

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco

IU-IVD-027

Revisão: 04 | 12/08/2025

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco.

2. DADOS DO FABRICANTEINSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP
– CNPJ: 03.585.986/0001-05RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775 | CEP
81350-010 – CURITIBA – PARANÁ – BRASILHorário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30
(exceto feriados).

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

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

3. APRESENTAÇÃOKit contendo um módulo de amplificação suficiente para 96
determinações.**4. FINALIDADE**

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético do papilomavírus humano (HPV), sendo capaz de discriminar os genótipos de alto risco oncogênico HPV-16 e HPV-18, além de detectar outros 12 genótipos também de alto risco oncogênico (HPV AR): HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 e HPV-68. O material a ser analisado é o DNA extraído de amostras de raspado cervical/vaginal e/ou biópsia cervical obtidas de pacientes em triagem preventiva para investigação de lesões causadas pelo HPV que podem levar ao câncer.

O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico e monitoramento de infecções por HPV com potencial oncogênico.

**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 baseados em PCR em tempo real.

6. INDICAÇÕES 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 HPV Alto Risco utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma do patógeno, em DNA extraído de amostras de raspado cervical/vaginal e biópsia cervical, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco permite a discriminação dos genótipos HPV-16 e HPV-18, e a detecção de outros 12 genótipos de HPV de alto risco oncogênico, além de um controle interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos alvos moleculares e do Controle Interno 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 DNA 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 do patógeno 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). O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos pesquisados, exceto o CI.

Esse kit foi desenvolvido para 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 e QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de células de raspado cervical/vaginal, podendo incluir células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), e biópsia cervical de tecidos suspeitos de lesão oncológica, em meio líquido de preservação.

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

A coleta da amostra de raspado cervical/vaginal da paciente deve ser realizada por profissional da área da saúde habilitado e capacitado, utilizando dispositivo específico para amostragem cervical, como escova ou *swab*. Após a coleta, o dispositivo deve

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco

IU-IVD-027

Revisão: 04 | 12/08/2025

ser mergulhado e enxaguado em meio líquido de preservação. O frasco deve ser tampado, rotulado e encaminhado ao laboratório equipado para posterior extração do material genético.

O prazo de estabilidade e temperatura de armazenamento das amostras em meio líquido deve seguir as orientações do fabricante do kit de coleta.

A coleta de amostra de biópsia cervical só deve ser realizada por profissional da área da saúde habilitado e capacitado, e pode ser realizada através dos seguintes métodos: 1) Através do uso de espéculo, colposcópio e pinça específica para remoção tecidual; 2) Por curetagem, através de raspagem do colo do útero com equipamento específico; 3) Através de conização ou excisão no caso de lesões mais extensas; 4) coleta por *punch*, instrumento específico de corte circular; 5) Através de Cirurgia de Alta Frequência (CAF), realizada com a utilização de equipamento que realiza o corte preciso do tecido e promove sua hemostasia. As amostras de biópsia frescas em meio líquido de preservação, se mantidas a temperatura ambiente, devem ser processadas em até 24 horas, ou, se congeladas a -20°C, devem ser processadas em até 30 dias.

Amostras de raspado cervical/vaginal ou biópsia cervical não devem ser fixadas em meio contendo formalina. A formalina é prejudicial aos processos de extração do DNA e da PCR em tempo real.

8.2. Extração de DNA

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

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA extraído

– DNA extraído deve ser armazenado a -20°C;



- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA 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 DNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição da amostra à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Tampão de Reação contendo 550 µL;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 700 µL;
- 01 microtubo de Enzima contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 50 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;
- Centrifuga de microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrifuga de 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, toucas, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);

- Kit de Extração de DNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 a 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas 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 ou 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 5 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 DNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada. Pode ocorrer a formação de floculação ou precipitados no Tampão de Reação. Nesses casos, o Tampão de Reação pode ser submetido ao aquecimento a 37°C por até 20 min para dissolução dos precipitados antes do uso. Não há prejuízo na eficiência da reação após este processo.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem talco descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco

IU-IVD-027

Revisão: 04 | 12/08/2025

- 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 DNA 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 controle positivo e do controle negativo;
- 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 HPV Alto Risco.

Componente	Volume para uma reação
Tampão de Reação	5 µL
Oligomix	6,6 µL
Enzima	0,4 µL
TOTAL	12 µL

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os



- componentes e volumes listados na Tabela 1 ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
 - Distribuir 12 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 8 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 8 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 8 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 negativo e do controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme a Tabela 2.

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

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
HPV-16	FAM	NONE
HPV-18	VIC	NONE
HPV AR	ROX	NONE
CI	Cy5	NONE

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

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	95	10 minutos	01
Estágio 2	95	15 segundos	40
	60*	30 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 Real-Time PCR System	HPV-16	60.000	6 – 15
	HPV-18	50.000	6 – 15
	HPV AR	30.000	6 – 15
	CI	20.000	6 – 15
QuantStudio 5 Real-Time PCR System	HPV-16	40.000	6 – 15
	HPV-18	30.000	6 – 15
	HPV AR	20.000	6 – 15
	CI	15.000	6 – 15

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para os quatro alvos

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco

IU-IVD-027

Revisão: 04 | 12/08/2025

avaliados, apresentando $Ct \leq 25$;

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os alvos HPV e deve apresentar amplificação do controle interno com $Ct \leq 25$;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação para os alvos HPV, e deve apresentar amplificação do controle interno com $Ct \leq 33$;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para algum dos alvos HPV com $Ct \leq 40$, mesmo que não haja amplificação do controle interno:

OBS: Para testagem populacional em rastreio molecular organizado, ver o item 14.3 desta Instrução de Uso onde constam os critérios adicionais estabelecidos para amostras positivas.

Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios de interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco.

Amostra				CP	CN	Resultado
HPV-16	HPV-18	HPV AR*	CI			
-	-	-	+	+	-	HPV não detectável
+	-	-	+/-	+	-	HPV-16 detectável
-	+	-	+/-	+	-	HPV-18 detectável
-	-	+	+/-	+	-	HPV AR* detectável
-	+	+	+/-	+	-	HPV-18 e HPV AR* detectáveis
+	-	+	+/-	+	-	HPV-16 e HPV AR* detectáveis



+	+	-	+/-	+	-	HPV-16 e HPV-18 detectáveis
+	+	+	+/-	+	-	HPV-16, HPV-18 e HPV AR* detectáveis
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
-	-	-	-	+	-	Amostra inválida

* HPV AR: Refere-se aos genótipos de alto risco oncogênico HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 e HPV-68.

14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora dos critérios de aceitação

- Amostras sem amplificação dos alvos HPV e com amplificação do CI com Ct > 33 são inválidas e devem ser testadas novamente a partir da qPCR. Caso permaneçam com Ct superior ao limite descrito, devem ser novamente repetidas a partir da extração. Se o resultado com Ct > 33, após nova extração se manter, a amostra deve ser considerada com resultado inconclusivo;
- Valores de Ct ≤ 5,0 nas amostras podem ser decorrentes de artefatos de análise devido a leituras de fluorescência abaixo do *baseline* no software de equipamentos 7500. Recomenda-se que amostras com esse perfil sejam analisadas no software *Design and Analysis* (versão 2.7.0 ou superior, Applied Biosystems), sob os mesmos critérios descritos no item 14.2;
- Ensaios que não apresentem amplificação para algum dos alvos do CP são inválidos e devem ser repetidos;
- Ensaios que não apresentem amplificação do CI no poço correspondente ao CN são inválidos e devem ser repetidos.

14.3. Interpretação dos resultados para testagem populacional em rastreio molecular organizado

Para as testagens populacionais em rastreio organizado, devem

ser utilizados os critérios de análise descritos abaixo, uma vez que eles diminuem a chance de detecção do HPV em Lesões Intraepiteliais de Baixo Grau/Neoplasia Intraepitelial Cervical grau I (NIC I) ou inferior:

- Para que uma amostra seja considerada positiva para HPV-16, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico no alvo FAM com $Ct \leq 32,5$;
- Para que uma amostra seja considerada positiva para HPV-18, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico no alvo VIC com $Ct \leq 33,5$;
- Para que uma amostra seja considerada positiva para HPV Alto Risco, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico no alvo ROX com $Ct \leq 30$;
- Os critérios de interpretação para os controles e amostras negativas são os mesmos estabelecidos no item 14.2.

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 células de raspado cervical/vaginal e de biópsia cervical de tecidos suspeitos de lesão oncológica podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco;
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por genótipos oncogênicos de HPV.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção, foram

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco

IU-IVD-027

Revisão: 04 | 12/08/2025

Na Tabela 7 estão os resultados do desempenho diagnóstico da testagem populacional em rastreamento molecular organizado.

Tabela 7. Desempenho diagnóstico no Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco em população de rastreamento molecular organizado para detecção de Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2 ou superior (NIC2+).

Critério	Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco	
Sensibilidade	100% (CI95 99,7% – 100%)	76/76 ^a
Especificidade	91,9% (CI95 90,1% – 93,7%)	729/801 ^b
Valor Preditivo Positivo	53,9% (CI95 45,7% – 62,2%)	76/141 ^c
Valor Preditivo Negativo	99% (CI95 98% – 99,58%)	729/736 ^d

^a Número de amostras NIC2+ detectadas/número de amostras NIC2+ testadas.

^b Número de amostras negativas ($\leq$ NIC1) não detectadas/número de amostras negativas ($\leq$ NIC1) testadas.

^c Número de amostras NIC2+ detectadas/número total de resultados detectados.

^d Número de amostras negativas ($\leq$ NIC1) não detectadas/número total de resultados não detectados.

A sensibilidade relativa obtida por comparação de desempenho do Kit IBMP Biomol HPV de Alto Risco frente a um produto equivalente clinicamente validado segundo critérios internacionais foi de 1,000 (CI95 0,989 – 1,012; $P_{McNemar} = 1,000$), enquanto a especificidade relativa foi de 0,993 (CI95 0,982 – 1,005; $P_{McNemar} = 0,3593$). Esses valores demonstram a não-inferioridade de desempenho do Kit IBMP Biomol HPV de Alto Risco tanto em relação à sensibilidade clínica ($P = 0,0018$), quanto à especificidade clínica ($P = 0,0200$).

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 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.

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 da 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, transporte e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco. Amostras coletadas, transportadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos-negativos;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nesta Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA obtidas de células de raspado cervical/vaginal e/ou de biópsia cervical de tecidos suspeitos de lesão oncológica, mantidas em meio líquido de preservação. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco;
- O produto foi validado para uso com os equipamentos 7500 Real-Time PCR System e QuantStudio 5 Real-Time PCR System.