



11. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Sempre usar luvas descartáveis sem pó durante o manuseio de amostras e reagentes para prevenir a contaminação por nucleases;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
- Respeitar a faixa de operação das micropipetas;
- 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;
- 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;
- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- 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 falsos-positivos.

12. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

12.1. 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 a posição de aplicação de cada amostra, do CP e do CN;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 2, os volumes necessários para realização da corrida.

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

Tabela 2. 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

- Em 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 2, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente a mistura de reação por vórtex suave ou pipetagem e centrifugar brevemente (spin);

- Distribuir 15 µL da mistura de reação em cada poço da 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.

12.2. 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).

12.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido, identificando a posição de cada amostra e dos controles;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme a Tabela 3.

Tabela 3. 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 4.

Tabela 4. 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.

13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

13.1. Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 5.

Tabela 5. 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
QuantStudio 6 Pro	MAYV	10.000	AUTO
	OROV	90.000	AUTO
	CI	20.000	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

13.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o CP deve apresentar amplificação para todos os alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 33;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o CN não deve apresentar amplificação para os alvos MAYV e OROV e deve apresentar amplificação do CI com Ct ≤ 33;
- O resultado da amostra será considerado não detectável quando não apresentar amplificação dos alvos MAYV e OROV, e obrigatoriamente apresentar amplificação do CI com Ct ≤ 36;
- O resultado da amostra será considerado detectável para o vírus Mayaro, quando apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo MAYV com Ct ≤ 40, mesmo se não houver amplificação do CI;
- O resultado da amostra será considerado detectável para o vírus Oropouche, quando apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo OROV com Ct ≤ 40, mesmo se não houver amplificação do CI.



Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. 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

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

– Amostras com valores de Ct ≤ 5,0 ou curvas de perfil atípico, semelhante a ruído que podem cruzar o Threshold podem resultar de artefatos de análise devido a leituras abaixo do Baseline. Nestes casos, recomenda-se a verificação de amplificação na aba “Multicomponent plot” Applied Biosystems ou “Raw Curve” em equipamentos Loccus. 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);

–O Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One é capaz de discriminar coinfeções por MAYV e OROV, que são interpretadas por amplificações concomitantes nos canais FAM e ROX com Ct ≤ 40;

– A ausência de amplificação ou amplificação do CI com Ct > 36 nas amostras que não apresentem amplificação dos alvos virais pode indicar problemas de coleta e armazenamento, ou no processo de extração. Nesses casos, recomenda-se testar a amostra novamente a partir de uma nova extração. Caso o perfil persista, convém realizar uma nova coleta, quando possível;

–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;

–Amplificações dos alvos presentes no CP e no CN com Ct > 33 podem indicar falhas operacionais, contaminação por inibidores

ou degradação dos insumos. Nesses casos considere utilizar protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos.

14. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

– O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (para mais detalhes, consulte o item 8 desta Instrução de Uso);

– Amostras de soro e plasma podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com este produto;

– 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.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

15.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite de detecção com *hit-rate* de 95% (LoD95%), foram testados nove pontos de diluição de RNA comercial quantificado de MAYV e OROV, com concentrações de 100 a 0,08 cópias/reacção.

O limite de detecção do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One, com confiança de 95% é 8,8 cópias/reacção (IC95% 4,0 a 36,9) para MAYV e 3,6 cópias/reacção (IC95% 1,5 a 45,4) para OROV.

15.2. 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 carapato, 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*.

15.3. 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.

15.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 390 amostras clínicas, previamente caracterizadas utilizando metodologia molecular. Os resultados estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. 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	302	303
	TOTAL	88	302	390
OROV	Detectável	196	1	197
	Não Detectável	2	191	193
	TOTAL	198	192	390

Tabela 8. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One.

Alvo	Sens.	Espec.	VPP	VPN
MAYV	98,9%	100,0%	100,0%	99,7%
	(CI95% 93,8 - 100,0)	(CI95% 98,8 - 100,0)	(CI95% 95,9 - 100,0)	(CI95% 97,7 - 100,0)
OROV	99,0%	99,5%	99,5%	99,0%
	(CI95% 96,4 - 99,9)	(CI95% 97,1 - 100,0)	(CI95% 96,5 - 99,9)	(CI95% 96,0 - 99,7)

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

16. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Os riscos associados ao kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche foram identificados, analisados e avaliados por meio do processo de gerenciamento de riscos. Sempre que necessário, foram implementadas medidas de controles apropriadas, sendo que os riscos residuais remanescentes foram considerados aceitáveis em relação aos benefícios proporcionados pelo produto para sua finalidade pretendida. Entre os riscos residuais identificados destacam-se:

– Resultados falso-negativos podem ocorrer quando a concentração do alvo na amostra estiver abaixo do limite de detecção (LoD) do ensaio;

– Resultados falso-negativos decorrentes de mutações ou variações genéticas nas regiões-alvo reconhecidas pelos iniciadores (primers) e/ou sondas, que possam comprometer a eficiência da amplificação e/ou detecção dos vírus;



- Resultados falso-positivos decorrentes de contaminação cruzada entre amostras, reagentes ou por produtos de amplificação, caso não sejam observadas as boas práticas laboratoriais;

- 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 nucleico 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.

Os riscos residuais descritos são considerados aceitáveis quando o produto é utilizado de acordo com as instruções, advertências, limitações e precauções estabelecidas nesta Instrução de Uso.

17. 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.

18. 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. O uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Mayaro e Oropouche One;

- Este produto é validado para o uso com os termocicladores 7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio 5, QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystems), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e Amplio 96 (Locus).