

Instrução de Uso
Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV
IU-IVD-025
Revisão: 01/24/08/2023



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP

CNPJ: 03.585.986/0001-05

RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775 | CEP 81350-010 - CURITIBA – PARANÁ – BRASIL

Horário 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. APRESENTAÇÃO

O Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV é composto por módulo de amplificação para preparo de 96 reações capazes de detectar e diferenciar a presença de material genético dos vírus: adenovírus (AdV), os subtipos A e B do vírus sincicial respiratório (RSV), rinovírus humano (hRV) e enterovírus (EV), além de suas coinfeções (94 amostras e 2 controles).

4. FINALIDADE

Teste molecular discriminatório capaz de detectar a presença ou ausência do material genético dos vírus: adenovírus, vírus sincicial respiratório e rinovírus humano/enterovírus, além da detecção de um gene humano como controle interno de reação (CI). As amostras a serem testadas devem ser provenientes da extração de DNA e RNA do trato respiratório de pacientes com suspeita de infecção ou coinfeção por estes patógenos.

USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento específico em biologia molecular, especificamente em testes baseados em qPCR.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser entre -30°C e -15°C e o transporte entre -80°C e -35°C. A temperatura do ambiente indicada para manipulação do produto é entre 15 e 25°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Os testes realizados com o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV são baseados na técnica da 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 etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA da amostra) seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Caso o material genético do vírus seja DNA, este participa da reação de cadeia da polimerase sem a necessidade de transcriptase reversa e a detecção ocorre da mesma forma, por medida de intensidade de fluorescência. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do CI é feita através do uso de iniciadores e de sondas marcadas com fluoróforos específicos para cada alvo molecular. A amplificação típica do material genético de um ou mais vírus indica uma reação com resultado positivo para o patógeno na amostra. Amostras com resultados negativos para os alvos virais devem apresentar amplificação apenas do CI, o que indica o funcionamento adequado da reação (insumos e operação) além da qualidade do material genético extraído da amostra.

O kit possui um Controle Positivo (CP) biosseguro (que não oferece riscos de contaminação aos operadores) que avalia todos os alvos específicos (patógenos) e o CI, comportando-se como referencial de qualidade dos reagentes e do processo de amplificação. O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições experimentais e ambientais relacionadas com possíveis casos de contaminação do ensaio.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia-se a presença ou ausência dos alvos moleculares.

Produto validado para uso em equipamentos 7500 Real-Time PCR Fast, 7500 Real-Time PCR Standard, QuantStudio 5, QuantStudio DX (Thermo Fisher Scientific®), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e Amplio 96 (Locus).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA e RNA provenientes de swab de naso ou orofaringe coletados em meio de manutenção viral.

8.1. Condições de coleta, manuseio, preparo ou preservação de amostras

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina, recomenda-se sua coleta, preferencialmente, entre o 3º e o 7º dia após o início dos sintomas. Caso haja necessidade de armazenamento das amostras coletadas, mantê-las entre -30°C e -15°C por no máximo 3 meses ou, por períodos superiores, a temperaturas próximas a -70°C.

Ciclos de congelamento e descongelamento das amostras ou dos ácidos nucleicos extraídos devem ser evitados pela possibilidade de degradação do material genético viral.

Usar sempre luvas de látex ou vinil durante o manuseio das amostras ou do material genético extraído a fim de prevenir contaminação por DNases e RNases. É recomendado trocar as luvas frequentemente e manter os tubos fechados sempre que possível durante os procedimentos.

Após extração, manter o DNA/RNA no gelo ou armazenado em freezer -80°C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV é composto por:

- 01 microtubo contendo 550 µL de mistura de PCR e enzimas;
- 01 microtubo contendo 1100 µL de oligonucleotídeos;
- 01 microtubo contendo 30 µL de Controle Positivo (CP);
- 01 microtubo contendo 30 µL de Controle Negativo (CN).

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

Para a realização dos testes, os seguintes materiais devem ser providenciados pelo usuário:

- Equipamentos de Proteção Individual (jaleco, máscara descartável, toucas, luvas descartáveis sem talco, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de Extração de RNA e DNA;
- Tubos para armazenamento das amostras;
- Microtubos de 1,7 a 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL e 100-1000 µL);
- Centrífuga;
- Ponteiras esterilizadas livre de enzimas do tipo RNase e DNase com filtro;
- Suporte/estante para tubos de 1,7 ou 2,0 mL;
- Cabine de segurança biológica;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;



- Agitador tipo vortex;
- Equipamento de PCR em tempo real (7500 Fast, 7500 Standard, QuantStudio 5, QuantStudio DX, CFX96 ou Amplio 96).

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O produto pode passar por até 4 ciclos de congelamento/descongelamento. Após 4 ciclos, as sobras devem ser descartadas.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

A extração do DNA/RNA deverá ser realizada por meio de kits de extração específicos para a matriz biológica pretendida e independe do fabricante desde que a qualidade e integridade do RNA estejam de acordo com o estabelecido no item 14.2. Após esse procedimento, o material genético extraído deve ser usado imediatamente ou armazenado em freezer -80°C até a reação de RT-qPCR.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscaras, touca e luvas descartáveis sem talco durante o uso deste produto;
- Não utilizar reagentes vencidos;
- A manipulação das micropipetas deve respeitar a faixa de volume;
- As reações possuem um CI onde o alvo de detecção é uma região do genoma humano. Portanto, é necessário manipular o produto com as precauções devidas referentes as boas práticas de laboratório para evitar contaminações das reações com material genético dos operadores;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva, mesmo não apresentando risco para humanos, deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras reais evitando resultados falso-positivos;
- É necessário realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de reações e PCR em áreas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações;
- A etapa de extração de RNA/DNA, prévia a aplicação deste produto é de extrema importância para a eficiência da reação, portanto, é imprescindível seguir as instruções do fabricante do kit de extração;

- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação ter ocorrido para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em *workstations* e cabines de segurança biológica;
- Para um melhor desempenho do teste, seguir corretamente as instruções e utilizar equipamentos de medição calibrados.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da mistura de reação

Importante: Descongelar os reagentes e centrifugá-los. Manter os reagentes em gelo ou *cooler* durante todo o processo de preparo das reações. Uma placa de PCR de 96 poços é utilizada para 96 reações de amplificação e detecção, sendo 94 poços para amostras de pacientes, 01 poço para reação do Controle Negativo e 01 poço para reação do Controle Positivo.

- Separar 1 tubo de 1,7 ou 2,0 mL para a mistura dos insumos de RT-qPCR;
 - Adicionar ao tubo, devidamente identificado, os componentes listados na Tabela 1;
- Tabela 1. Preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV:

Mistura de reação		
Componente da mistura	Volume para 1 reação	Volume para 96 reações (com sobra)
Mistura de PCR e enzimas	5 µL	500 µL
Oligonucleotídeos	10 µL	1000 µL
TOTAL	15 µL	1500 µL

- Homogeneizar gentilmente, por pipetagem ou tamborilando, e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 15 µL da mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços;
- Se aplicável, selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

13.2. Aplicação das Amostras de DNA/RNA e dos Controles

Em local apropriado para manipulação de ácidos nucleicos, as amostras e controles devem ser aplicados nos poços cor-

- respondentes. Fica a critério do operador analisar a maneira mais adequada de distribuição das amostras na placa. Adicionar 5,0 µL de cada amostra de material genético extraído nos poços correspondentes;
- Adicionar 5,0 µL do Controle Positivo (CP) no poço único correspondente;
 - Adicionar 5,0 µL de Controle Negativo (CN) no poço único correspondente;
 - Selar a placa com adesivo óptico;
 - Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. PCR em Tempo Real

- Configurar no *software* do equipamento conforme desenho de placa estabelecido pelo usuário, as amostras, o controle negativo e o controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2.

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

Target Name	Reporter	Quencher
AdV	FAM	NONE
RSV	Texas Red/ROX	NONE
hRV/EV	VIC	NONE
Controle Interno	Cy5	NONE

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

Tabela 3. Parâmetros de ciclagem da reação de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	1
Estágio 2	95	2 minutos	1
Ciclagem	95	15 segundos	40
	55*	30 segundos	

- *Certificar-se de que a captura de fluorescência ocorra neste estágio.
- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Os parâmetros de análise devem ser ajustados conforme equipamento utilizado e mostrado na Tabela 4.



Tabela 4. Parâmetros de análise dos resultados.

Equipamento	Parâmetro	AdV	RSV	hRV/EV
7500 Standard 7500 Fast	Threshold	60.000	60.000	50.000
	Baseline	3 - 15	3 - 15	3 - 15
QuantStudio DX	Threshold	250.000	250.000	300.000
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO
QuantStudio 5	Threshold	20.000	30.000	30.000
	Baseline	3 - 15	3 - 15	3 - 15
CFX 96	Threshold	100	100	100
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO
Amplio 96	Threshold	150	200	300
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

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

CONTROLE POSITIVO (CP):

- O CP deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 35.

CONTROLE NEGATIVO (CN):

- O CN não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos virais e deve apresentar amplificação do CI com Ct ≤ 30.

Observação: Para que a análise seja válida, os critérios de aceitação para o CP e CN devem ser atendidos. Caso contrário a placa é considerada **inválida para análise**.

AMOSTRAS:

- As amostras são consideradas positivas para os vírus testados quando apresentam Cts < 35 para seus respectivos alvos virais, desde que com curva de amplificação característica, **mesmo se não houver amplificação do CI**.
- Amostras com Ct ≥ 35 para os alvos virais devem ser retestadas (com nova extração) e somente serão consideradas positivas se houver amplificação típica, independentemente do valor do Ct obtido, mesmo se não houver amplificação do CI. Isso ocorre para evitar artefatos de detecção ocasionados por contaminação laboratorial.
- O kit é capaz de detectar coinfecções desde que os vírus

detectados estejam dentro das faixas de interpretações destacadas acima.

- Todas as amostras consideradas negativas devem apresentar amplificação do CI com Ct < 35.

Tabela 5. Critérios de interpretação e avaliação dos resultados.

Na amostra				CP*	CN*	Resultado
AdV	RSV	hRV/EV	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+/-	+	-	Detectável AdV
-	+	-	+/-	+	-	Detectável RSV
-	-	+	+/-	+	-	Detectável hRV/EV
-	+	+	+/-	+	-	Detectável RSV e hRV/EV
+	-	+	+/-	+	-	Detectável AdV e hRV/EV
+	+	-	+/-	+	-	Detectável AdV e RSV
+	+	+	+/-	+	-	Detectável AdV, RSV e hRV/EV
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio Inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
-	-	-	-	+	-	Amostra inválida

*Tanto o CP quanto o CN devem apresentar amplificação do controle interno. Somente o CP deve apresentar amplificação para os três alvos virais dentro dos padrões de aceitação estabelecidos.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- Procedimentos de coleta, transporte e processamento de amostras inadequados podem gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos;
- Armazenamento inadequado dos reagentes pode apresentar resultados falso-negativos;
- Interferentes comuns para técnicas moleculares podem interferir no desempenho do teste;
- Para que os resultados deste teste sejam garantidos, deve-se seguir todas as instruções de uso do produto.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade

Os limites de detecção com confiança de 95% foram calculados com base em experimentos realizados em equipamentos 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific®). Os limites de detecção para cada alvo são: ≥ 51,3 cópias/reacção para adenovírus, ≥ 55,3 cópias/reacção para rinovírus humano/enterovírus, ≥ 6,1 cópias/reacção para o subtipo A do vírus sincicial respiratório e ≥ 64,1 cópias/reacção para o subtipo B do vírus sincicial respiratório.

16.2. Especificidade

Não apresentou reações cruzadas frente a amostras positivas para os seguintes patógenos (número amostral avaliado): Bocavírus humano (15), Coronavírus 229E (5), Coronavírus HKU1 (3), Coronavírus NL63 (5), Coronavírus OC43 (5), SARS-CoV-2 (27), Metapneumovírus humano (5), Parainfluenza 1 (5), Parainfluenza 2 (5), Parainfluenza 3 (5), Influenza vírus A (63), Influenza vírus B (35), *Acinetobacter baumannii* (1), *Citrobacter koseri* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Escherichia coli* (2), *Klebsiella oxytoca* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Mycobacterium tuberculosis* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Serratia marcescens* (1), *Staphylococcus aureus* (2), *Staphylococcus epidermidis* (1) e *Staphylococcus haemolyticus* (1).

Há alta homologia de sequência nucleotídica entre rinovírus humano e enterovírus, uma vez que as espécies de rinovírus humano pertencem ao gênero *Enterovirus*, família Picornaviridae. Portanto, amostras positivas para hRV/EV só são discriminadas para estes patógenos por teste diferencial complementar.

16.3. Desempenho diagnóstico

A caracterização do desempenho diagnóstico (Tabela 6) do teste foi realizada utilizando painel de 330 amostras clínicas de swab de naso/orofaringe fornecida por laboratórios de referência, das quais 53 caracterizadas como positivas para adenovírus, 50 amostras caracterizadas como positivas para vírus sincicial respiratório e 49 positivas para rinovírus humano. 236 amostras foram caracterizadas como negativas para adenovírus, 280 amostras caracterizadas como negativas para vírus sincicial respiratório e 240 amostras foram caracterizadas como negativas para rinovírus humano em laboratórios de referência. 41 amostras foram testadas apenas para RSV e não foram caracterizadas previamente para adenovírus ou rinovírus humano/enterovírus.



Tabela 6. Desempenho diagnóstico frente a amostras clínicas previamente testadas.

Alvo	Resultado	Referência		
		Positivo	Negativo	Total
Adv	Detectado	53	7	60
	Não detectado	0	229	229
	Total	53	236	289
RSV	Detectado	50	3	53
	Não detectado	0	277	277
	Total	50	280	330
hRV/EV	Detectado	46	12	58
	Não detectado	3	228	231
	Total	49	240	289

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 100% para adenovírus, 93,9% para rinovírus humano/enterovírus e 100% para vírus sincicial respiratório. O teste apresenta especificidade diagnóstica de 97,0% para adenovírus, 95,0% para rinovírus humano/enterovírus e 98,9% para vírus sincicial respiratório.

16.3. Exatidão

O Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV foi testado utilizando um painel de 330 amostras onde verificou-se a exatidão de 97,2%.

16.4. Precisão

Para todas as amostras que apresentaram amplificações dos alvos, o DPR% entre todas as réplicas analisadas não ultrapassaram os 10% do critério de aceitação conforme esperado.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Nenhum risco residual identificado.

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 de uso.

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 utilize o produto fora do prazo de validade estabelecido.
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso ou as condições de armazenamento dos insumos.
- A coleta de amostras deve ser realizada por profissionais treinados e, após extraídas, devem ser armazenadas em condições que mantenham sua estabilidade até o momento de execução do teste.
- Deve-se utilizar áreas específicas para as etapas de preparo de mistura de PCR, distribuição de DNA/RNA e amplificação, para que sejam evitadas contaminações cruzadas.
- Para um melhor desempenho do teste é necessária a utilização de instrumentos de medição e detecção devidamente calibrados e/ou qualificados.
- Os reagentes do Kit não devem ser reutilizados.
- Deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) adequadamente para evitar contaminação cruzada.
- A manipulação de amostras deve ser realizada em cabines de segurança biológica de classe II certificadas em laboratórios com nível de Biossegurança NB-2.
- O Controle Positivo deve ser manuseado com cuidado para evitar a contaminação das amostras avaliadas.