

INSTRUÇÕES DE USO

XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOXVÍRUS

KIT QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOXVÍRUS

1. FINALIDADE E MODO DE USO

O kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOXVÍRUS* é um teste de PCR em tempo real desenhado para a identificação qualitativa de *Orthopoxvirus*, incluindo o vírus Mpox em amostras clínicas de indivíduos suspeitos de infecção. Este teste destina-se a ser utilizado como um auxílio no diagnóstico da infecção pelo vírus Mpox em combinação com fatores de risco clínicos e epidemiológicos. O DNA é extraído de amostras clínicas e posteriormente amplificado por PCR em tempo real e detectado usando sondas específicas *Orthopoxvirus***.

IMPORTANTE: *A identificação de *Orthopoxvirus* deve-se a homologia de primers G2R para os vírus Variola vírus, Camelpox vírus e Cowpox vírus, além do vírus Mpox. Apesar disso, após verificação das mutações, foram consideradas improváveis suas amplificações neste kit de detecção de PCR em tempo real. Em 1980, a Assembleia Mundial da Saúde declarou a Variola (Variola vírus) erradicada. A doença de Camelpox por sua vez, é restrita a camelos. Não há evidência conhecidas de transmissão de humano para humano do vírus Cowpox. Casos humanos esporádicos foram relatados na Europa, relacionados ao manuseio de animais infectados. Em todos os casos, recomenda-se a interpretação dos resultados juntamente com o quadro clínico apresentado pelo paciente.

**O kit XGEN PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOXVÍRUS não realiza a diferenciação entre as cepas de Mpox da Bacia do Congo e África Ocidental, é recomenda a utilização de técnicas complementares, como o método de sequenciamento, para diferenciação entre o vírus e seus dois clados.

PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

1. 1 INTRODUÇÃO

Orthopoxvirus é um gênero caracterizado por grandes vírus de DNA de fita dupla e que pertencem a família *Poxviridae*. As infecções por Orthopoxvirus são raras, mas incluem espécies clinicamente relevantes, como o vírus vaccínia, o vírus da varíola bovina, vírus da varíola e o vírus Mpox (MPXV), que apresentou um novo surto global no último ano, tendo sua relevância clínica destacada.

O MPXV é transmitido aos seres humanos por meio do contato com um animal ou humano infectado ou com material contaminado pelo vírus. A transmissão do vírus pode ocorrer através do contato com animais vivos ou mortos, através de mordida ou arranhão, manipulação e ingestão da carne, contato direto com fluidos corporais ou lesões de um animal infectado ou material contaminado. Já a transmissão de Mpox entre humanos ocorre principalmente através de gotículas respiratórias durante contato direto e prolongado. Além disso, Mpox pode ser transmitido por contato direto com fluidos corporais de uma pessoa infectada ou com objetos contaminados, como vestimentas ou roupas de cama, e através do contato sexual. O vírus entra no corpo através de feridas na pele, trato respiratório ou membranas mucosas. O período de incubação geralmente é de 6 a 13 dias, mas pode variar de 5 a 21 dias.

A doença causada pelo vírus Mpox muitas vezes inicia com uma combinação dos seguintes sintomas: febre, dor de cabeça, calafrios, exaustão, astenia, inchaço do linfonodo, dor nas

costas e dores musculares. Comumente, dentro de um a três dias após o início da febre, o paciente desenvolve erupções cutâneas, que tendem a aparecer primeiro no rosto e depois se espalham para outras partes do corpo, incluindo mãos e pés. As lesões cutâneas frequentemente apresentam-se pela primeira vez como máculas, evoluindo sucessivamente para pápulas, vesículas, pústulas e crostas. O estudo de marcadores imunológicos forneceu evidências de infecções assintomáticas de MPXV em indivíduos vacinados e não vacinados contra varíola. Para a maioria das pessoas, a doença causada pelo MPXV é autolimitada, geralmente com duração de duas a quatro semanas, que resulta em uma recuperação completa.

Os principais objetivos da vigilância e investigação são identificar rapidamente casos, agrupamentos e as fontes de infecção o mais rápido possível a fim de fornecer um cuidado clínico ideal, isolar casos para evitar maior transmissão, identificar e gerenciar contatos e adaptar métodos de controle e a prevenção baseados nas rotas de transmissão mais comumente identificadas. Neste contexto, a PCR em tempo real para detecção de *Orthopoxvirus* poderá auxiliar também no diagnóstico de Mpox e é a metodologia de escolha devido a sua precisão e sensibilidade.

2. ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

Os componentes do kit devem ser transportados e armazenados na embalagem original à temperatura de +2°C a +40°C. O produto estocado corretamente é estável até a data de vencimento indicada no rótulo. Uma vez que o controle positivo tenha sido reconstituído, devem ser armazenados a -20°C. Após reconstituída, a MIX pode ser armazenada a temperatura ambiente por até 4 horas, para longos períodos, armazenar a -20°C.

É recomendado fazer alíquotas do Controle Positivo e MIX para minimizar os ciclos de congelamento/descongelamento. O Controle Positivo e MIX são estáveis por até 6 ciclos de congelamento/descongelamento. Manter os componentes protegidos da exposição a luz.

3. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* foi desenvolvido para a identificação de *Orthopoxvirus* em amostras de *swab* de lesão. Após o isolamento do DNA, a detecção do vírus é realizada pela amplificação de uma região conservada dos genes G2R e F3L, usando primers específicos e sondas fluorescentes.

O kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* é baseado na atividade de 5'exonuclease da polimerase de DNA. Durante a amplificação do DNA, esta enzima cliva a sonda ligada à sequência de DNA complementar, separando o corante *quencher* do corante repórter. Essa reação gera um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à quantidade de sequências alvo. Esta fluorescência pode ser medida em plataformas PCR em tempo real.

4. AMOSTRA

4.1 TIPOS

O ensaio é para uso com ácido nucléico extraído de amostras de *swabs* de lesões (exsudato, crosta e topo) de pacientes com suspeita de infecção por *Orthopoxvirus*, incluindo o vírus Mpox.

4.2 CONDIÇÕES PARA COLETA

As amostras clínicas devem ser coletadas e rotuladas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra) e processadas o mais rapidamente possível para garantir a qualidade do teste.

4.3 MANUSEIO

As amostras devem ser transportadas e armazenadas entre 2°C e 8°C até uma hora após a coleta. Para transporte a longo prazo, é recomendado o transporte a -20°C.

Recomenda-se a utilização imediata das amostras para os testes. Caso não sejam utilizadas imediatamente, é recomendado armazená-las congeladas a -20°C ou preferencialmente a -80°C por períodos maiores. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

4.4 PREPARO E PRESERVAÇÃO

Quando utilizar amostras congeladas, só descongelar no momento da extração, a fim de evitar possíveis casos de degradação do ácido nucléico.

Realizar a preparação da amostra de acordo com as recomendações descritas nas instruções de uso do kit de extração utilizado. Para extração de DNA a partir de amostras clínicas, pode ser utilizado qualquer kit de extração de DNA comercialmente disponível, tanto manuais quanto automatizados, seguindo as instruções do fabricante.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO, ACESSÓRIOS E SOFTWARE

O formato padrão do kit contém reagentes para 24, 48 ou 96 testes.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE	QUANTIDADE	QUANTIDADE
		24 TESTES XG-MKP-MB24	48 TESTES XG-MKP-MB48	96 TESTES XG-MKP-MB96
MIX	Mistura de enzima, tampão, dantes, <i>primers</i> e sondas específicas para detecção de <i>OPXV</i> e controle interno endógeno liofilizado	1 frasco ¹ (24 reações)	2 frascos ¹ (48 reações)	4 frascos ¹ (96 reações)
TR	Tampão de Reidratação	1 frasco x 1,8 mL	1 frasco x 1,8 mL	1 frasco x 1,8 mL
CP	Controle Positivo contendo DNA sintético não infeccioso liofilizado	1 frasco ^{1,2}	1 frasco ^{1,2}	1 frasco ^{1,2}
CN	Controle Negativo	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL
H2O	Água livre de RNase/DNase	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL	1 frasco x 1 mL

¹O tubo de MIX e CP liofilizados (antes de sua reconstituição) contém aproximadamente 1,5mg de conteúdo.

²O conteúdo de CP será reconstituído em 100 µL de Água livre de RNase/DNase, a partir disso, recomenda-se a utilização de apenas um poço (5 µL) por placa de teste.

5.1 MIX

Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo dos tubos.

Reconstituir a mix na área pré-PCR do laboratório. Abrir o tubo da mix liofilizada com cuidado para evitar que o *pellet* se desfaça e adicionar 390 µL do Tampão de Reidratação fornecido no kit. Homogeneizar gentilmente com a pipeta. Centrifugar brevemente (pulso) para remover bolhas geradas durante a homogeneização.

Após reconstituída, a MIX pode ser mantida em 20 a 30°C ou 2 a 8°C por até 4 horas, para longos períodos, armazenar a -20°C. É recomendado separar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento/descongelamento.

5.2 TAMPÃO DE REIDRATAÇÃO

Solução pronta para uso.

5.3 CONTROLE POSITIVO (CP)

Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

Recomenda-se que o controle positivo do seja manipulado em uma área de laboratório separada dos outros componentes. Reconstituir o controle positivo liofilizado em 100 µL da água livre RNase/DNase fornecida no kit. Uma vez que o Controle Positivo tenha sido reconstituído, armazenar a -20°C. É recomendado armazenar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento/descongelamento.

5.4 CONTROLE NEGATIVO (CN)

Solução pronta para uso.

5.5 ÁGUA LIVRE DE DNASE/RNASE

Solução pronta para uso.

6. ITENS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

✓ Micropipetas (0,5 µL < volume < 1.000 µL);

IMPORTANTE: Devem estar calibradas para distribuir o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a regulares descontaminações das partes que podem acidentalmente entrar em contato com a amostra. Elas devem ser certificadas e devem estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e exatidão de ± 5%.

✓ Microcentrífuga;

✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;

Racks para Tubos;

✓ Ponteiras Estéreis com Filtro;

✓ Microtubos Livre de Nuclease;

✓ Luvas Descartáveis Sem Talco;

✓ Cabine de fluxo laminar;

✓ Termociclador para PCR em Tempo Real devidamente calibrado conforme orientação do fornecedor;

✓ Kit de extração de DNA.

7. ESTABILIDADE EM USO

Quando em uso, o kit apresenta uma estabilidade de até 4 horas a temperatura ambiente e em condições de luz normal. É indicado minimizar a exposição dos componentes do kit à luz. Os componentes armazenados sob outras condições que não as especificadas no rótulo podem não proporcionar um desempenho correto, afetando negativamente os resultados dos testes.

8. ORIENTAÇÕES GERAIS

- O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e treinado na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
- Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- Os responsáveis pelo manuseio de amostras devem ser vacinados contra tétano, difteria, hepatite B e os estabelecidos no PCMSO, de acordo com a Norma Regulamentadora 32.
- Os resíduos gerados durante a utilização do kit devem ser descartados de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

9. RECOMENDAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE

- Não utilizar reagentes ou materiais fora da data de validade.
- Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
- Ligar o termociclador, verificar as configurações e conferir se o protocolo de ensaio está correto.
- Seguir estritamente o manual do equipamento fornecido pelo fabricante para a correta configuração do termociclador em Tempo Real.
- Não trocar os componentes entre diferentes lotes do produto. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
- O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes.
- Utilizar ponteiras descartáveis, trocando-as após a manipulação de cada reagente para evitar contaminações cruzadas. Da mesma forma, trocar as ponteiras após a manipulação de cada amostra.
- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, iniciando com o preparo dos reagentes (pré-PCR), passando para a extração de amostras (pré-PCR) e finalizando nas áreas de amplificação e de análises de dados (pós-PCR). Não compartilhar reagentes e equipamentos entre as diferentes áreas.

IMPORTANTE: A circulação de pessoas e equipamentos provenientes da área de amplificação para a área de preparo de reagentes deve ser evitada fortemente, para que não haja a contaminação das áreas pré-PCR com material amplificado.

- Recomenda-se a descontaminação regular de equipamentos comumente utilizados, especialmente micropipetas e superfícies de trabalho.

10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS, INTERPRETAÇÃO

10.1 CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

O kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* contém Controles Positivo e Negativo que devem ser incluídos em cada execução para interpretar corretamente os

resultados. Além disso, o controle interno endógeno (CI) em cada poço de reação confirma o desempenho correto da técnica.

10.2 PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

1. Adicionar 15 µL da MIX reconstituída em cada poço de acordo com o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles.
2. Adicionar 5 µL de DNA extraído de cada amostra, Controle Positivo reconstituído e Controle Negativo em poços diferentes e fechar a placa/microtubos.
3. Centrifugar brevemente a placa/microtubos.
4. Colocar a placa/microtubos no termociclador de PCR em Tempo Real.
5. Após configurar a programação como descrito nos subitens 10.3 PROGRAMAÇÃO DA PCR e 10.4 SELEÇÃO DE DETECTORES, iniciar a corrida no termociclador.

Abaixo está um exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e reagentes do kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* na placa de PCR.



LEGENDA:

- A1 - A7: Amostras
- CP: Controle Positivo
- CN: Controle Negativo
- FUNDO AMARELO: Mistura de Amplificação

10.3 PROGRAMA DA PCR

A programação deve ser feita conforme descrito a seguir. Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
<i>Hold</i>	95°C	2 min.	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95°C	10 seg.	45
	60°C (*)	50 seg.	

10.4 SELEÇÃO DOS DETECTORES

Selecionar os detectores informados na tabela abaixo, conforme o manual de instrução do equipamento a ser utilizado.

ALVO	GENE	REPORTER
OPXV	G2R e F3L	FAM
CI	HBB (<i>β</i> -globina)	HEX/VIC/JOE

10.5 CONFIGURAÇÕES PRÉ-ANÁLISE

É necessária a realização de ajuste de configuração para avaliação dos parâmetros de validação da corrida. Recomenda-se definir os valores de limite (*threshold*) para cada canal (alvo) independentemente. Use a curva de amplificação do controle positivo como ponto de partida durante a validação da execução (antes da interpretação de resultados amostrais do paciente), a fim de garantir que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo (*background*). O valor do limite (*threshold*) para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades de sinal.

10.6 VALIDAÇÃO DA CORRIDA

Validar a corrida como descrito na tabela a seguir:

CRITÉRIO	OPXV (FAM)	CI (HEX/VIC/JOE)	RESULTADO DO ENSAIO
Controle Negativo	> 40 ou nenhum sinal	>40 ou Não detectado*	Válido
Controle Positivo	≤40	≤40	Válido

NOTAS:

* É possível que amplificações não específicas em valores de Ct tardios (Ct>35) possam aparecer devido à manipulação humana do processo, uma vez que o gene *HBB* é um gene constitutivo humano, espera-se que esteja presente em todas as células humanas nucleadas.

Nos casos em que um ou ambos os controles falham (é observado um sinal de amplificação no controle negativo e/ou ausência de sinais no controle positivo para qualquer canal), todos os resultados são considerados "inválidos" e será necessário repetir o ensaio.

O controle positivo inclui o alvo genético *HBB* presente no DNA humano, portanto, os sinais de amplificação são observados em todos os canais-alvo, incluindo o Controle interno endógeno (CI).

Se todos os controles estiverem dentro dos intervalos especificados, validando a corrida, verificar as amostras clínicas.

10.7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A avaliação dos resultados dos testes das amostras clínicas deve ser realizada após a análise dos controles positivos e negativos. Se um ou mais controles não forem válidos, os resultados do paciente não poderão ser interpretados.

Para interpretação dos resultados individuais do paciente, utilize a tabela a seguir, leia e analise os resultados:

OPXV (FAM)	CI (HEX/VIC/JOE)	RESULTADO DA AMOSTRA
≤40	≤ 40 ou Não detectado*	Positivo Válido
>40 ou nenhum sinal	≤ 35**	Negativo Válido
>40 ou nenhum sinal	> 35 ou nenhum sinal**	Inválido

NOTAS:

* A alta concentração de DNA de MPXV/OPXV (SINAL DE FAM POSITIVO) pode levar a um sinal REDUZIDO ou AUSENTE do Controle Interno devido à competição entre os reagentes.

** Em amostras negativas, o CI deve apresentar um sinal de amplificação com $Ct \leq 35$. O valor de Ct pode ser muito variável devido ao controle interno endógeno ser um gene constitutivo humano presente em todas as células nucleadas humanas das amostras originais. Se houver ausência de sinal ou valor de $Ct > 35$ do controle interno endógeno, o resultado é considerado INVÁLIDO, e é necessário novo teste. Recomenda-se repetir a corrida diluindo a amostra de DNA 1:10 e/ou 1:100, ou extrair e testar novamente para verificar se há possível falha no procedimento de extração e/ou problemas de inibição.

11. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

Para o usuário deste kit recomenda-se a leitura cuidadosa e a compreensão da Instrução de Uso. A adesão estrita ao protocolo é necessária para a obtenção de resultados confiáveis.

Em particular, a veracidade da amostra, a pipetagem de reagentes, a aplicação do fluxo de trabalho correto, juntamente com a etapa da programação cuidadosa do termociclador, é essencial para resultados precisos e reprodutíveis. A determinação positiva em amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os resultados obtidos com o kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* devem ser interpretados pelos responsáveis do laboratório levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes e outros parâmetros de laboratório relacionados às condições do paciente.

É recomendado que a confidencialidade, aconselhamento apropriado e avaliação médica sejam considerados aspectos essenciais na sequência de testes.

O desempenho do kit foi verificado e validado usando os procedimentos fornecidos nas instruções de uso apenas. Modificações nesses procedimentos podem alterar o desempenho do teste. O desempenho deste kit foi avaliado para uso apenas com amostras humanas.

Este é um kit qualitativo que não fornece um valor quantitativo para os patógenos detectados na amostra. Não há correlação entre os valores de Ct obtidos e a quantidade de patógenos na amostra coletada.

Níveis baixos de patógenos podem ser detectados abaixo do limite de detecção, mas os resultados podem não ser reprodutíveis.

Este teste não se destina a substituir nenhum exame médico realizado por um profissional. Os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros achados laboratoriais e clínicos (história clínica, dados epidemiológicos ou outros dados).

Um resultado positivo do teste não indica necessariamente viabilidade dos vírus e não implica que esses vírus sejam infecciosos ou sejam agentes causadores dos sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo é um indicativo da presença das sequências alvo dos vírus.

Os resultados negativos não impedem a infecção por OPXV e não devem ser usados como base exclusiva para o tratamento ou outras decisões de manejo do paciente. Os tipos de amostras ideais e o tempo para os níveis virais máximos durante infecções causadas por OPXV não foram determinados. A coleta de múltiplas amostras do mesmo paciente pode ser necessária para detectar o patógeno.

Se os testes diagnósticos para outras doenças forem negativos e a apresentação clínica do paciente e informações epidemiológicas sugerirem que a infecção por OPXV é possível, então um resultado falso negativo deve ser considerado, e um novo teste do paciente deve ser discutido. Os valores de fluorescência podem variar devido a múltiplos fatores como:

termociclador, sistema de extração, tipo de amostra, tratamento prévio da amostra, entre outros.

Algumas amostras podem não mostrar curvas de amplificação de *HBB* devido ao baixo número de célula humanas na amostra clínica. Um sinal negativo do CI não exclui a presença de DNA de OPXV.

A identificação de *Orthopoxvirus* deve-se a homologia de primers G2R para os vírus Variola vírus, Camelpox vírus e Cowpox vírus, além do vírus Mpox. Apesar disso, após verificação das mutações, foram consideradas improváveis suas amplificações neste kit de detecção de PCR em tempo real. Em 1980, a Assembleia Mundial da Saúde declarou a Variola (Variola vírus) erradicada. A doença de Camelpox por sua vez, é restrita a camelos. Não há evidência conhecidas de transmissão de humano para humano do vírus Cowpox. Casos humanos esporádicos foram relatados na Europa, relacionados ao manuseio de animais infectados. Em todos os casos, recomenda-se a interpretação dos resultados juntamente com o quadro clínico apresentado pelo paciente.

O kit XGEN PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* não realiza a diferenciação entre as cepas de Mpox da Bacia do Congo e África Ocidental, é recomenda a utilização de técnicas complementares, como o método de sequenciamento, para diferenciação entre o vírus e seus dois clados.

12. DESEMPENHO

12.1 SENSIBILIDADE

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de cópias do alvo que pode ser detectada pelo sistema de ensaio com uma probabilidade de 95%. Já a especificidade analítica é a capacidade de um método analítico de determinar somente o analito frente a outras substâncias presentes na amostra.

TIPOS DE AMOSTRA	SENSIBILIDADE MPXV/OPXV
Swab de lesão	8 cópias/reação com probabilidade de 95%

12.2 ESPECIFICIDADE

A especificidade do ensaio do MPXV/OPXV foi confirmada por meio do teste de um painel composto por diferentes microrganismos associados ou presentes em matrizes de *swab* e/ou doenças transmitidas pelo sangue. Não foi detectada reatividade cruzada entre nenhum dos seguintes microrganismos testados: Adenovírus Humano tipos 1-5, 8, 15, 31,40 e 41; Bocavírus; *Bordetella bronchiseptica*; *Bordetella holmesii*; *Bordetella parapertussis*; *Bordetella pertussis*; *Chlamydia caviae*; *Genótipos de Chlamydia psittaci A e C*; *Chlamydia pneumoniae CM-1*; *Coronavírus humano 229E, OC43, NL63 e HKU1*; *MERS-Coronavirus*; *Cepa SARS-CoV-2 2019nCoV/USAWA1/2020*; Enterovírus 68 e 71; Enterovírus Echovirus 30; Enterovírus Coxsackievirus A24, A9 e B3; *Haemophilus influenzae MinnA*; Vírus influenza A/Nova; Caledônia/20/99(H1N1); Influenza A/Califórnia/7/2009(H1N1) pdm09 vírus; Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09 vírus; *Legionella dumoffii*; *Legionella longbeachae*; *Legionella micdadei*; *Legionella pneumophila*; Metapneumovírus humano A e B; *Moraxella catarrhalis*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis* não resistente à rifampicina; Parainfluenza humana 1, 2, 3 e 4 vírus; *Pneumocytis jirovecii* tipos A1 e g885652; Rinovírus humano tipo C; *Staphylococcus aureus* subsp. aureus; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus pneumoniae* Z022; *Streptococcus pyogenes*; Cepa do vírus chikungunya F24; Cepa do vírus chikungunya Martinique; Cepa do vírus chikungunya S27 Petersfield; Vírus chikungunya OMS IS 11785/16 (do

isolado R91064); Cepa Coxiella burnetiiid Nine Mile Q; Sorotipo 1 do vírus da dengue, cepa Havaí A; Sorotipo 2 do vírus da dengue, cepa Nova Guiné C; Sorotipo 3 do vírus da dengue, cepa H87; Sorotipo 4 do vírus da dengue, cepa H241; Encefalite vírus japonês cepa Nakayama; Leptospira; Rickettsia conorii cepa Moroccan; Streptococcus salivarius; Vírus sincicial respiratório (RSV) A e B; Anaplasma marginale; *Bartonella henselae* cepa Houston-1; Rift Valley Fever Virus strain AR21229; Rift Valley Fever Virus strain MP12; Vírus da encefalite de St. Louis; Plasmodium falciparum 3D7; Theileria annulata; Encefalite transmitida por carrapatos cepa Neudorfl; Treponema phagedenis; Influenza A/Cingapura/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09 vírus; Vírus influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2); Vírus influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1); Vírus influenza A/Suíça/9715293/2013 (H3N2); Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) vírus; Vírus influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2); Vírus influenza A/ DE-SH/Reiherente/ AR8444/ 2016 (H5N8); Vírus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9); Vírus influenza B/Brisbane/60/2008; Vírus influenza B/Flórida/04/06; Vírus influenza B/Phuket/3073/2013; *Legionella bozemanii*; *Borrelia Hermsii*; *Borrelia lusitanae*; *Borrelia valaisiana*; *Borrelia azfeli* cep P-Ko/1984; *Borrelia bavariensis*; *Borrelia bisetti*; *Borrelia burgdorferi* cepa IRS; *Borrelia burgdorferi* stricto sensu cepa B31; *Borrelia garinii* cepa referência; *Boure*; *Borrelia miyamotoi*; *Borrelia spielmanii*; *Trypanosoma cruzi*; Vírus Usutu; Cepa de vírus do Nilo Ocidental NY99; Cepa de vírus do Nilo Ocidental Heja; Cepa de vírus do Nilo Ocidental Ug37; Cepa do vírus da Febre Amarela 17D; Vírus da Febre Amarela cepa neurotrópico francês; Zika vírus Cepa asiática PF13/251013-18; Zika vírus Cepa africana; Cepa do vírus Zika FB-GWUH-2016; Zika Vírus Polinésia Francesa, cepas 11468/16 e 11474/16.

NOTA: A detecção do kit não é considerada totalmente específica para Mpox (Bacia do Congo e África Ocidental), por isso é considerada a detecção de *Orthopoxvírus*. Os primers G2R possuem elevada homologia para outros membros deste gênero, como Variola vírus, Camelpox vírus e Cowpox vírus. Apesar disso, após verificação das mutações, foram consideradas improváveis suas amplificações neste kit de detecção de PCR em tempo real. Em 1980, a Assembleia Mundial da Saúde declarou a Variola (Variola vírus) erradicada. A doença de Camelpox por sua vez, é restrita a camelos. Não há evidência conhecidas de transmissão de humano para humano do vírus Cowpox. Casos humanos esporádicos foram relatados na Europa, relacionados ao manuseio de animais infectados. Em todos os casos, recomenda-se a interpretação dos resultados juntamente com o quadro clínico apresentado.

12.3 EXATIDÃO

Não aplicável.

12.4 PRECISÃO

O ensaio de precisão foi realizado através do resultado de um mesmo analito medido diversas vezes sob mesmas condições operacionais (repetibilidade) e sob condições operacionais distintas (reprodutibilidade). O resultado pode ser visualizado através do coeficiente de variação (CV%). Assim, os resultados foram estabelecidos conforme tabela abaixo.

CRITÉRIO	RESULTADO
Repetibilidade	CV% < 5%
Reprodutibilidade	CV % < 5%

13. RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

14. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

15. REQUISITOS

Profissional com conhecimentos em biologia molecular.

16. SOLUÇÕES DE PROBLEMAS

Os resultados obtidos com o kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE ORTHOPOXVÍRUS devem ser interpretados pelos responsáveis do laboratório levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes e outros parâmetros de laboratório relacionados às condições do paciente.

Se um ou mais dos problemas descritos na tabela abaixo forem recorrentes, deve-se realizar uma investigação e para que se tomem ações a fim de evitá-los.

PROBLEMA	CAUSA	SOLUÇÃO
Controle positivo sem sinal de amplificação	Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.	Verificar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
	Aplicação incorreta do CP.	Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o procedimento, se necessário.
	Homogeneização inadequada ou descongelamento em temperatura diferente da ambiente.	Conferir a calibração das micropipetas.
	Condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não estão de acordo com a instrução de uso ou a data de validade do kit expirou.	Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.
Controle interno com sinal fraco ou sem sinal de amplificação	As condições da PCR não cumprem o protocolo.	Verificar as condições da PCR e repetir o procedimento de acordo com a instrução de uso, se necessário.
	Possibilidade de inibição, erro no procedimento ou mau funcionamento do equipamento.	Verificar se nenhum potencial inibidor de PCR contaminou os tubos.
		Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.
	Verificar se as análises foram realizadas com a configuração correta do equipamento.	
Problemas durante a extração.	Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit e se o procedimento foi executado corretamente.	

Controle negativo com sinal de amplificação	Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.	Repetir a PCR com novo reagentes em replicatas.
		É recomendado realizar a pipetagem do Controle Positivo após todos os outros reagentes.
		Certificar-se de que o local de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

IMPORTANTE: A interpretação dos resultados deve ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório para reduzir o risco de erros e resultados mal interpretados. Quando os resultados do laboratório são transmitidos do laboratório para o centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erro na transferência de dados.

17. ALERTAS E PRECAUÇÕES

Não aplicável.

18. GARANTIA

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos.

O produto kit XGEN MASTER PARA DETECÇÃO DE *ORTHOPOXVÍRUS* é garantido contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

18.1 EXCEÇÕES NA GARANTIA

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

18.2 EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.
- A Mobius não se responsabiliza por resultados/diagnósticos que sejam obtidos através da utilização de amostras não previstas na instrução de uso.

19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE LEGAL

FABRICANTE:

CERTEST BIOTEC

Endereço: CALLE J, N° 1, 50840, SAN MATEO DE GÁLLEGO, ZARAGOZA, ESPANHA

IMPORTADO POR:

Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.

Rua Jandaia do Sul 441 - Pinhais - PR - CEP: 83.324-440

Telefone: (41) 3401-1850

E-mail: suporte@mobiustlife.com.br | Website: www.mobiustlife.com.br

CNPJ: 04.645.160/0001-49

20. REGISTRO ANVISA

80502070104