

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus.

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 contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de Rotavírus e/ou Norovírus, extraído de amostras de suspensão fecal, obtidas de pacientes com suspeita clínica de gastroenterite. O resultado obtido pode ser utilizado em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico de gastroenterites agudas.

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 diagnósticos baseados em PCR em tempo real.

6. CONDIÇÕES 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 Rotavírus e Norovírus utiliza a técnica da 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 do genoma do patógeno, a partir do RNA extraído de amostras de suspensão fecal. 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.

O Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus permite a identificação e discriminação dos vírus Rotavírus e Norovírus (grupos I e II), através da detecção dos alvos moleculares NSP3 e região de junção ORF1-ORF2, respectivamente, 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 uma reação multiplex.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados indica a detecção do alvo na amostra analisada. 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 RNA 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), 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 pesquisados exceto para o CI.

Esse 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 com os seguintes termocicladores: 7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e CFX96 PCR Detection System (Bio-Rad).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de suspensão fecal.

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

Seguir o procedimento de rotina para coleta de fezes. O material biológico deve ser armazenado em recipiente seco, limpo e sem aditivos.

Após a coleta, as amostras devem ser transportadas e armazenadas entre 2°C e 8°C por até 48 horas. Após esse período, as amostras devem ser armazenadas a -20°C.

8.2 Extração de RNA

Deve-se realizar a extração de RNA das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter RNA cuja qualidade e integridade resulte no atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

8.3 Cuidados no armazenamento e manuseio do RNA extraído

- O RNA extraído deve ser armazenado em temperatura inferior a -70°C;
- Sempre usar luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA 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 RNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo por vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Tampão de reação contendo 500 µL;
- 01 microtubo de Enzima TAQ FIT contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Enzima RT contendo 60 µL;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 900 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 30 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 30 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;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;



- Centrífuga para placas de 96 poços;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, touca, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de RNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços) compatível com o equipamento de PCR em tempo real;
- Ponteiras 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 a 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 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 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, máscara descartável, touca e luvas 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 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 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;
- 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.

OBBS: 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 Rotavírus e Norovírus.

Componente	Volume para uma reação
Tampão de reação	5 µL
Enzima TAQ FIT	0,4 µL
Enzima RT	0,5 µL
Oligomix	9,1 µL
Total	15 µL

- 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, de acordo com o número de reações a serem realizadas;
- 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 Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5 µL de cada amostra de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 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 positivo e do controle negativo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme descrito na Tabela 2;

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

Alvo	Fluoróforo	Quencher
Norovírus Grupo I	CY5	None
Norovírus Grupo II	FAM	None
Rotavírus	VIC	None
CI	ROX	None

- Nos equipamentos ABI 7500 e ABI 7500 Fast, selecionar a referência passiva como NONE;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme descrito na Tabela 3;

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01
Estágio 2	95	10 minutos	01
Estágio 3	95	15 segundos	40
	57*	60 segundos	

Legenda: *Estágio para captura de fluorescência.

- Salvar 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
ABI 7500	Norovírus Grupo I	5.000	3-15
	Norovírus Grupo II	10.000	3-15
	Rotavírus	30.000	3-15
	CI	5.000	3-15
ABI 7500 Fast (Módulo Standard)	Norovírus Grupo I	5.000	3 - 15
	Norovírus Grupo II	20.000	3 - 15
	Rotavírus	30.000	3 - 15
	CI	5.000	3 - 15
CFX96 (Bio-Rad)	Norovírus Grupo I	55	Automático
	Norovírus Grupo II	70	Automático
	Rotavírus	90	Automático
	CI	20	Automático

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os quatro alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 27;
 - Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os alvos Norovírus (grupos I e II) e Rotavírus, e deve apresentar amplificação do controle interno com Ct < 25;
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos Norovírus (grupos I e II) e Rotavírus, 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 Norovírus (grupos I e/ou II) e/ou Rotavírus, mesmo se não houver amplificação do controle interno.
- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus.

Amostra				CP	CN	Resultado
Noro G I ¹	Noro G II ²	Rota ³	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+/-	+	-	Norovírus Grupo I detectável
-	+	-	+/-	+	-	Norovírus Grupo II detectável
-	-	+	+/-	+	-	Rotavírus detectável
+	+	-	+/-	+	-	Norovírus Grupos I e II detectáveis
+	-	+	+/-	+	-	Norovírus Grupo I e Rotavírus detectáveis
-	+	+	+/-	+	-	Norovírus Grupo II e Rotavírus detectáveis
+	+	+	+/-	+	-	Norovírus Grupo I, Norovírus Grupo II e Rotavírus detectáveis
-	-	-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

Legenda: ¹ Norovírus Grupo I; ² Norovírus Grupo 2; ³ Rotavírus.

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

- Amostras com amplificação do CI com Ct > 35 devem ser testadas novamente. Caso permaneçam com Ct superior ao limite descrito ou não apresentem amplificação de nenhum alvo, mesmo com parâmetros de CP e CN aceitáveis, devem ser novamente extraídas e testadas.
- Ensaios que não apresentem amplificação para algum dos alvos do CP devem ser repetidos.
- Ensaios que não apresentem amplificação do CI no poço correspondente ao CN devem ser repetidos.

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 suspensão fecal podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;

– Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por Rotavírus e/ou Norovírus;

– Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico somente na fase aguda da doença.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção, foi realizada análise através de uma curva de diluição de amostras sintéticas de material genético dos alvos, com seis pontos de diluição e oito replicatas para cada ponto. O limite mínimo de detecção do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus, com confiança de 95%, é de 20 cópias/reação para Norovírus I (IC95 8,13 - 66,92), 75 cópias/reação para Norovírus II (IC95 19,3 - 541,42) e 15 cópias/reação para Rotavírus (IC95 5,87 - 39,02).

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* EAEC, *Salmonella enteritidis*, *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS, *Blastocystis hominis* strain BT1, *Giardia intestinalis* WB clone C6 e Sapovírus.

16.3. Precisão

Os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados com três operadores distintos em três termocicladores diferentes.

As amostras utilizadas foram de material genético dos alvos diluídas em série, com seis pontos de diluição para cada um dos três alvos detectáveis, e 7 a 8 réplicas em cada ponto.

Os coeficientes de variação obtidos foram todos inferiores a 5,8 e 5,2% para repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente.



16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus foi determinado através da análise de 379 amostras clínicas de suspensão fecal, previamente caracterizadas utilizando RT-qPCR. Os resultados estão descritos nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus para detecção de Rotavírus.

Rotavírus		Método de Referência		
		Detectável	Não Detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus	Detectável	79	11	90
	Não Detectável	1	288	289
	TOTAL	80	299	379

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 98,75% (CI95 92,27 - 99,93), especificidade diagnóstica de 96,32% (CI95 93,32 - 98,05), valor preditivo positivo de 87,78% (CI95 78,77 - 93,45), e valor preditivo negativo de 99,65% (CI95 97,78 - 99,98) para detecção de Rotavírus.

Tabela 7. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus para detecção de Norovírus Grupo I.

Norovírus Grupo I		Método de Referência		
		Detectável	Não Detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus	Detectável	70	4	74
	Não Detectável	1	304	305
	TOTAL	71	308	379

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 98,59% (CI95 91,35 - 99,93), especificidade diagnóstica de 98,70% (CI95 96,48 - 99,58), valor preditivo positivo de 94,59% (CI95 86,02 - 98,25), e valor preditivo negativo de 99,67% (CI95 97,90 - 99,98) para detecção de Norovírus Grupo I.

Tabela 8. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus para detecção de Norovírus Grupo II.

Norovírus Grupo II		Método de Referência		
		Detectável	Não Detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus	Detectável	94	2	96
	Não Detectável	2	281	283
	TOTAL	96	283	379

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 97,92% (CI95 91,96 - 99,64), especificidade diagnóstica de 99,29% (CI95 97,19 - 99,88), valor preditivo positivo de 97,92% (CI95 91,96 - 99,64), e valor preditivo negativo de 99,29% (CI95 97,19 - 99,88) para detecção de Norovírus Grupo II.

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 falso-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 falso-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 de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e 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 Rotavírus e Norovírus. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de RNA obtidas de suspensão fecal. O uso RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Rotavírus e Norovírus;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.