

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
Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267
Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às
16:30 (exceto feriados)
sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV contendo um módulo de amplificação suficiente para 94 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença ou ausência) do material genético dos vírus: adenovírus, vírus sincicial respiratório e rinovírus humano/enterovírus. O material a ser analisado é extraído de amostras de trato respiratório. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico 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 PCR em tempo real.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser 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 AdV, RSV e hRV/EV utiliza a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A reação de RT-



qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma do patógeno em DNA ou RNA extraído de amostras de swab naso ou orofaringe. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA extraído da amostra biológica) seguida da qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

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.

O kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV permite a identificação de adenovírus, vírus sincicial respiratório e rinovírus humano/enterovírus, através da detecção de parte da região da proteína hexon no genoma de adenovírus, do fragmento do sítio interno de entrada do ribossoma na região 5' UTR de rinovírus e o fragmento da proteína da matriz do vírus sincicial respiratório, além de um controle interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do CI 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 no CI. A amplificação do CI indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador), além de refletir a qualidade do DNA e RNA extraído da amostra. Caso o CI não seja detectado, a amostra deve ter seu material 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 riscos de contaminação aos operadores ou ao ambiente), que deve apresentar resultado detectável para todos os alvos moleculares pesquisados, incluindo o CI. 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 virais pesquisados exceto CI.

Este kit foi desenvolvido para a realização de 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 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 extraído 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 que a coleta seja realizada, preferencialmente, entre o 3º e o 7º dia após o início dos sintomas.

Após a coleta, as amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre -30°C e -15°C por até 3 meses ou por períodos superiores, a temperaturas acima de -70°C.

8.2. Extração do RNA e DNA

Deve-se realizar a extração do material genético (tanto DNA quanto RNA) das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter DNA e RNA 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 e RNA extraído

- O material genético extraído deve ser armazenado a -80°C;
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA e RNA para prevenir a contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear bactérias e fungos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;
- Manter os tubos contendo DNA e RNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 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

- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vortex;
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga para 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 e RNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas livre de enzimas do tipo RNase e DNase com filtro (0,5-10 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

Este é um produto de uso múltiplo.

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até 4 ciclos de descongelamentos, 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 e RNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.



12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscaras, touca e luvas descartáveis sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
- A manipulação das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;
- 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 de DNA e RNA 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;
- Na 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, ajustado ao número de reações a serem realizadas;

OBS: Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

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
Mistura de PCR e enzimas	5 µL
Oligonucleotídeos	10 µL
TOTAL	15 µL

- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, 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, 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. Aplicação das Amostras de DNA e RNA e dos Controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação adicionar 5,0 µL de cada amostra de DNA e RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- 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 de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar no *software* do equipamento conforme desenho de placa estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle negativo e do 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.

Etapas	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

Para a análise dos 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	Parâmetro	AdV	RSV	hRV/EV	CI
7500 Standard 7500 Fast	Threshold	60.000	60.000	50.000	20.000
	Baseline	3 - 15	3 - 15	3 - 15	3 - 15
QuantStudio DX	Threshold	250.000	250.000	300.000	100.000
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO	AUTO
QuantStudio 5	Threshold	20.000	30.000	30.000	10.000
	Baseline	3 - 15	3 - 15	3 - 15	3-15
CFX 96	Threshold	100	100	100	100
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO	AUTO
Amplio 96	Threshold	150	200	300	100
	Baseline	AUTO	AUTO	AUTO	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o poço de Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados (AdV, RSV e hRV/EV) e para o Controle Interno, apresentando $Ct \leq 35$;

- Para que uma corrida seja considerada válida, o poço de Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados (AdV, RSV e hRV/EV), e deve

apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 30$;

- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados (AdV, RSV e hRV/EV) e deve apresentar amplificação do Controle Interno com $Ct < 35$;

- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para os alvos (AdV, RSV e/ou hRV/EV) com $Ct < 35$, mesmo sem apresentar amplificação para o Controle Interno;

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

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

- Amostras com $Ct \geq 35$ 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 coinfeções desde que os vírus detectados estejam dentro das faixas de interpretações destacadas acima;

- Amostras sem amplificação para os alvos virais e com amplificação do CI com $Ct \geq 35$ são consideradas inválidas e o processo deve ser repetido desde a extração.

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 Instruções de Uso);

- Amostras de DNA e RNA provenientes de swab de naso ou orofaringe podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV;

- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado "Não detectável" não exclui a possibilidade de infecção por adenovírus, vírus sincicial respiratório e rinovírus humano.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade Analítica

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

16.2. Especificidade Analítica

O kit detectou somente o material genético para cada um dos alvos esperados. O alvo RSV detectou tanto RNA pertencente ao subtipo A quanto subtipo B do vírus sincicial respiratório. O alvo AdV detectou exclusivamente o DNA de adenovírus. Já o alvo hRV/EV detectou RNA de Rinovírus) e enterovírus. O kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV não apresentou reações cruzadas frente a analitos comerciais dos seguintes patógenos: Influenza A H1, Influenza A H1N1, Influenza A H3, Influenza A H5, Influenza B, Coronavirus HKU, Coronavirus NL63, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, SARS-CoV-2, Human Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, Human Bocavirus, Human Metapneumovirus, Mycobacterium tuberculosis, Acinetobacter baumannii, Candida albicans, Citrobacter koseri, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis,



Escherichia coli, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*.

16.3. Precisão

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

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel 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. 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.

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% (CI95 93,3% - 100%), especificidade diagnóstica de 97,0% (CI95 94,0% - 98,8%), valor preditivo positivo de 88,3% (CI95 78,5% - 94,0%), valor preditivo negativo de 100% (CI95 98,4% - 100%), para detecção do alvo AdV.

- O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 100% (CI95 92,9% - 100%), especificidade diagnóstica de 98,9% (CI95 96,9% - 99,8%), valor preditivo positivo de 94,3% (CI95 84,4% - 98,1%), valor preditivo negativo de 100% (CI95 98,7% - 100%), para detecção do alvo RSV.

- O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 93,9% (CI95 83,1% - 98,7%), especificidade diagnóstica de 95,0% (CI95 91,4% - 97,4%), valor preditivo positivo de 79,3% (CI95 68,7% - 87,0%), valor preditivo negativo de 98,7% (CI95 96,2% - 99,6%), para detecção do alvo hRV/EV.

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 nucléico 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 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 não siga corretamente as instruções de uso ou 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 e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos-negativos;

- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA e RNA obtidas de swab de naso ou orofaringe coletados em meio de manutenção viral. O uso DNA ou RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV.

- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.