



KIT MOLECULAR MULTIPLEX OPXV/ MPXV/ VZV/ RP BIO-MAGUINHOS

TESTE PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOX, MONKEYPOX,
VARICELLA ZOSTER E RNASE P

(2 x 48 reações)

Conservar de -30 °C a -10 °C

Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT MOLECULAR MULTIPLEX OPXV/ MPXV/ VZV/ RP BIO-MANGUINHOS

Teste para detecção de Orthopox, Monkeypox, Varicella Zoster e RNase P

(2x48 Reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

Kit Molecular MULTIPLEX OPXV/ MPXV/ VZV/ RP Bio-Manguinhos

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

Kit molecular para detecção dos vírus Orthopox, Monkeypox e Varicella Zoster de Bio-Manguinhos, 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 desenvolvido é um ensaio quintuplex que detecta as regiões genômicas dos vírus Orthopox, Monkeypox 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 OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos se destina ao diagnóstico e vigilância epidemiológica de Orthopox, Monkeypox e Varicella Zoster.

O alvo (MOCV Mollusum Contagiosum) não tem finalidade diagnóstica por ainda estar em validação dos dados clínicos. A aprovação pela ANVISA para diagnóstico de MOCV se dará assim que os dados forem completados.

Produto destinado exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro*.

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO

Conjunto de Reagentes: -30 °C a -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.

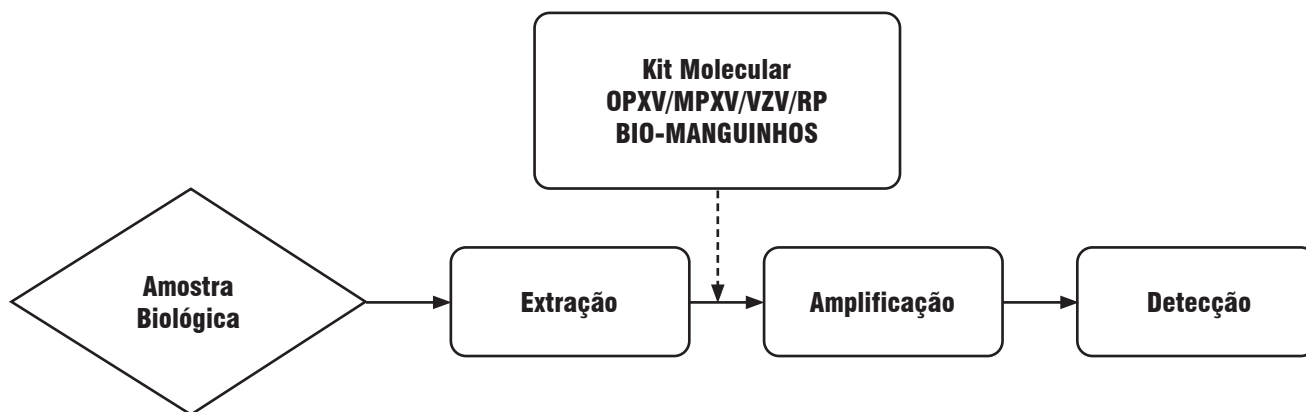
4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

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

Segue, abaixo, o fluxo metodológico:

- Etapa prévia de **extração** de ácido nucléico da amostra biológica;
- Amplificação** do ácido nucléico;
- Detecção** do ácido nucléico por PCR em tempo real.

Esquema do Teste:



• Etapa de Extração

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

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

• 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 **OPXV, MPXV, 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, QuantStudio 6 ou QuantStudio 7 da Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, em placas de 96 poços.

5. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

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 e 25 °C.

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

6.1 Relação dos componentes fornecidos com o produto

Conjuntos de reagentes	Componentes	Volume (µL)
Amplificação	Mistura de PCR	2 frascos com 275
	Mix OPXV/MPXV/VZV/RP	2 frascos com 550
Controles	Controle Negativo	1 frasco com 50
	Controle Positivo	1 frasco com 50

6.2 Materiais necessários não fornecidos

- Kit de extração de ácido nucléico;
- 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;
- Ponteiros 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;
- *Vortex*.

6.3 Software

BioLaudos partir da versão 2.3.0.

7. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO

O uso do Kit Molecular MULTIPLEX OPXV/ MPXV/ VZV/ RP Bio-Manguinhos processa uma rotina com 92 amostras clínicas ou 2 rotinas de 46 amostras clínicas.

8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO

8.1 Procedimento de Amplificação - ABI 7500 Real Time, QuantStudio 6 ou QuantStudio 7 em placa de 96 poços.

- 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 OPXV/MPXV/VZV/RP**, homogeneizar e centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos,

Preparo Manual das misturas de PCR OPXV/MPXV/VZV/RP:

- Adicionar ao microtubo de mistura de PCR, todo o volume de Mix **OPXV/MPXV/VZV/RP** de acordo a tabela abaixo (para 48 amostras):

Mistura de PCR OPXV/MPXV/VZV/RP

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

*Valores incluindo o volume morto de reação

- Homogeneizar a mistura de PCR **OPXV/MPXV/VZV/RP** com uma pipeta (evitando formação de bolhas) ou com o auxílio de um *vortex*;
- Fazer uma rápida centrifugação (*spin*);
- Distribuir a mistura de PCR **OPXV/MPXV/VZV/RP** na placa de amplificação, de acordo com a sugestão do desenho abaixo:
 - Adicionar 15 µL da mistura de PCR OPXV/MPXV/VZV/RP em cada poço da placa óptica.
- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes, conforme indicado no desenho da placa de amplificação:
 - Adicionar 5 µL de Controle Positivo no poço H6; e adicionar 5 µL de Controle Negativo no G6.
 - Adicionar 5 µL de amostras de pacientes nos demais poços, para detecção de OPXV/MPXV/VZV/RP de acordo com o esquema abaixo:

Esquema de distribuição da mistura de PCR OPXV/MPXV/VZV/RP na placa de amplificação 1 x 48 reações.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41						
B	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42						
C	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43						
D	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44						
E	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45						
F	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46						
G	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	CNEG						
H	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	CPOS						

Legenda:

CNEG – Controle Negativo | CPOS – Controle Positivo

- Após a adição na placa óptica da mistura PCR OPXV/MPXV/VZV/RP dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa óptica com selo óptico. **Utilizar o vortex 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.

8.2 Amplificação e detecção

Para instruções de instalação e utilização do Template (.edt) necessário para a corrida do equipamento de PCR em tempo real e para geração de laudo (software BioLaudos), entrar em contato com o SAC/DIACM de Bio-Manguinhos pelo moleculares@bio.fiocruz.br ou 0800 021 0310.

- Ligar o computador do equipamento de PCR em tempo real (ABI 7500 Real Time PCR System, QuantStudio 6 ou QuantStudio 7);
- 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 ícone para abertura do software do equipamento ABI 7500 Real Time PCR System, QuantStudio 6 ou QuantStudio 7;
- Após a inicialização do software, clicar no ícone **Template**;
- Abrir o **template: Detecção OPXV/MPXV/VZV/RP.edt**;
- Antes de iniciar a corrida, salvá-la;
- Clicar no ícone **Start Run**;
- Após o término da corrida, salvar a corrida (.eds) e copiá-la em um *pendrive*.

Para geração do laudo seguir as informações do Manual de Uso para Geração de Laudo no Software “BioLaudos” (Bio-Manguinhos).

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1 Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

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

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

9.2 Interpretação dos resultados

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

Alvo	Valor de Ct	Resultado
OPXV	$Ct \leq 37$	Detectado
MPXV	$Ct \leq 37$	Detectado
VZV	$Ct \leq 37$	Detectado
RP	$Ct \leq 37$	Detectado

OBS: Valores de $Ct > 37$ e ≤ 40 são considerados “Não Detectado”.

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

Interpretação de resultados OPXV/MPXV/VZV/RP				
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	MPXV detectado
Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	MPXV detectado**
Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado ou Não Detectado	OPXV Detectado*** Repetir amostra****
Não Detectado	Não Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado	VZV detectado
Detectado	Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado	VZV e MPXV detectado
Não Detectado	Detectado	Detectado	Detectado ou Não Detectado	OPXV Detectado*** VZV Detectado Repetir amostra****
Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Inválido* Repetir amostra****

- O alvo MOCV **não** possui finalidade diagnóstica;
- Todos os resultados deverão ser analisados de acordo com os critérios descritos nos itens “9.1 - Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo” e “9.2 - Interpretação dos resultados”;
- *Quando o **alvo RP** apresentar o resultado como “**Não Detectado**”, e os alvos **OPXV/MPXV/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 OPXV/MPXV/VZV/RP**;
- Valor de Ct do **alvo RP** como “**Não Detectado**” 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 os alvos **OPXV/MPXV/VZV** apresentarem o resultado “**Detectado**”, o **alvo RP** poderá não ser avaliado para a conclusão do ensaio;
- ** 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 o 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**.

10. 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.

11. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

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

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

12.1 Especificidade analítica e clínica

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

O KIT MOLECULAR MULTIPLEX OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos 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.

12.2 Sensibilidade Analítica

O teste é capaz de detectar 2 cópias/ μ L (15 cópias/reação) para o alvo OPXV; 1 cópia/ μ L (10 cópias/reação) para o alvo MPXV; 1 cópia/ μ L (10 cópias/reação) para o alvo VZV.

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/ μ L (5,75 cópias/reação) para o alvo OPXV, 0,08 cópias/ μ L (0,4 cópias/reação) para o alvo MPXV e 0,14 cópias/ μ L (0,7 cópias/reação) para o alvo VZV.

12.3 Sensibilidade Clínica

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 Molecular MULTIPLEX OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos apresentou 100% de concordância com os resultados.

12.4 Precisão

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

Kit Molecular OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos: OPXV						
Cópias/ μ L	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 Molecular OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos: MPXV						
Cópias/ μ L	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 Molecular OPXV/MPXV/VZV/RP Bio-Manguinhos: VZV						
Cópias/ μ L	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

12.5 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 0,42% e máximo de -3,17% 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.

13. 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.

14. DESCARTE DO PRODUTO

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.

15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

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.

16. RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Anvisa 80142170062

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-02 N° 021433/02

Fabricante:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4.365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro- RJ

CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira

Regularizado por:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Av. Brasil, 4.365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

CNPJ 33.781.055/0001-35

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ

CNPJ 33.781.055/0001-35

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro – RJ

SAC: 0800 021 0310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *Journal of Virological Methods*. 2010 Oct;169(1):223–7. 6. Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. *Molecular and Cellular Probes*. 2010 Apr;24(2):110–3.
- Maksyutov RA, Gavrilova EV, Shchelkunov SN. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 2016 Oct;236:215–20.
- Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol*. 1995 Aug;33(8):2069–76.
- Espy MJ, Cockerill III FR, Meyer RF, Bowen MD, Poland GA, Hadfield TL, et al. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):1985–8. T J Bosma, K M Corbett, S O'Shea, J E Banatvala, and J M Best. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples, *J Clin Microbiol*. 1995 May; 33(5): 1075–1079.doi: 10.1128/jcm.33.5.1075-1079.1995.