	+	Vírus Oropouche detectável

+	+	+/-	+	-	+	Vírus Mayaro e Oropouche detectáveis
-	-	-	+	-	+	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	Ensaio inválido

14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora de critério de aceitação

- **Curvas atípicas ou $Cts \leq 5,0$:** Amostras com valores de $Ct \leq 5,0$ ou ruído podem resultar de artefatos de análise devido a leituras abaixo do *Baseline*. Nestes casos, recomenda-se a verificação de amplificação na aba “*Multicomponent plot*”. Caso sejam usados os equipamentos 7500 ou 7500 Fast, é indicado que as análises sejam realizadas no software *Design and Analysis* versão 2.7.0 (ou superior);
- **Coinfecções:** O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One é capaz de discriminar coinfecções por MAYV e OROV, que são interpretadas por amplificações concomitantes nos canais FAM e ROX com $Ct \leq 40$;
- **Amostras inválidas:** Amostras que apresentem amplificação do CI com $Ct > 36$, na ausência de amplificação dos alvos virais, devem ter seu RNA extraído novamente;
- **Contaminação do CN:** A amplificação de alvos virais no CN é indicativa de contaminação do ensaio. Neste caso, o ensaio molecular deverá ser repetido. A reincidência deste resultado indica a necessidade de adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;
- **Ct tardio nos controles do kit:** Amplificações dos alvos correspondentes ao CP e CN com $Ct > 33$ indicam falhas operacionais, contaminação por inibidores ou degradação dos insumos, indicando que devem ser utilizados protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (consulte a seção TIPOS DE AMOSTRAS E MATRIZES APLICÁVEIS nesta Instrução de Uso);
- Amostras de soro, plasma e *pool* de mosquitos vetores podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por MAYV e/ou OROV;
- Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico durante a fase aguda da doença, até o 7º dia com sintomas.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite de detecção com *hit-rate* de 95% ($LoD_{95\%}$), foram testados nove pontos de diluição de RNA comercial quantificado de MAYV e OROV, com concentrações de 100 a 0,08 cópias/reação. O $LoD_{95\%}$ do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One definido a partir de vinte e quatro réplicas é 8,8 cópias/reação ($IC_{95\%}$ 4,0 a 36,9) para MAYV, e a partir de oito réplicas é 3,6 cópias/reação ($IC_{95\%}$ 1,5 a 45,4) para OROV.

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: vírus Chikungunya, vírus

da Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4), vírus da encefalite equina do leste, vírus da encefalite equina do oeste, vírus da encefalite equina venezuelana, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite do carrapato, vírus da febre amarela, vírus do Nilo Ocidental, vírus Ross River, vírus Zika, vírus da hepatite A, adenovírus, rinovírus humano, vírus sincicial respiratório humano, SARS-CoV-2, vírus influenza A, vírus influenza B, vírus da raiva, *Leptospira borgpetersenii* e *L. interrogans*.

16.3. Precisão

O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One apresenta coeficientes de variação inferiores a 6,7% no teste de repetibilidade e coeficientes de variação inferiores a 4,3% no teste de reprodutibilidade, ambos conduzidos por três operadores em três equipamentos distintos.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 374 amostras clínicas, previamente caracterizadas utilizando metodologia molecular. Os resultados estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One e o método de referência.

		Método de Referência		
		Detectável	Não Detectável	TOTAL
MAYV	Detectável	87	0	87
	Não Detectável	1	286	287
	TOTAL	88	286	374
OROV	Detectável	184	1	185



	Não Detectável	2	187	189
	TOTAL	186	188	374

Tabela 7. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

Alvo	Sens.	Espec.	VPP	VPN
MAYV	98,9% (CI95% 93,8 – 100)	100% (CI95% 98,7 – 100)	100% (CI95% 95,9 – 100)	99,7% (CI95% 97,6 – 100)
OROV	98,9% (CI95% 96,2 – 99,9)	99,5% (CI95% 97,1 – 100)	99,5% (CI95% 96,3 – 99,9)	98,9% (CI95% 95,9 – 99,7)

Legenda: Sens.: Sensibilidade diagnóstica; Espec.: Especificidade diagnóstica; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nesta Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucléico proveniente de outras fontes deve ser mitigado por meio da adoção de boas práticas de laboratório;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva. Mesmo não apresentando risco biológico para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação acidental de amostras ou do ambiente, o que pode levar a resultados falsos-positivos;
- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- Realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de misturas de reação e a etapa de PCR em áreas físicas

distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e do ambiente;

- Recomenda-se realizar o monitoramento periódico das instalações laboratoriais para garantir que não haja contaminação ambiental por ácidos nucleicos ou produtos de PCR que possam levar a resultados falsos-positivos.

18. DESCARTE DE RESÍDUOS

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.

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

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e as condições de armazenamento dos insumos;
- Devem ser utilizados instrumentos de medição e detecção calibrados e/ou qualificados, sempre que aplicável;
- As condições de coleta e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nesta Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de RNA obtidas de soro ou plasma humanos, ou de *pools* de mosquitos vetores. O uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.