

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV
IU-IVD-026
Revisão: 04 - 11/03/2026



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV.

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 dos vírus Parainfluenza 1 (hPIV1), Parainfluenza 3 (hPIV3) e Metapneumovírus (hMPV), extraído de amostras de trato respiratório, obtidas de pacientes com suspeita de infecção ou coinfeção por esses vírus.

O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para triagem, monitoramento e/ou auxiliar o diagnóstico de síndromes respiratórias causadas por esses patógenos.

PRODUTO PARA 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. 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 hPIV1, hPIV3 e hMPV 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 dos patógenos, em RNA extraído de amostras de trato respiratório. 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 hPIV1, hPIV3 e hMPV permite a identificação dos vírus Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 e Metapneumovírus, além de um Controle Interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos 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 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), o qual avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos pesquisados, exceto para o CI.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência dos alvos moleculares. 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), Ampio 96 (Locus) e CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de coleta com *swab* naso ou orofaríngeo acondicionadas em meio de transporte viral.

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

As amostras devem ser coletadas conforme método padrão de rotina. Recomenda-se coleta preferencialmente entre o terceiro e o sétimo dia após o início dos sintomas. Após coleta, as amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre -30°C e -15°C por até 3 meses. Caso haja necessidade de armazenamento por período prolongado, armazenar entre -90°C a -70°C. Ciclos de congelamento e descongelamento das amostras devem ser evitados devido a possível degradação do material genético.

8.2. Extração do 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

- RNA extraído deve ser armazenado entre -90°C a -70°C;
- Usar sempre 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 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 hPIV1, hPIV3 e hMPV é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Tampão de Reação contendo 550 µL;
- 01 microtubo de Enzima Taq contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Enzima RT contendo 60 µL;
- 01 microtubo de Oligomix III contendo 1.000 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 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 posições;
- 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);
- Ponteiras livres de RNAses e DNAses com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV
IU-IVD-026

Revisão: 04 - 11/03/2026

– Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 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 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 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 em 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 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 hPIV1, hPIV3 e hMPV.

| Componente | Volume para uma reação |
|------------------|------------------------|
| Tampão de reação | 5 µL |
| Enzima Taq | 0,4 µL |
| Enzima RT | 0,5 µL |
| Oligomix III | 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, ajustado ao número de reações a serem realizadas;

– Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilar 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 dos 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 de 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 com adesivo óptico;

– Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configurações de detecção e termociclagem

– Configurar no software do equipamento conforme mapa da placa estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle positivo e o 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 repórter | Quencher |
|-------|---------------------|----------|
| hPIV1 | FAM | NONE |
| hPIV3 | VIC | NONE |
| hMPV | Texas Red/ROX* | NONE |
| CI | Cy5 | NONE |

*Fluoróforo ROX indicado para equipamento QuantStudio5, Texas Red indicado para os demais equipamentos validados.

Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE, quando aplicável;

– Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV.

| Etapa | 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 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 | Alvos | Threshold | Baseline |
|------------------------------------|-------|-----------|------------|
| 7500 Real-Time PCR System | hPIV1 | 200.000 | 6 – 15 |
| | hPIV3 | 50.000 | 6 – 15 |
| | hMPV | 50.000 | 6 – 15 |
| | CI | 30.000 | 6 – 15 |
| QuantStudio 5 Real-Time PCR System | hPIV1 | 60.000 | 6 – 15 |
| | hPIV3 | 10.000 | 6 – 15 |
| | hMPV | 15.000 | 6 – 15 |
| | CI | 15.000 | 6 – 15 |
| Amplio96* | hPIV1 | 400 | Automático |
| | hPIV3 | 200 | Automático |
| | hMPV | 200 | Automático |
| | CI | 200 | Automático |
| CFX96 | hPIV1 | 350 | Automático |
| | hPIV3 | 200 | Automático |
| | hMPV | 90 | Automático |
| | CI | 100 | Automático |

Nota: *A análise de corridas no equipamento Amplio96 deve ser feita com o modo *Hypersensitive* ativo.



14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 35.
 - Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos virais e deve apresentar amplificação do Controle Interno com Ct ≤ 30.
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos virais, 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 um ou mais vírus testados 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 de resultados do Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV.

| Amostra | | | | CP | CN | Resultado |
|---------|-------|------|-----|-----|-----|--|
| hPIV1 | hPIV3 | hMPV | CI | | | |
| - | - | - | + | + | - | Não detectável |
| + | - | - | +/- | + | - | Parainfluenza 1 detectável |
| - | + | - | +/- | + | - | Parainfluenza 3 detectável |
| - | - | + | +/- | + | - | Metapneumovírus detectável |
| + | + | - | +/- | + | - | Parainfluenza 1 e Parainfluenza 3 detectáveis |
| + | - | + | +/- | + | - | Parainfluenza 1 e Metapneumovírus detectáveis |
| - | + | + | +/- | + | - | Parainfluenza 3 e Metapneumovírus detectáveis |
| + | + | + | +/- | + | - | Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 e Metapneumovírus detectáveis |
| - | - | - | - | + | - | Amostra inválida |
| +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | + | Ensaio inválido |
| +/- | +/- | +/- | +/- | - | +/- | Ensaio inválido |

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

- Amostras inválidas, ou seja, que não apresentem amplificação dos alvos virais e não apresentem amplificação do CI, ou amplificação do CI com Ct ≥ 35, devem ter seu RNA extraído novamente;
- Amostras com Ct ≥ 35 para os alvos virais são consideradas inconclusivas. Elas devem ser retestadas a partir de uma nova extração e devem ser consideradas positivas se apresentarem amplificação com curva de perfil típico, independentemente do valor de Ct;
- Amplificações dos alvos virais no Controle Negativo são indicativas de contaminação do ensaio e este deve ser repetido. A reincidência deste resultado indica a necessidade de adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;
- Amplificações dos alvos presentes no Controle Positivo e no Controle Negativo com Ct > 35 indicam falhas operacionais, contaminação por inibidores ou degradação dos insumos, indicando que devem ser utilizados protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos.

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 trato respiratório coletadas como *swab* de naso ou orofaringe, acondicionadas em meio de transporte viral, podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Uma amostra com resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 e/ou Metapneumovírus;
- Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico durante a fase aguda da doença, preferencialmente entre o terceiro e o sétimo dia após o início dos sintomas.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite de detecção, foram testados de sete a 12 pontos de diluição de RNA dos três alvos virais. O limite de detecção, com confiança de 95%, é de 16 cópias/reação (IC95% 5,63 – 102,85) para o vírus Parainfluenza 1, 4,7 cópias/reação (IC95% 2,16 – 38,51) para o vírus Parainfluenza 3 e 14,15 cópias/reação (IC95% 4,66 – 123,83) para Metapneumovírus.

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Mycobacterium tuberculosis*, Vírus Sincicial Respiratório A e B, Adenovírus, Rinovírus, Parainfluenza 2, Coronavírus NL63, Coronavírus HKU1, Coronavírus OC43, Coronavírus 229E, Bocavírus, Influenza A H1N1, H3 e H5, Influenza B e SARS-CoV-2.

16.3. Precisão

Para a definição da precisão de medição foram testados RNA dos três alvos virais separadamente. O Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV apresenta coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade inferiores a 4,4% e 2,65%, respectivamente.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 160 amostras clínicas de *swab* de nasofaringe, previamente caracterizadas por RT-qPCR. Os resultados estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV e o método de referência.

| | | Método de Referência | | | |
|-------------------------------------|-------|----------------------|----------------|-------|-----|
| | | Detectável | Não detectável | Total | |
| Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV | hPIV1 | Detectável | 52 | 0 | 52 |
| | | Não detectável | 0 | 108 | 108 |
| | | Total | 52 | 108 | 160 |
| | hPIV3 | Detectável | 54 | 0 | 54 |
| | | Não detectável | 0 | 106 | 106 |
| | | Total | 54 | 106 | 160 |
| | hMPV | Detectável | 54 | 1 | 55 |
| | | Não detectável | 0 | 105 | 105 |
| | | Total | 54 | 106 | 160 |



Tabela 7. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV.

| Alvo | Sens. | Espec. | VPP | VPN |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| hPIV1 | 100,00% (CI95% 93,15 – 100,00) | 100,00% (CI95% 96,64 – 100,00) | 100,00% (CI95% 93,15 – 100,00) | 100,00% (CI95% 96,64 – 100,00) |
| hPIV3 | 100,00% (CI95% 93,40 – 100,00) | 100,00% (CI95% 96,58 – 100,00) | 100,00% (CI95% 93,40 – 100,00) | 100,00% (CI95% 96,58 – 100,00) |
| hMPV | 100,00% (CI95% 93,40 – 100,00) | 99,06% (CI95% 94,86 – 99,98) | 98,18% (CI95% 88,48 – 99,74) | 100,00% (CI95% 96,55 – 100,00) |

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.

19. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- 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, transporte e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV. Amostras coletadas, transportadas 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 RNA extraído de amostras obtidas do trato respiratório. O uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol hPIV1, hPIV3 e hMPV;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.