

KIT FEBRE AMARELA DISCRIMINATÓRIO

Bio-Manguinhos

(12 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT FEBRE AMARELA DISCRIMINATÓRIO BIO-MANGUINHOS

TESTE MOLECULAR PARA A DETECÇÃO E DISCRIMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DE
VÍRUS DE FEBRE AMARELA SELVAGEM E DE VÍRUS VACINAL
(12 REÇÕES)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

Kit Febre Amarela Discriminatório Bio- Manguinhos

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

A finalidade deste teste molecular é a detecção e discriminação de ácidos nucleicos de vírus de febre amarela provenientes de isolados americanos (selvagem) e de vírus vacinal, ou seja, reações adversas à vacina.

Nota: As amostras de RNA a serem avaliadas por este produto consistem nas amostras que obtiveram resultados positivos para o kit Febre Amarela Bio-Manguinhos.

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

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E MANUSEIO

O transporte do Módulo de Amplificação – Kit Febre Amarela Discriminatório Bio-Manguinhos - deve ser realizado em gelo seco (aproximadamente -80 °C) e o armazenamento deve ser feito entre -30 e -15 °C.

4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

O Kit Febre Amarela Discriminatório Bio-Manguinhos utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR). A RT-qPCR permite a detecção de sequências 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 (gerando 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 permite a identificação dos vírus da febre amarela selvagem (isolados americanos) e vacinal. O teste é realizado em uma reação multiplex, onde existem reagentes específicos para detecção e discriminação dos alvos para os vírus de febre amarela selvagem e vacinal. A amplificação do alvo vacinal (FAM) corresponde a uma reação adversa à vacina. Já a

amplificação do alvo selvagem (VIC) corresponde a presença de infecção causada por isolados americanos do vírus da febre amarela. A ausência de amplificação corresponde a um resultado negativo. Vale salientar que outros isolados não contemplados, como os isolados africanos, podem ocasionar ausência de amplificação mesmo na presença de RNA viral.

Já a amplificação do alvo vacinal juntamente com selvagem indica uma reação adversa a vacina e a presença de infecção por isolados americanos de febre amarela.

O kit possui um Controle Positivo que avalia a reação para o alvo febre amarela vacinal e selvagem e se comporta como um referencial de qualidade dos reagentes do processo como um todo, avaliando desde a extração até a obtenção dos resultados. A extração deste Controle Positivo é realizada da mesma maneira que as amostras em teste de febre amarela geral e o RNA do Controle Positivo deve ser mantido entre -90 °C e -65 °C até o momento do uso no teste discriminatório. Ainda, o kit contempla um Controle Negativo para garantir a ausência de amplificação.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo discriminatório, ou seja, permite a avaliação da presença ou ausência e discriminação de cada alvo molecular.

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

Amostras de soro ou plasma humano de pacientes com resultado positivo no Kit Febre Amarela Geral.

Cuidados no manuseio das amostras de RNA extraído:

- Utilizar técnicas assépticas;
- Usar sempre luvas de látex ou vinil durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por RNases.

Cuidados com as amostras:

- O RNA extraído de amostras deve ser aliquoteado e armazenado entre -90°C e -65°C;
- Para amostras positivas no teste de febre amarela geral indica-se o descongelamento de nova alíquota para a realização do teste discriminatório;
- O mesmo procedimento de extração de RNA descrito na Instrução de Uso do Kit Febre Amarela Bio-Manguinhos para a amplificação de Febre Amarela é indicado para o Controle Positivo deste kit.
- Não há necessidade de extração do Controle Negativo.

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit Febre Amarela Discriminatório Bio-Manguinhos é um Kit de amplificação de ácidos nucleicos para o total de 12 determinações (10 amostras, 01 poço para Controle Positivo e 01 poço para Controle Negativo). Ele é composto por:

6.1 Relação dos componentes fornecidos com o produto:

- 01 microtubo contendo 150 µL de Mistura de PCR;
- 01 microtubo contendo 10 µL de Enzima RT (Transcriptase reversa);
- 01 microtubo contendo 55 µL de Iniciadores (alvos: febre amarela selvagem e vacinal);
- 01 microtubo contendo 20 µL de Sondas (alvos: febre amarela selvagem e vacinal);
- 01 microtubo contendo 15 µL de Água RNase Free;
- 01 microtubo contendo 15 µL de Controle Negativo;
- 01 microtubo contendo 150 µL de Controle Positivo;

6.2 Materiais necessários não fornecidos:

- Equipamentos de Proteção Individual (jaleco, máscara descartável, óculos de segurança, luvas sem pó descartáveis);
- Tubos para diluição e armazenamento de amostras;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;

- Placa de PCR (96 poços) e adesivo óptico; ou
- Microtubo de 0,2 mL (em strip) e tampas ópticas (em strip);
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL);
- Ponteiras esterilizadas RNase e DNase Free com filtro (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL);
- Suporte/Estante para tubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Centrífuga para microplacas; ou
- Centrífuga para microtubos em strip;
- Centrífuga para microtubos;
- Cabine de segurança biológica;
- Agitador tipo vortex;
- 7500 Real-Time PCR Standard (Applied Biosystems).

7. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Recomenda-se utilizar o produto em sua totalidade. O estudo de estabilidade durante o uso demonstra que o produto pode ser utilizado até o terceiro ciclo de descongelamento dos componentes. Eventuais sobras após este ciclo (3º) devem ser descartadas.

8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO:

8.1 Procedimentos a serem realizados antes da utilização do produto

O Controle Positivo fornecido deve passar pelo processo de extração de RNA viral, assim como as amostras a serem analisadas

8.2. Recomendações para Procedimento de Controle de Qualidade

Resultados obtidos nas corridas serão validados se atenderem aos critérios descritos no item 9.2.

8.3 Procedimentos para Uso do Produto

Importante: Descongelar os reagentes e centrifugá-los (spin). Manter os reagentes em gelo durante todo o processo de preparo da reação.

8.3.1. Preparo da reação de RT-qPCR Febre Amarela Sel/Vac

• Identificar um tubo de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da reação. É necessário preparar um volume suficiente para 12 reações. Adicionar no tubo, devidamente identificado, os volumes conforme a tabela abaixo:

REAGENTE	VOLUME (µL)
Mistura de PCR	140,00
Iniciadores	44,80
Sondas	12,32
Enzima RT	5,60
Água RNase Free	7,28
TOTAL	210,00

- Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo da mistura de reação, centrifugar o tubo (spin) e distribuir **15,0 µL** do mix de reação em cada poço da placa ou microtubos em strip.
- Adicionar **5,0 µL** de RNA de amostra de pacientes positivos no teste Febre Amarela Geral previamente extraído em cada poço;

- Adicionar **5,0 µL** de RNA extraído de Controle Positivo no poço correspondente;
- Adicionar **5,0 µL** de Controle Negativo (não necessita extração) no poço correspondente;
- Selar a placa com adesivo óptico ou fechar os microtubos utilizando tampas ópticas e proceder com breve centrifugação (spin).

8.3.2 PCR em tempo real

- Ligar a máquina 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e o respectivo computador;
- Abrir o programa do equipamento (7500 Software) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas;
- Inserir as amostras no equipamento com as posições dos poços dispostas conforme dispensadas;
- No software, selecionar ***New Experiment***;

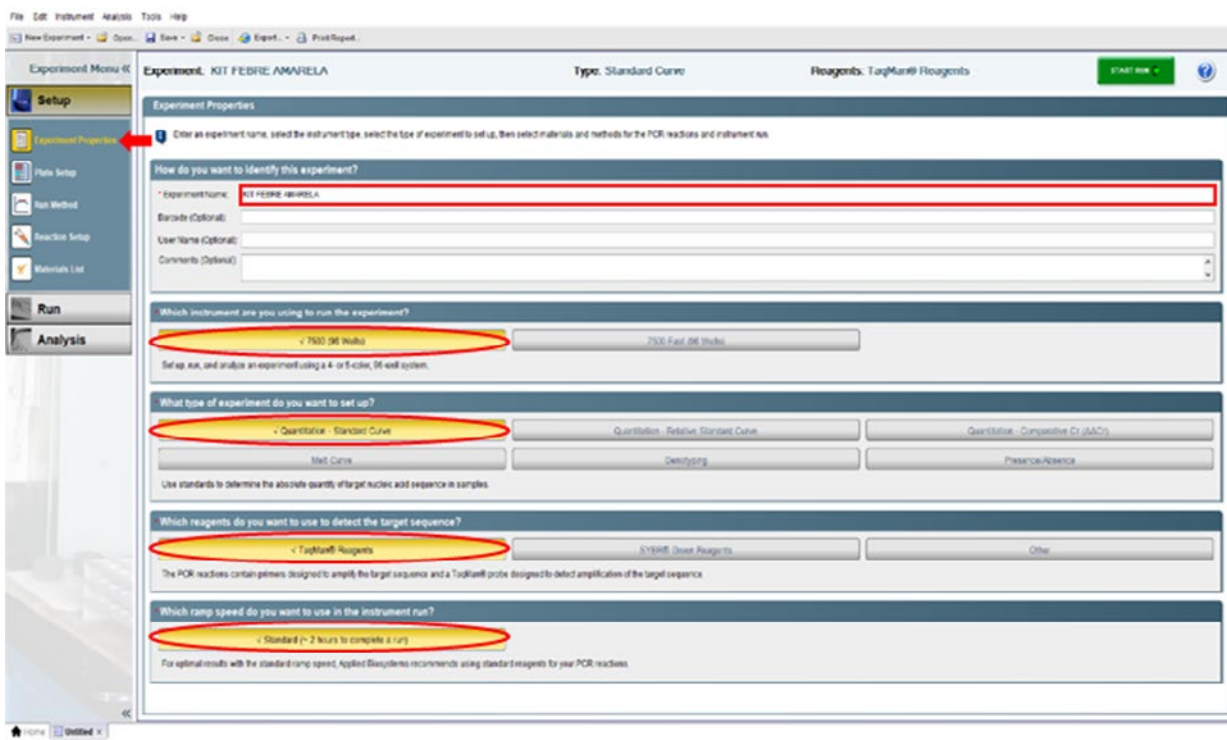


- No menu ***Setup***, submenu ***Experiment Properties***, inserir o nome do experimento em “***Experiment Name***”;

Selecionar **7500 (96 Wells)** em “Which instrument are you using to run the experiment?”;
 Selecionar **Quantitation – Standard Curve** em “What type of experiment do you want to set up?”;

Selecionar **TaqMan® Reagents** em “Which reagents do you want to use to detect the target sequence?”;

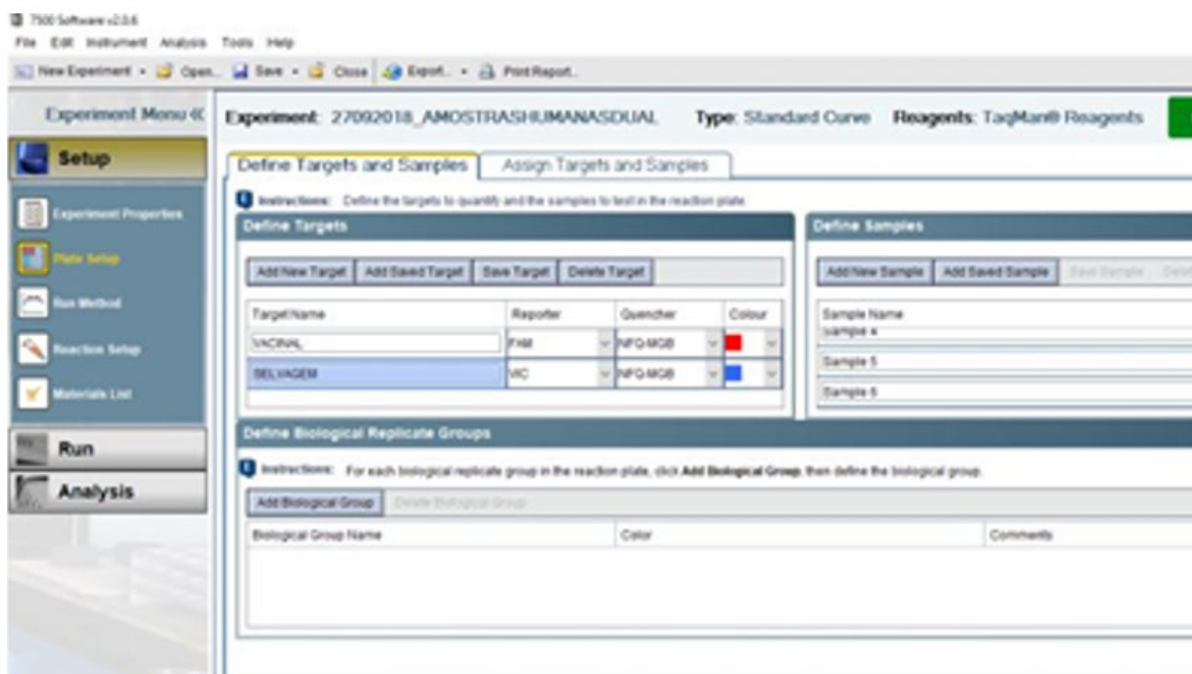
Selecionar **Standard (~2 hours to complete a run)** em “Which ramp speed do you want to use in the instrument run?”



- Ainda no menu **Setup**, selecionar o submenu **Plate Setup**;
- Na aba **Define Targets and Samples**, seção **Define Targets**, adicionar 02 alvos clicando no botão **Add New Target**. Incluir nessa seção os dados conforme a tabela abaixo:

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
VACINAL	FAM	NFQ-MGB	Red
SELVAGEM	VIC	NFQ-MGB	Blue

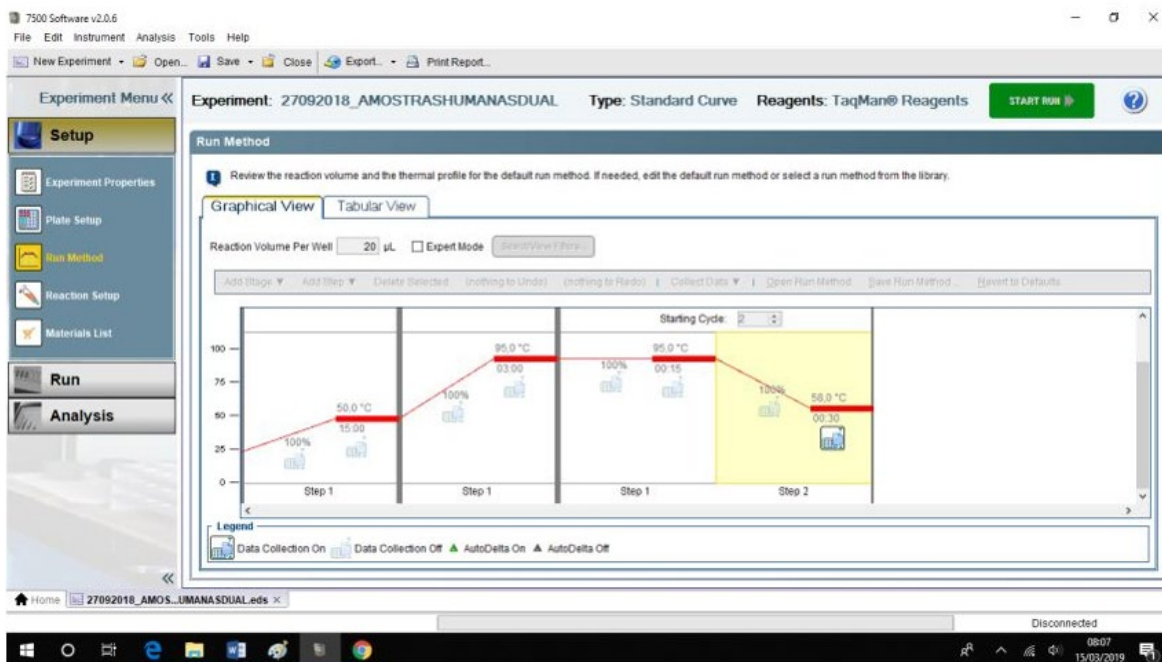
- Na seção **Define Samples**, adicionar os campos de amostra clicando no botão **Add New Sample**. Identificar os campos correspondentes de acordo com a posição na placa;
- Na aba **Assign Target and Samples**, selecionar a placa completamente e identificar os **Targets** selecionando os alvos Vacinal e Selvagem;
- Selecionar cada poço da placa e atribuir a amostra que corresponde àquele poço na seção **Assign sample(s) to the selected wells**;
- Selecionar **None** em **Select the dye to use as the passive reference**;



- No submenu *Run Method*, aba *Graphical View*, alterar o volume de reação para **20 µL** em *Reaction Volume Per Well*;

Alterar o número de ciclos para **45** em *Number of Cycles*. No gráfico, alterar as temperaturas e durações para os seguintes valores:

Etapa	Temperatura (°C)	Duração(mm:ss)
Holding Stage	50	15:00
Holding Stage	95	03:00
Cycling Stage (45x)	95	00:15
	58	00:30



- No menu *Run*, clicar no botão **START RUN**. Uma janela será aberta e o usuário deverá digitar o nome do arquivo da corrida que será salvo em formato **.eds**.



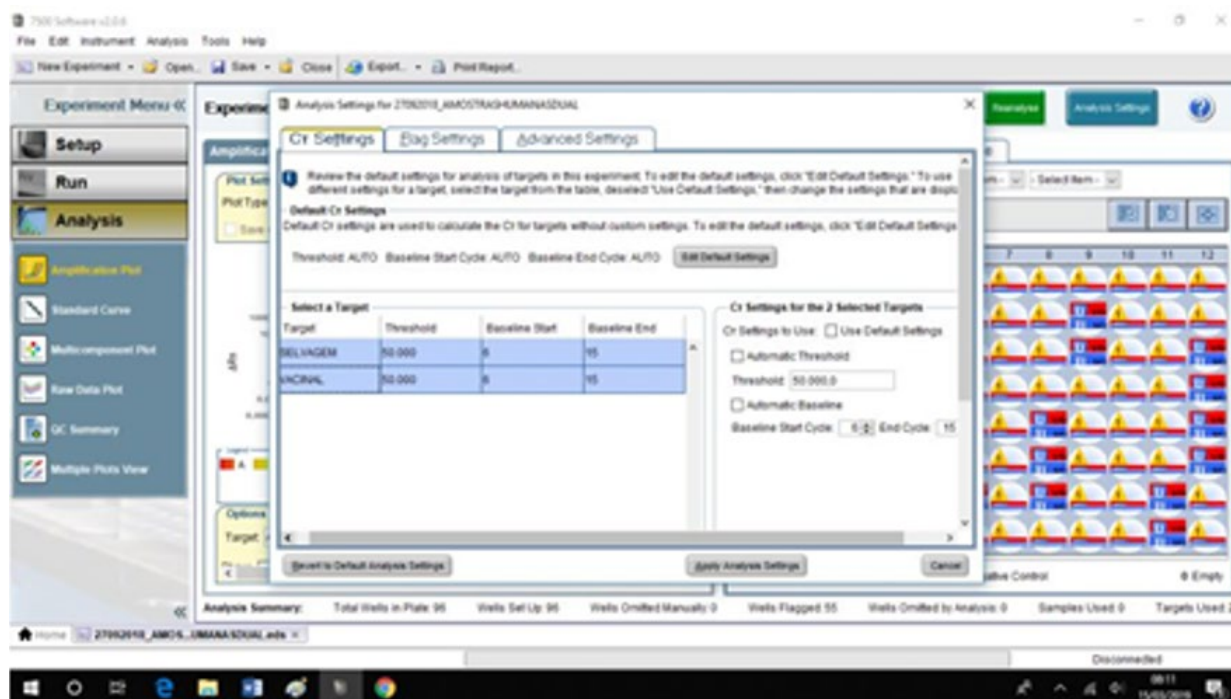
9. OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. Parâmetros de análise dos resultados

- No menu *Analysis*, selecionar *Analysis Settings*;
- Uma janela de configurações de análise abrirá. Nessa janela, na aba *Ct settings*, desafixar os itens *Use Default Settings*, *Automatic Threshold* e *Automatic Baseline* para cada alvo e inserir os valores representados na tabela abaixo:

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Febre Amarela Selvagem	50.000	6	15
Febre Amarela Vacinal	50.000	6	15

- Clicar em *Apply Analysis Settings* e, em seguida, *Analyse*;



9.2. Interpretação dos resultados

Controle Positivo (CP):

- O poço de CP deve apresentar amplificação dos alvos para febre amarela vacinal (FAM) e para febre amarela selvagem (VIC), mimetizando uma amostra positiva (isolado americano e reação adversa a vacina) para ambos os alvos.

Controle Negativo (CN):

- O poço de CN não pode apresentar nenhuma amplificação, tanto para o alvo febre amarela vacinal (FAM) quanto para febre amarela selvagem (VIC).

Amostras:

- A amplificação típica, com curva apresentando $Ct \leq 45$ caracteriza um paciente positivo, conforme tabela abaixo:

Resultado	Ct de Febre Amarela Selvagem isolados americanos (VIC)	Ct de Febre Amarela Vacinal (FAM)
Presença de RNA de isolados americanos	≤ 45	Ausência de amplificação
Presença de RNA da cepa vacinal	Ausência de amplificação	≤ 45
Presença de RNA de isolados americanos e Presença de RNA da cepa vacinal	≤ 45	≤ 45

- Resultado negativo, caracterizado pela ausência de amplificação de ambos os alvos, proveniente de amostra positiva para febre amarela geral. Este resultado pode caracterizar isolado do vírus da febre amarela não contemplado no teste e merece um estudo aprofundado.

10. USUÁRIO PRETENDIDO

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

11. Interferentes e limitações do ensaio

- O produto é de caráter qualitativo, ou seja, não permite a detecção de carga viral;
- O produto não é capaz de detectar linhagens africanas do vírus da febre amarela;
- Resíduos de etanol provenientes do processo de extração podem interferir na reação de RT – qPCR;
- Recomenda-se que a extração seja realizada com RNA QIAamp Viral Mini kit (Qiagen®).

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O teste é qualitativo e discriminatório permitindo identificar a presença ou ausência de RNA de vírus da febre amarela selvagem e vacinal no soro/plasma de um indivíduo que apresente Ct de amplificação ≤ 45 .

12.1 Sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi verificada ajustando-se ao modelo Probit (LOD 95%) para determinar a diluição na qual se espera obter detecções em 95% das replicatas Vacinal e Selvagem. Os dados baseiam-se em amostras detectadas (amplificação) e não detectadas (não amplificação). A sensibilidade analítica vacinal é de 1,21 cópias/reação e o Selvagem é de 1,6 cópias/reação.

Especificidade analítica

A Especificidade Analítica do Kit foi realizada testando em culturas de Vírus Zika, Dengue (1,2,3,4) e Chikungunya. Os resultados mostraram que não houve amplificação para nenhuma dessas amostras.

Precisão

Para a definição da precisão de medição foram testadas diluições seriadas de cultura Vacinal e Selvagem em plasma negativo, com o objetivo de calcular a repetibilidade e reprodutibilidade para cada alvo do kit, vírus Vacinal e vírus Selvagem. Essa avaliação foi feita por 2 operadores distintos com 8 réplicas para cada diluição. Valores de desvio padrão relativo menores que 25% foram considerados satisfatórios.

Os valores de desvio padrão relativo da repetitividade e reprodutibilidade para os vírus Vacinal e Selvagem foram menores que 25% e então, considerados satisfatórios nas condições analisadas.

Sensibilidade e Especificidade diagnóstica

A análise de um painel contendo 136 amostras rastreáveis, composto por 82 amostras negativas para febre amarela e 54 amostras positivas para o vírus (caracterizadas por testes in house para febre amarela geral), apresentou Valor Preditivo Negativo de 93% e Valor Preditivo Positivo de 91%.

Os valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica calculados foram de 89% e 94% respectivamente.

*Devemos citar que algumas amostras positivas para febre amarela geral podem não estar contempladas pelo desenho do teste que discrimina apenas a linhagem vacinal de linhagens americanas do vírus.

13. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Este produto deve ser manipulado por profissionais de acordo com esta instrução de uso;
- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, luvas descartáveis sem pó, óculos de segurança e máscara cirúrgica durante o uso deste produto;
- Não utilizar reagentes vencidos;
- A temperatura do ambiente indicada para manipulação do produto é até 25 °C;
- Medidas como realizar a limpeza adequada do ambiente, bancadas e dos equipamentos onde o produto será manipulado, além do uso de tubos e plásticos estéreis, livre de nucleases e descartáveis, bem como utilização de EPIs como luvas e máscaras reduzem o risco de contaminação do produto com material genético não oriundo da amostra;
- O Controle Positivo (CP) deve ser tratado como uma amostra positiva. Embora não apresente risco de contaminação para humanos, este produto deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras manipuladas em paralelo, evitando assim, resultados falsos-positivos;
- Para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações, recomenda-se realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, preparo de reações e PCR em áreas distintas;
- Ao término da reação evitar abrir as placas de PCR, para reduzir risco de contaminação do ambiente com produtos de PCR gerados na reação;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em cabines de segurança biológica;
- 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, utilizar equipamentos de medição calibrados/qualificados, conforme instruções de seus fabricantes.

14. DESCARTE DO PRODUTO

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.

15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante. Caso contrário, o fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos;
- 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/qualificado e mantido conforme instruções do fabricante.

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

Registro MS 80142170059

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES nº: 21433-02.

Fabricante Legal:

Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz/ Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos- Bio-Manguinhos
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro- RJ

CNPJ: 33.781.055/0001-35

Unidade fabril:

Instituto de Biologia Molecular do Paraná
Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775

Cidade Industrial – Curitiba – PR CEP 81.350-010

CNPJ: 03.585.986/0001-05

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

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos

CNPJ 33.781.055/0015-30

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

SAC: 08000.210.310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

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

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO