



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol VET Raiva.

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP
– CNPJ: 03.585.986/0001-05
RUA PROFESSOR ALCACYR 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 16:30h (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 *Lyssavirus*, extraído de amostras de tecido do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos com suspeita de infecção.

O Kit IBMP Biomol VET Raiva é capaz de detectar o vírus da raiva (*Lyssavirus rabies*, RABV), além de outros *Lyssavirus* não circulantes nas Américas como *Aravan virus*, *Australian bat Lyssavirus*, *Bokeloh bat Lyssavirus*, *Duvenhage virus*, *European bat Lyssavirus 1 e 2*, *Irkut virus*, *Gannoruwa Caucasian bat Lyssavirus* e *Khujand virus* pertencentes ao filogruppo 1; *Lagos bat Lyssaviruses A-D*, *Mokola virus* e *Shimoni bat virus* pertencentes ao filogruppo 2; e *Ikoma virus*, *Lleida bat Lyssavirus* e *West Caucasian bat virus* pertencentes ao filogruppo 3.

Este produto é indicado para uso como método confirmatório de resultados obtidos por outras técnicas laboratoriais, como imunofluorescência direta, para o diagnóstico da raiva.

PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO, NÃO PASSÍVEL DE REGULARIZAÇÃO. PROIBIDO O USO EM DIAGNÓSTICO HUMANO.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde, devidamente habilitados, com conhecimento específico em biologia molecular, especificamente em testes 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 do módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol VET Raiva 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 RNA extraído de tecidos do SNC de mamíferos com suspeita de infecção. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir de RNA extraído da amostra biológica) seguida de qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol VET Raiva permite a identificação de *Lyssavirus*, além da detecção de um Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos do *Lyssavirus* e do CI é feita através do uso 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 o alvo molecular pesquisado demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Amostras com resultados não detectáveis para o alvo molecular pesquisado 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 detecção para o alvo viral devem ter seu resultado considerado válido independente da amplificação do CI.

O kit possui um Controle Positivo (CP) sintético biosseguro (que não oferece riscos 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 experimentais e ambientais e que deve apresentar resultado não detectável para o alvo viral, e resultado detectável para o CI.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia a presença ou ausência do alvo molecular. O produto não é validado para análise quantitativa. Produto validado para uso nos seguintes termocicladores: 7500 Real-Time PCR System, 7500 FAST Real-Time PCR System, QuantStudio 5, QuantStudio DX (Applied Biosystems), CFX96 (Bio-Rad) e Amplio 96 (Loccus).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de tecidos do SNC (córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico ou medula) de animais de produção como bovinos, equinos, asininos, caprinos, suínos e ovinos; espécies de animais domésticos como cães e gatos; e espécies de mamíferos selvagens como morcegos hematófagos e não hematófagos.

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

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de rotina pré-definidos no **Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e no Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva do Ministério da Saúde**. A coleta e o manuseio das amostras de animais suspeitos de estarem acometidos de raiva deverá ser efetuada por profissional da área da saúde, devidamente habilitado, que tenha recebido treinamento adequado e que esteja devidamente imunizado.

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

– Caso seja necessário, o armazenamento do RNA extraído deve ser realizado entre -90°C e -70°C.

– Ciclos de congelamento e descongelamento do RNA extraído devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético.

– Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA extraído a fim de prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear microrganismos, que são as fontes mais comuns destes contaminantes.

– 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

Kit IBMP Biomol VET Raiva é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 02 microtubos de Pro Mix contendo 800 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 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 esterilizadas livres de nucleases 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

Esse é um produto de uso múltiplo. O estudo de estabilidade demonstrou que produto mantém sua qualidade por até 5 ciclos de descongelamento, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas.

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 em cada corrida;
- Elaborar um 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;

- Homogeneizar o Pro Mix gentilmente por pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*). Este componente é a mistura de reação pronta para o uso;

OBS: O Pro Mix contém um corante inerte de coloração azul, a fim de auxiliar o processo de dispensação na placa de PCR.

- Distribuir 15 µL do Pro Mix 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 das 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 único correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL de Controle Negativo (CN) no poço único 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 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 1.

Tabela 1. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo reporter	Quencher
Raiva	FAM	None
CI	CY5	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol VET Raiva.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 min	1
Estágio 2	95	2 min	1
Estágio 3	95	15 segundos	40
	56*	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 análise dos resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 3, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 3. Parâmetros analíticos a serem utilizados para cada termociclador.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 7500 FAST QuantStudio DX	Raiva	0,1	AUTO
	CI	0,04	AUTO
QuantStudio 5	Raiva	0,1	6 – 15
	CI	0,04	6 – 15
CFX96 Amplio 96	Raiva	100	3 – 15
	CI	100	3 – 15

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o CP deve apresentar amplificação para os alvos Raiva e CI, com Ct ≤ 33;
 - Para que uma corrida seja considerada válida, o CN não deve apresentar amplificação para o alvo Raiva, e deve apresentar amplificação do CI com Ct ≤ 33.
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação para o alvo Raiva e deve apresentar amplificação do CI com Ct ≤ 33;
 - Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com perfil típico para o alvo Raiva com Ct ≤ 40, com ou sem amplificação do CI.
- Os critérios para interpretação dos resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Critérios para interpretação resultados do Kit IBMP Biomol VET Raiva.

Amostra		CP	CN	Resultado
Raiva	CI			
-	+	+	-	Vírus da raiva não detectável
+	+/-	+	-	Vírus da raiva detectável
-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+	Ensaio Inválido
+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora dos critérios 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 do alvo viral, o ensaio é considerado inválido e os resultados das amostras não são interpretáveis;

– A amplificação do alvo viral no CN é indicativa de contaminação do ensaio e este deve ser repetido. Nesses casos, considere a adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;

– Amplificações dos alvos presentes no CP e CN com Ct > 33 podem indicar falhas operacionais, contaminação por inibidores ou degradação dos insumos. Nesses casos, considere utilizar protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos;

– Ausência de amplificação ou Ct > 33 no CI das amostras pode indicar problemas no processo de coleta e armazenamento, ou no processo de extração. Nesses casos, recomenda-se testar a amostra novamente a partir de uma nova extração. Caso o perfil persista, convém realizar uma nova coleta, quando possível.

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 (para mais detalhes, consultar o item 8 desta Instrução de Uso);

– Amostras de tecido do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos podem ser utilizadas com o kit IBMP Biomol VET Raiva. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com este produto;

– Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol VET Raiva devem ser interpretados em conjunto com informações epidemiológicas e laboratoriais. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção pelo vírus da raiva;

– As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina para testes moleculares seguindo as recomendações do Ministério da Saúde/Ministério da Agricultura ou das respectivas Secretarias de Saúde.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção, foram testadas oito diluições do RNA do vírus da raiva, cada uma analisada em oito réplicas, em diferentes equipamentos de qPCR em tempo real.

O limite de detecção do Kit IBMP Biomol VET Raiva com confiança de 95% é de 28,9 cópias/reacção nos equipamentos 7500, 7500 FAST e QuantStudio 5; 14,8 cópias/reacção no equipamento QuantStudio DX; 8,3 cópias/reacção no equipamento CFX96 e 29,2 cópias/reacção no equipamento Amplio 96, para detecção do vírus da raiva.

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol VET Raiva não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para vírus da estomatite vesicular sorotipo Indiana, herpesvírus equino tipo 1, alfa herpesvírus bovino tipo 1, alfa herpesvírus bovino tipo 5,

herpesvírus ovino tipo 2, herpesvírus suíno tipo 1, herpesvírus simples tipo 1, vírus do Nilo ocidental, vírus da encefalite de Saint Louis, vírus Mayaro, vírus Rocio, vírus da encefalite equina do leste, vírus da encefalite equina do oeste, vírus da encefalite equina venezuelana, rinovírus humano, vírus Influenza A subtipo H3, vírus da febre amarela, *Listeria monocytogenes*, *Brucella canis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

16.3. Precisão

Os testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizadas por três operadores diferentes em três equipamentos distintos a partir de curvas de diluição.

Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade demonstraram coeficientes de variação inferiores a 2% e 1%, respectivamente.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 519 amostras clínicas de tecido do SNC de bovinos, caprinos, equinos, ovinos, canídeos, felídeos e quirópteros, previamente caracterizadas em laboratórios de referência, sendo 217 determinadas positivas e 302 determinadas negativas para o vírus da raiva. Os resultados da análise estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol VET Raiva.

Kit IBMP Biomol VET Raiva	Método de referência		
	Detectável	Não detectável	Total
Detectável	216	1	217
Não detectável	1	301	302
Total	217	302	519

O teste apresentou sensibilidade diagnóstica de 99,5% (IC95% 97,5 – 100%) e especificidade diagnóstica de 99,7% (IC95% 98,2 – 100%) com acurácia de 99,6% (IC95% 98,6 – 100%) para a detecção do vírus da raiva.

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 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, a distribuição do Pro Mix na placa 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

– 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 VET Raiva. 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 RNA obtidas das matrizes biológicas descritas no item 8. O uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol VET Raiva;

– O produto foi validado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso;

– O Kit IBMP Biomol VET Raiva não é destinado para uso em diagnóstico humano. Por se tratar de um produto para uso em amostras veterinárias, este produto está sujeito à regulação pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Contudo, o órgão não determina legislação específica para produtos que usam a técnica de qPCR, conforme citado em Art. 44 do Decreto nº 5053/2004, o qual isenta de registro testes que utilizam metodologia molecular.