



# KIT MOLECULAR VS/VR BIO-MANGUINHOS

Teste para detecção de Sarampo e Rubéola

**(6X16 reações)**

**Conservar de -30 °C a -10 °C**

Uso em diagnóstico *in vitro*



## KIT MOLECULAR VS/VR - BIO-MANGUINHOS

Teste para detecção de Sarampo e Rubéola

(6X16 reações)

Conservar de -30 °C a -10 °C

Uso em diagnóstico *in vitro*

### 1. NOME COMERCIAL

Kit Molecular VS/VR Bio-Manguinhos

### 2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular Sarampo e Rubéola (VS/VR) Bio-Manguinhos, baseia-se na tecnologia de PCR em Tempo Real e é indicado para o processamento de amostras clínicas, previamente submetidas a etapa de extração de ácidos nucleicos. Este produto desenvolvido é um ensaio triplex que utiliza sondas TaqMan capaz de detectar os vírus Sarampo e Rubéola, através da amplificação por PCR em tempo real, e como controle interno (CI) o ensaio detecta uma região do gene constitutivo humano- RNaseP (RP).

**Produto destinado exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro*.**

### 3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E ESTABILIDADE DO PRODUTO:

Conjunto de Reagentes: -30 °C a -10 °C.

Não são de responsabilidade do fabricante:

- Insumos armazenados fora da temperatura especificada;
- Os procedimentos da etapa de extração;
- Ocorrência de contaminação ambiental (*amplicon*);

#### Observações:

- \* Todos os reagentes deverão ser armazenados nas temperaturas indicadas no rótulo externo, desde o ato do recebimento até a utilização do conjunto, observando a data de validade.
- \* Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização do kit de acordo com os procedimentos de cada laboratório.

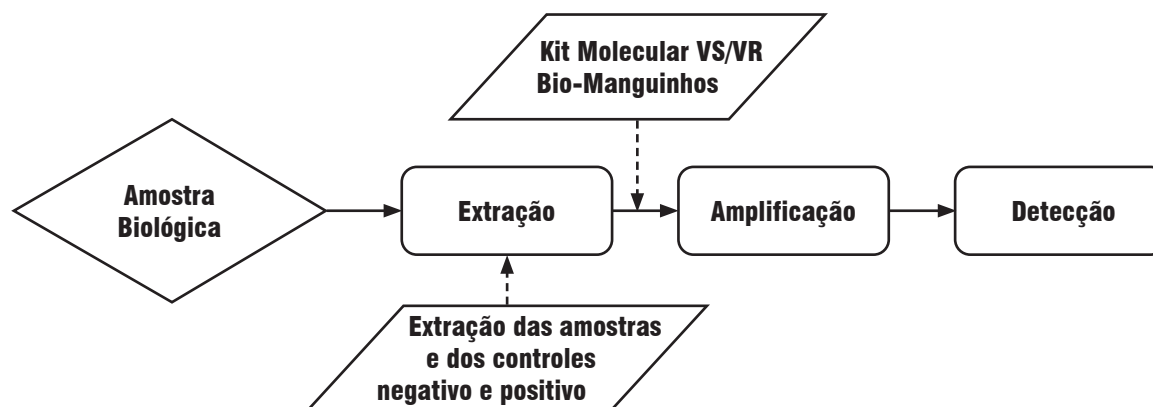
#### 4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

A metodologia para detecção e amplificação dos alvos do Kit Molecular VS/VR tem como base a metodologia de PCR em tempo real.

Segue, abaixo, o fluxo metodológico:

- etapa prévia de **extração** de ácido nucléico da amostra biológica em conjunto com os controles negativo e positivo do produto.
- amplificação** do ácido nucléico;
- detecção** do ácido nucléico por RT-PCR em tempo real.

Esquema do Teste:



##### • Etapa de Extração

Vide Manual de Instruções do fabricante do Kit de Extração de RNA.

Adicionar ao protocolo de extração os controles negativo e positivo do Kit Molecular VS/VR- Bio-Manguinhos em conjunto com as amostras clínicas.

**Nota:** Se o RNA extraído das amostras clínicas e dos controles positivo e negativo não forem amplificados imediatamente após a extração, deverão ser armazenados de -30 °C a -10 °C.

##### • Etapa de Amplificação e Detecção

A transcrição reversa do RNA em cDNA antecede à amplificação. A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência é usada para determinar a presença dos vírus Sarampo e Rubéola e do alvo *RNAse P*, controle interno da reação. Os equipamentos indicados para serem utilizados na etapa de amplificação e de detecção são: o ABI 7500 Real Time PCR System, Quant Studio 6 Flex ou Quant Studio 7 Flex da Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, somente em placas de 96 poços.

#### 5. TIPOS DE AMOSTRAS

Este produto deve ser utilizado com RNA extraído a partir de swab de nasofaringe ou urina.

#### 6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

##### a. Relação dos componentes fornecidos com o produto

| CONJUNTOS DE REAGENTES | COMPONENTES       | VOLUME (µL)       |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| Amplificação           | Mistura de PCR    | 6 frascos com 90  |
|                        | Mix VS/VR         | 6 frascos com 90  |
| Controles              | Controle Negativo | 6 frascos com 400 |
|                        | Controle Positivo | 6 frascos com 400 |

## b. Materiais Necessários não Fornecidos

- Kit de extração de ácido nucléico
- Acessórios para automação das etapas de extração e de preparo da Mistura de RT-PCR
- Luva descartável sem talco
- Sacos de descarte de lixo biológico
- Microcentrífuga
- Ponteiras para uso único, com filtro e estéreis, de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL
- Pipetas de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL
- Microtubo 1,5mL
- Placa óptica de 96 reações
- Selo óptico
- *Vortex*

## c. Versão do software BioLaudos

BioLaudos a partir da versão 2.0.0

## 7. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O uso do Kit Molecular VS/VR Bio-Manguinhos processa uma rotina com 84 amostras clínicas ou 6 rotinas de 14 amostras clínicas com 2 controles cada.

## 8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO

### 8.1 Procedimento de Amplificação - Real Time ABI 7500, QuantStudio 6 Flex ou QuantStudio 7 Flex em placa de 96 poços/200µL.

- Retirar do freezer os reagentes descritos abaixo e aguardar o descongelamento dos mesmos à temperatura ambiente;
- Imediatamente após o descongelamento e antes do preparo da mistura de RT-PCR VS/VR, homogeneizar e centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos,

### Preparo Manual das misturas de RT-PCR VS/VR:

- Adicionar no microtubo da mistura de PCR, o volume de Mix VS/VR de acordo a tabela abaixo (para 16 amostras):

### Mistura de RT-PCR VS/VR

| Conjunto de reagentes | VOLUME (µL) |            |
|-----------------------|-------------|------------|
|                       | 1 reação    | 16 reações |
| Mistura de PCR        | 5,0         | 90*        |
| Mix VS/VR             | 5,0         | 90*        |

\*Valores incluindo o volume morto de reação

- Homogeneizar bastante a mistura de RT-PCR VS/VR com uma pipeta (evitando formação de bolhas) ou auxílio de um *vortex*;
- Fazer uma rápida centrifugação (*spin*);
- Distribuir a mistura de RT-PCR VS/VR na placa de amplificação, de acordo com a sugestão do desenho abaixo:
  - o Adicionar 10µL da mistura de RT-PCR VS/VR em cada poço da placa óptica.
- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes, conforme indicado no desenho da placa de amplificação abaixo:
  - o Adicionar 10 µL de Controle Positivo no poço H2; e adicionar 10 µL de Controle Negativo no G2.
  - o Adicionar 10 µL de amostras de pacientes nos demais poços, para detecção do VS/VR.

## Desenho da placa de amplificação (16 reações)

|   | 1         | 2          | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|------------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Amostra 1 | Amostra 9  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | Amostra 2 | Amostra 10 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | Amostra 3 | Amostra 11 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | Amostra 4 | Amostra 12 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | Amostra 5 | Amostra 13 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | Amostra 6 | Amostra 14 |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | Amostra 7 | CNEG       |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | Amostra 8 | CPOS       |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

Legenda:

CNEG – Controle Negativo

CPOS – Controle Positivo

- Após a adição na placa óptica da mistura de RT-PCR VS/VR dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa óptica com selo óptico. **Utilizar o vortex para homogeneizar as misturas por 2 minutos a 1200 rpm;**
- Verificar se em todos os poços o material está homogeneizado com coloração azul claro; **Centrifugar a placa selada por 30 segundos** e iniciar a reação de RT-PCR no equipamento de PCR em tempo real.

## 8.2 Amplificação e detecção

Para a análise adequada dos resultados, é necessária a instalação do *Template* (.edt) no equipamento de PCR em tempo real, abrir o arquivo **EDS** após a corrida utilizando o **software Design and Analysis Versão 2.60 (Thermo Fisher)**, e a instalação do software BioLaudos para geração de laudo.

**Orientações para o download dos softwares, instalação e utilização, entrar em contato com o SAC/DIACM de Bio-Manguinhos pelo [moleculares@bio.fiocruz.br](mailto:moleculares@bio.fiocruz.br) ou 08000210310.**

- Ligar o computador do equipamento de PCR em tempo real;
- Ligar o equipamento de PCR em tempo real (ABI 7500 Real Time PCR System, QuantStudio 6 Flex ou 7 Flex);
- Colocar a placa óptica no equipamento de PCR em tempo real;
- Evitar tocar no fundo da placa. Certificar-se de que a posição A1 da placa está no canto superior esquerdo;
- No computador do equipamento, clicar ícone para abertura do software do equipamento ABI 7500 Real Time PCR System, QuantStudio 6 Flex ou QuantStudio 7 Flex;
- Após a inicialização do software, clicar no ícone **Template**;
- Abrir o **template: Deteccao 6x16 VS\_VR.edt**;
- Antes de iniciar a corrida, salvá-la;
- Clicar no ícone **Start Run**;
- Após o término da corrida, salvar a corrida (.eds) e copiá-la em um *pendrive*.

Para geração do laudo seguir as informações do **Manual de Uso para Geração de Laudo no Software “BioLaudos”** (Bio-Manguinhos).

9. OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

9.1 Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

Abaixo estão relacionados os critérios de aceitação para aprovação da rotina de RT-PCR para os Controles Negativo e Positivo.

| CONTROLE       | CT                                                                  | RESULTADOS                                                                                           |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Negativo       | Não detectado para todos os alvos virais.<br>Ct ≤ 40 para o alvo RP | <b>Rotina válida</b>                                                                                 |
|                | Detectado com Ct ≤ 40 para qualquer um dos alvos virais             | <b>Rotina inválida</b><br>Repetir o teste. Possível contaminação.                                    |
| Positivo VS/VR | Ct ≤ 37 para o alvo VS<br>Ct ≤ 37 para o alvo VR                    | <b>Rotina válida</b>                                                                                 |
|                | Ct >37 para o alvo VS e VR                                          | Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR |

9.2 Interpretação dos resultados

Na tabela abaixo, estão descritos os critérios de interpretação de cada alvo com relação ao diagnóstico (Detectado ou não detectado).

| ALVOS | VALOR DE CT | RESULTADOS |
|-------|-------------|------------|
| VS    | Ct ≤ 40,0   | Detectado  |
| VR    | Ct ≤ 40,0   | Detectado  |
| RP    | Ct ≤ 37,0   | Detectado  |

Na tabela abaixo, estão descritos os critérios de interpretação de cada alvo com relação ao diagnóstico (detectado ou não detectado).

| INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS ALVOS VS/VR |    |      |                                                |
|-----------------------------------------|----|------|------------------------------------------------|
| VS                                      | VS | RP   | Resultado                                      |
| D                                       | ND | D/NA | <b>VS detectado.<br/>VR não detectado.</b>     |
| ND                                      | D  | D/NA | <b>VS não detectado.<br/>VR detectado.</b>     |
| D                                       | D  | D/NA | <b>VS e VR detectado.</b><br>Repetir amostra*  |
| ND                                      | ND | D    | <b>VS e VR não detectado.</b>                  |
| ND                                      | ND | ND   | <b>Vírus e RP Não detectados.<br/>Inválido</b> |

D: detectado; ND: não detectado; NA: não avaliado

- Quando o **Alvo RP** apresentar o resultado como “Não detectado”, e o alvo **VS** e/ou **VR** também for não detectado, é imprescindível realizar a repetição do ensaio a partir de uma nova extração e uma nova amplificação. Todos os resultados deverão ser analisados de acordo com os critérios descritos no item 9.1 - Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo e 9.2 - Interpretação de Resultados”;

- Valor de Ct do alvo RP não detectado, é indicativo de possíveis problemas na etapa de extração, devido a qualidade da amostra coletada e/ou volume insuficiente de extração (volumes inferiores a 200 µL). Neste caso, a extração deverá ser repetida e se o mesmo resultado permanecer, deve ser solicitada uma nova coleta;
- Quando os **Alvos VS e VR** apresentarem o resultado “detectado”, o alvo RP poderá não ser avaliado para a conclusão do ensaio.
- \*Em caso de repetição do ensaio, se o resultado se mantiver, a amostra deverá ser encaminhada para o **Laboratório de Referência**, com os dados clínicos e epidemiológicos, data da última vacinação, data da coleta da amostra e data do início dos sintomas/exantema.

## 10. USUÁRIO PRETENDIDO

Profissional técnico capacitado para processamento de amostras clínicas, utilização de insumos/kit e manuseio de equipamentos necessários para o diagnóstico molecular baseado na PCR em Tempo Real.

## 11. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

Evitar o uso de swabs alginatados ou de algodão para a coleta, pois interferem na PCR.

## 12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 12.1 Especificidade analítica e clínica

Não houve reação cruzada quando analisadas amostras verdadeiras positivas para Influenza A, Influenza B, RSV, Adenovirus, HIV, HCV, HBV, Zika, Chikungunya, Dengue, Sífilis, Varicela Zoster (VZV).

O KIT MOLECULAR VS/VR Bio-Manguinhos apresentou especificidade analítica de 100% e especificidade clínica de 99,9%.

### 12.2 Sensibilidade Analítica

O teste é capaz de detectar 1 cópia/µL (10 cópias/reação) para os alvos VS e VR.

As análises PROBIT (IBM SPSS Statistics v16.0), considerando uma taxa de 95% de positividade e um intervalo de confiança (IC) de 95%, apresentaram sensibilidade estimada 0,19 cópias/µL (1,9 cópias/reação) para o alvo VS e com uma taxa de 95% de positividade e um intervalo de confiança (IC) de 95%, apresentaram sensibilidade estimada de 0,09 cópias/µL (0,9 cópias/reação) para o alvo VR.

### 12.3 Sensibilidade Clínica

Quando testadas amostras verdadeiras positivas, o KIT MOLECULAR VS/VR Bio-manguinhos apresentou 100% de concordância.

### 12.4 Precisão

Para cálculo e avaliação da precisão do teste, foram obtidos os valores do coeficiente de variação (CV) de diluições para cada um dos alvos VS e VR.

| Kit Molecular VS/VR Bio-Manguinhos: Sarampo |        |       |      |      |      |      |
|---------------------------------------------|--------|-------|------|------|------|------|
| Cópias/µL                                   | 601,59 | 60,16 | 6,02 | 1,20 | 0,24 | 0,12 |
| CV (%)                                      | 0,18   | 0,46  | 0,24 | 0,35 | 1,33 | 2,15 |

| Kit Molecular VS/VR Bio-Manguinhos: Rubéola |        |       |      |      |      |      |
|---------------------------------------------|--------|-------|------|------|------|------|
| Cópias/µL                                   | 145,39 | 14,54 | 1,45 | 0,29 | 0,15 | 0,07 |
| CV (%)                                      | 0,82   | 0,46  | 1,20 | 1,26 | 1,67 | 3,08 |

## 12.5 Exatidão

Conforme esperado, os valores de exatidão expressos pelo Erro Padrão Relativo (EPR %) mínimo foi de 0,87% e máximo de -0,53% para o alvo VS, mínimo foi de 0,45 e máximo de -0,93% para o alvo VR.

**Observação:** A quantificação das amostras foi realizada através da técnica de PCR digital ou kit de quantificação (PCR em tempo real) comercial. E, as diluições seriadas foram extraídas utilizando o equipamento extrator Chemagic Prime (PerkinElmer). Sendo os resultados obtidos aplicáveis somente a esta metodologia e os números de cópias definidos por outros métodos não são necessariamente equivalentes.

## 13. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Ao manusear qualquer um dos reagentes, observe as precauções necessárias. A qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento às boas práticas de laboratório tais como:

- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI): luvas descartáveis (sem talco) e jaleco em todas as etapas do teste;
- Após o uso, desprezar ponteiros, tubos, placas, reagentes, insumos/produtos no descarte de risco biológico;
- Desprezar a placa óptica, após a amplificação e detecção, em descarte biológico;
- Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização de cada módulo do kit, de acordo com os procedimentos de cada laboratório;
- Não usar reagentes com a validade vencida;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- O teste deve ser usado somente para monitoramento *in vitro* e USO PROFISSIONAL, de acordo com as instruções fornecidas no kit.

## 14. DESCARTE DO PRODUTO

Após o uso, os componentes do produto devem ser descartados em recipientes destinados ao lixo biológico.

Os reagentes da etapa de extração (manual ou automatizada) devem ser descartados de acordo com a orientação do fabricante.

## 15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e em instalações de acordo com normas internas de Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório. O fabricante garante a qualidade do kit mediante seu uso adequado, descrito nestas Instruções de Uso, bem como orientações dadas durante o treinamento fornecido ao usuário.

## 16. RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Anvisa 80142170065

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-02 N° 021433/02.

### Fabricante:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio- Manguinhos  
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro- RJ  
CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira

### Regularizado por:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz  
Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ  
CNPJ 33.781.055/0001-35

**Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao:**  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos -Bio-Manguinhos  
Av. Brasil, 4.365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro- RJ  
CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira  
SAC.: 0800 021 0310 ou [moleculares@bio.fiocruz.br](mailto:moleculares@bio.fiocruz.br)

**Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.**

## **PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO**

### **17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- T J Bosma, K M Corbett, S O'Shea, J E Banatvala, and J M Best. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples, J Clin Microbiol. 1995 May; 33(5): 1075–1079.doi: 10.1128/jcm.33.5.1075-1079.1995.
- CDC real-time rubella RT-PCR protocol targeting rubella p150 gene. Instructions for Use. Centers for Disease Control and Prevention, protocol version 03/06/2012.
- Yoshihiro Yasui 1, Yoshio Mori, Hirokazu Adachi, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa. Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of having measles using reverse transcription-PCR. Jpn J Infect Dis. 2014;67(5):389-91. doi: 10.7883/yoken.67.389.
- CDC real-time measles RT-PCR protocol targeting measles N gene. Instructions for Use. Centers for Disease Control and Prevention, protocol version 03/06/2012.