

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 contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de adenovírus (AdV), vírus sincicial respiratório (RSV) e rinovírus humano/enterovírus (hRV/EV), extraído de amostras de trato respiratório, obtidas de pacientes com suspeita de infecção ou coinfeção por esses patógenos. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico de infecções respiratórias, síndromes gripais e Síndrome Respiratória Aguda Grave.

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 entre -30°C e -15°C. A temperatura indicada para a 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



(Adenovírus) ou RNA (demais alvos) extraído de amostras de *swab* naso ou orofaríngeo. Para os alvos de RNA, nesta 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. Para o alvo de DNA, a molécula participa da reação em cadeia da polimerase sem a necessidade da etapa de transcrição reversa. A detecção do alvo ocorre da mesma forma, através da detecção de intensidade de fluorescência ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV permite a identificação de adenovírus, vírus sincicial respiratório e rinovírus humano/enterovírus, 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 extraídos 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 dos patógenos 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 com os seguintes termocicladores: 7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5 (Applied Biosystems), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e Amplio 96 (Loccus).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA e RNA extraído de coletas com *swab* naso ou orofaríngeo acondicionados em meio de transporte viral.

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

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina através de *swab* naso ou orofaríngeo e mantidas em meio de manutenção viral. 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 entre -90°C e -70°C.

8.2. Extração do DNA e RNA

Deve-se realizar a extração do DNA e do 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 no item 14.2 desta Instrução de Uso.

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA e RNA extraído

- Caso seja necessário, o armazenamento do DNA e RNA extraídos deve ser realizado entre -90°C e -70°C;
- Ciclos de congelamento e descongelamento do DNA e RNA extraídos devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético;
- 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 microrganismos, 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

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

- 01 microtubo de Tampão de Reação contendo 550 µL;
- 01 microtubo de Oligomix II contendo 1.000 µL;
- 01 microtubo de Enzima Taq contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Enzima RT contendo 60 µL;
- 01 microtubo de controle positivo (CP) contendo 60 µL;
- 01 microtubo de controle negativo (CN) contendo 60 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 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, 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);
- Ponteiras esterilizadas livre de enzimas do tipo RNase e DNase 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

Este é um produto de uso múltiplo. O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até 10 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 e RNA extraídos 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 utilização 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.

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 AdV, RSV e hRV/EV.

Componente	Volume para uma reação
Tampão de Reação	5 µL
Oligomix	9,1 µL
Enzima Taq	0,4 µL
Enzima RT	0,5 µL
Total	15 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, ajustado ao 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 DNA e 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 no software do equipamento conforme o 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 a Tabela 2.

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

Alvo	Fluoróforo	Quencher
AdV	FAM	NONE
RSV	TexasRed/ROX*	NONE
hRV/EV	VIC	NONE
CI	CY5	NONE

*Selecionar o canal de acordo com o termociclador em tempo real: TexasRed para 7500, Amplio 96 e CFX96; ROX para QuantStudio 5.

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

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01
Estágio 2	95	2 minutos	01
Estágio 3	95	15 segundos	40
	55*	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 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	Alvo	Threshold	Baseline
7500	AdV	60.000	3 – 15
	RSV	60.000	3 – 15
	hRV/EV	50.000	3 – 15
	CI	20.000	3 – 15
QuantStudio 5	AdV	20.000	3 – 15
	RSV	30.000	3 – 15
	hRV/EV	30.000	3 – 15
	CI	10.000	3 – 15
CFX 96	AdV	100	AUTO
	RSV	100	AUTO
	hRV/EV	120	AUTO
	CI	100	AUTO
Amplio 96*	AdV	150	AUTO
	RSV	200	AUTO
	hRV/EV	300	AUTO
	CI	100	AUTO

* Necessário ativar o modo *Hypersensitive* para a análise.

14.2. Interpretação dos resultados

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os três alvos virais e para o Controle Interno, apresentando $Ct \leq 35$;

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos três alvos virais, e deve apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 30$;

– Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação para os alvos 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 se não houver amplificação do controle interno.

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

Tabela 5. Critérios de interpretação e avaliação dos resultados.

Amostra				CP	CN	Resultado
AdV	RSV	hRV/EV	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+/-	+	-	Adenovírus detectável
-	+	-	+/-	+	-	Vírus sincicial respiratório detectável
-	-	+	+/-	+	-	Rinovírus/Enterovírus detectável
-	+	+	+/-	+	-	Vírus sincicial respiratório e Rinovírus/Enterovírus detectáveis
+	-	+	+/-	+	-	Adenovírus e Rinovírus/Enterovírus detectáveis
+	+	-	+/-	+	-	Adenovírus e Vírus sincicial respiratório detectável
+	+	+	+/-	+	-	Adenovírus, Vírus sincicial respiratório e Rinovírus/Enterovírus detectáveis
-	-	-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

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

– Caso o CP não apresente amplificação para os alvos esperados, o ensaio é considerado inválido e os resultados das amostras não são interpretáveis;

– Caso o CN apresente amplificação para os alvos virais, o ensaio é considerado inválido e os resultados das amostras não são interpretáveis;

– A amplificação dos alvos virais no CN é indicativa de contaminação do ensaio e este deve ser repetido. Nesses casos,

considere a adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;

– Amostras com $Ct \geq 35$ para os alvos virais devem ser retestadas (com nova extração) e deverão ser consideradas positivas se houver amplificação típica no reteste, independentemente do valor de Ct obtido, e mesmo se não houver amplificação do CI;

– O kit é capaz de detectar coinfeções desde que os vírus detectados estejam dentro das faixas de interpretações descritas no item 14.2;

– 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, rinovírus humano e enterovírus;

– Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico somente na fase aguda da doença, até o 7º dia com sintomas;

– Há alta homologia entre as sequências nucleotídicas de rinovírus humano e outros enterovírus, uma vez que ambos pertencem ao gênero *Enterovirus*, família Picornaviridae. Por esse motivo, amostras positivas para hRV/EV requerem testes complementares específicos para a identificação precisa do agente viral envolvido.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção foram realizados experimentos em equipamento do modelo 7500, os quais foram analisados pelo modelo Probit.

Os limites de detecção do Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV, com confiança de 95%, é de 168,63 cópias/reação (IC95% 40,08 – 1.411,17) para Adenovírus, 7,27 cópias/reação (IC95% 2,98 –

42,22) para o Vírus Sincicial Respiratório e 26,67 cópias/reação (IC95% 10,67 – 98,82) para Rinovírus humano/Enterovírus.

16.2. Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente à análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Mycobacterium tuberculosis*, Metapneumovírus humano, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, Coronavírus HKU1, Coronavírus NL63, Coronavírus 229E, Coronavírus OC43, SARS-CoV-2 Ômicron, SARS-CoV-2 Ômicron BA.2, SARS-CoV-2 Delta B.1.617.2, SARS-CoV-2 B.1.351, SARS-CoV-2 B.1.1.7, SARS-CoV-2 P.01, Influenza A H1N1, Influenza A H3, Influenza A H5, Influenza A H1, Influenza B (variantes Victoria e Yamagata), Bocavírus, MERS, SARS-CoV (2003) e *Haemophilus influenzae*.

16.3. Precisão

O Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV apresenta coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade iguais ou inferiores a 4,98% e 3,58%, respectivamente, em testes conduzidos por três operadores distintos em três termocicladores do modelo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel com 211 amostras clínicas previamente caracterizadas utilizando metodologia molecular. Os resultados estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Comparação entre resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV e o método de referência.

Alvo	Resultado	Referência		
		Positivo	Negativo	Total
AdV	Detectado	55	0	55
	Não detectado	0	156	156
	Total	55	156	211
RSV	Detectado	71	3	74
	Não detectado	0	137	137
	Total	71	140	211
hRV/EV	Detectado	87	8	95
	Não detectado	1	115	116
	Total	88	123	211



Tabela 7. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol AdV, RSV e hRV/EV.

Alvo	Sens.	Espec.	VPP	VPN
AdV	100% (CI95% 93,51 – 100)	100% (CI95% 97,66 – 100)	100% (CI95% 93,51 – 100)	100% (CI95% 97,66 – 100)
RSV	100% (CI95% 94,94 – 100)	97,86% (CI95% 93,87 – 99,56)	95,95% (CI95% 88,54 – 98,64)	100% (CI95% 97,34 – 100)
hRV/EV	98,86% (CI95% 93,83 – 99,97)	93,50% (CI95% 87,59 – 97,15)	91,58% (CI95% 84,76 – 95,51)	99,14% (CI95% 94,24 – 99,88)

Legenda: Sens.: Sensibilidade diagnóstica; Espec.: Especificidade diagnóstica; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo.

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;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nesta Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA e RNA obtidas a partir de coletas com swab de naso ou orofaringe armazenado 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.