

## RIDA® GENE Parainfluenza

**REF** PG5805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemanha

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®GENE Parainfluenza, realizado no Roche LightCycler® 480 II, é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação da parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 RNA em esfregaços nasais/garganta humana não tratados de pessoas com sinais e sintomas de infecção do trato respiratório aguda.

O teste RIDA®GENE Parainfluenza se destina a apoiar o diagnóstico de infecções virais (parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4) em pacientes com sintomas de infecção do trato respiratório em conexão com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não excluem a infecção pelo vírus da parainfluenza (parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4) e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

Os vírus da parainfluenza humana (HPIVs) são vírus RNA de cadeia simples da família *Paramyxoviridae*<sup>(1-3)</sup>. Podem causar várias doenças respiratórias, infectando inicialmente o epitélio mucociliar pseudostratificado das vias aéreas do nariz e da orofaringe antes de se espalharem para as vias aéreas grandes e pequenas<sup>(1)</sup>.

HPIVs são a segunda principal causa de internações em crianças menores de 5 anos<sup>(2)</sup> e são responsáveis por até 17 % das internações<sup>(3)</sup>.

HPIVs podem ser divididos geneticamente e antigenicamente em quatro serótipos que podem infectar humanos: HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3, e HPIV-4<sup>(1, 2)</sup>. HPIV-1 e -3 pertencem ao genus *Respirovirus*, enquanto HPIV-2 e -4 são classificados no genus *Rubulavirus*<sup>(1, 3)</sup>. A apresentação clínica varia de tipo para tipo: Os HPIV-1 e -2 causam frequentemente sintomas de crupe e gripe, enquanto o HPIV-3 está normalmente associado a pneumonia e bronquiolite. Até agora, o HPIV-4 não está muito bem caracterizado, mas suspeita-se que tenha uma apresentação clínica semelhante à do HPIV-3<sup>(2)</sup>. Mesmo o padrão sazonal é diferente entre os quatro serótipos: O HPIV-1 geralmente ocorre no outono dos anos ímpares, enquanto HPIV-2 ocorre no outono dos anos pares. As infecções por HPIV-3 surgem anualmente de Abril a Junho<sup>(2)</sup> e são, portanto, a principal causa de infecções clinicamente significativas entre os vírus da parainfluenza<sup>(1)</sup>. Por exemplo, 60 % das crianças com 2 anos de idade estão infectadas com HPIV-3, enquanto o número aumenta para 80 % entre as crianças até aos 4 anos de idade<sup>(3)</sup>. Geralmente, bebês, crianças, idosos e pessoas com sistema imunológico comprometido têm um risco mais elevado de uma infecção grave por HPIV, enquanto a infecção por HPIV em adultos saudáveis está normalmente limitada a sintomas ligeiros das vias respiratórias superiores<sup>(2, 3)</sup>. O HPIV é normalmente transmitido de humano para humano através do ar, por tosse e espirro, por contato humano próximo, ou por

toque nas mãos ou objetos contendo HPIV e depois tocando na boca, olhos ou nariz<sup>(4)</sup>.

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE Parainfluenza é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação da parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 em esfregaços nasais/garganta humana.

Após o isolamento do RNA, os fragmentos de genes específicos (se presentes) de parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 (gene HN) são amplificados. As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Parainfluenza contém um **Internal Control RNA** para ser capaz de controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial de inibição de PCR.

### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 100 determinações.

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos

| REF       | Código do kit | Reagente                    | Quantidade |         | Cor da tampa              |
|-----------|---------------|-----------------------------|------------|---------|---------------------------|
| PGZ5805RM | 1             | <b>Reaction Mix</b>         | 2 ×        | 1050 µL | amarelo, pronto para uso  |
| PGZ5805EM | 2             | <b>Enzyme Mix</b>           | 1 ×        | 80 µL   | vermelho, pronto para uso |
| PGZ5805IC | R             | <b>Internal Control RNA</b> | 2 ×        | 1700 µL | castanho, pronto para uso |
| PGZ5805NC | N             | <b>No Template Control</b>  | 1 ×        | 450 µL  | branco, pronto para uso   |
| PGZ5805PC | P             | <b>Positive Control</b>     | 1 ×        | 200 µL  | azul, pronto para uso     |

## 5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 °C - 8 °C).

**Tabela 2:** Condições de armazenamento e informação

|            | <b>Temperatura de armazenamento</b> | <b>Tempo máximo de armazenamento</b>           |
|------------|-------------------------------------|--|
| não aberto | -20 °C                              | Pode ser usado até a data de validade impressa |
| aberto     | -20 °C                              | 20 ciclos de descongelamento-congelamento      |

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

### 6.1 Reagentes fornecidos

Os seguintes reagentes são necessários para realizar o teste RIDA®GENE Parainfluenza:

| Reagentes                    |
|------------------------------|
| Água PCR (livre de nuclease) |

### 6.2 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®GENE Parainfluenza:

| Equipamentos   |
|--|
| Plataforma de extração: Instrumento MagNA Pure 96 (Roche)  |
| Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche)  |
| RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)  |
| Consumíveis PCR em tempo real (placas (baixo perfil, poços brancos, armação transparente), tubos de ensaio, lâminas) |
| Centrífuga com rotor para placas   |
| Vortexer   |
| Pipetas (0,5–20 µL, 20–200 µL, 100–1.000 µL)   |
| Pontas da pipeta com filtros   |
| Luvas descartáveis sem pó  |

Para perguntas sobre o uso de equipamentos para processamento automatizado, entre em contato com a R-Biopharm AG em [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR, o PCR deve ser usado para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não troque ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

As substâncias perigosas são indicadas de acordo com as obrigações de marcação. Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS).

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

O resumo de segurança e desempenho (SSP) deste produto estará disponível em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> assim que a Base de Dados Europeia de Dispositivos Médicos (EUDAMED) for iniciada. Na base de dados, procure o dispositivo usando o UDI-DI localizado na embalagem externa do dispositivo.

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

### 8.1 Preparação de RNA de esfregaços nasais e da garganta

Para a preparação de RNA a partir de esfregaços nasais e de garganta, recomenda-se o kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV no equipamento MagNA Pure 96 (Roche). Para isso, use o protocolo Pathogen Universal 200 e elua em 50 µL. As instruções do fabricante devem ser observadas.

O teste RIDA®GENE Parainfluenza contém um **Internal Control RNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado apenas como controle de inibição ou como controle de processo (controle de extração e inibição).

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição para amplificação, deve ser adicionado 1 µL de **Internal Control RNA** à Mistura Principal (consulte a Tabela 4).

Quando o **Internal Control RNA** for usado como controle de extração para o preparo de amostras e como controle de inibição para amplificação, então 20 µL de **Internal Control RNA** deve ser usado durante a extração. Recomendamos a adição do RNA de Controle Interno ao cartucho de amostra antes de adicionar a amostra, se possível. Recomendamos pipetar 1 µL de **Internal Control RNA** por reação à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação da Mistura Principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10 % à Mistura Principal a fim de compensar qualquer perda da pipetagem (consulte a Tabela 3, Tabela 4). Antes de usar, descongele a **Reaction Mix**, a **Enzyme Mix**, o **Positive Control**, o **No Template Control** e **Internal Control RNA**, misture bem (exceto a mistura de enzimas) e centrifugue por um curto período de tempo. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C - 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo de cálculo e preparação da Mistura Principal para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

| Código do kit | Componentes da Mistura Principal | Quantidade por reação | 10 reações (mais 10%) |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1             | Reaction Mix                     | 19,3 µL               | 212,3 µL              |
| 2             | Enzyme Mix                       | 0,7 µL                | 7,7 µL                |
|               | <b>Total</b>                     | <b>20 µL</b>          | <b>220 µL</b>         |

Misture a Mistura Principal e depois centrifugue por pouco tempo.

**Tabela 4:** Exemplo do cálculo e preparação da mistura principal para dez 10 reações (ICR apenas como controle de inibição)

| Código do kit | Componentes da Mistura Principal | Quantidade por reação | 10 reações (mais 10%) |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1             | Reaction Mix                     | 19,3 µL               | 212,3 µL              |
| 2             | Enzyme Mix                       | 0,7 µL                | 7,7 µL                |
| R             | Internal Control RNA             | 1,0 µL                | 11 µl                 |
|               | <b>Total</b>                     | <b>21,0 µl</b>        | <b>231,0 µl</b>       |

Misture a Mistura Principal e depois centrifugue por pouco tempo.

## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da Mistura Principal em cada tubo de ensaio (placas).

**Controle negativo:** Pipete 5 µL do **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo de amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** a cada mistura PCR do controle negativo.

**Amostras:** Adicione 5 µl de eluato a cada Mistura Principal pré-pipetada.

**Controle positivo:** Adicione 5 µL de **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** à cada mistura de PCR do controle positivo.

Selar as placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (consulte a Tabela 5, Tabela 6).

## 9.3 Configuração do instrumento de PCR

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o ensaio RIDA®GENE Parainfluenza foi verificado no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. A transcrição inversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

**Tabela 5:** Perfil de PCR em tempo real universal para o LightCycler® 480 II

|   |               |
|---|---------------|
| Transcrição reversa                                     | 10 min, 58 °C |
| Desnaturação inicial                                    | 1 min, 95 °C  |
| Ciclos  | 45 ciclos     |
| PCR Desnaturação  | 10 s, 95 °C   |
| Recozimento/extensão                                    | 15 s, 60 °C   |
| Índice da temperatura de transição/<br>índice de subida | Máximo        |

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

## 9.4 Configuração do canal de detecção

**Tabela 6:** Seleção dos canais de detecção adequados

| Instrumento de PCR em tempo real | Deteção           | Canal de deteção | Comentário   |
|----------------------------------|-------------------|------------------|--|
| Roche LightCycler® 480 II        | Parainfluenza 1   | 465/510          | É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004). |
|                                  | ICR               | 533/580          |  |
|                                  | Parainfluenza 3   | 533/610          |  |
|                                  | Parainfluenza 2/4 | 618/660          |  |

## 10. Controle de qualidade – Indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 7).

O **Positive Control** está disponível em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu\text{L}$ . É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

**Tabela 7:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

| Amostra           | Resultado | ICR Ct  | Gene-alvo Ct                     |
|-------------------|-----------|---------|----------------------------------|
| Controle positivo | +         | N/A *1  | Consulte Certificate of Analysis |
| Controle negativo | -         | Ct > 20 | 0                                |

\*1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não estiver na faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Interpretação dos resultados

Neste momento, não existe nenhum método de referência reconhecido internacionalmente ou material de referência para a padronização. Os materiais de controle podem ser rastreados metrologicamente até os padrões internos da R-Biopharm AG com base em amplificadores de RNA específicos.

Para obter mais informações sobre rastreabilidade metrológica, entre em contato com a R-Biopharm AG.

Os valores ajustados, flutuações e outros detalhes podem ser encontrados no certificado de análise (CoA) anexo.

Os dados são avaliados no LightCycler® 480 II usando o método do ponto de ajuste. Sinais maiores do que o limiar são considerados um resultado positivo.

## 11. Interpretação dos resultados

Para determinar o limite de detecção (LoD 95 %) (Seção 13.2.1), o limite foi definido da seguinte forma:

| Detecção         | Limiar elevado<br>(% de fluorescência total) |
|------------------|--|
| Parainfluenza 1  | 2,39 %                                       |
| Parainfluenza 2  | 20,21 %                                      |
| Parainfluenza 3  | 9,09 %                                       |
| Parainfluenza 4A | 6,62 %                                       |

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8:** Interpretação dos resultados\*

| Detecção de     |                 |                   | ICD | Resultado   |
|-----------------|-----------------|-------------------|-----|---|
| Parainfluenza 1 | Parainfluenza 3 | Parainfluenza 2/4 |     |   |
| +               | -               | -                 | +/- | Parainfluenza 1 detectável  |
| -               | +               | -                 | +/- | Parainfluenza 3 detectável  |
| -               | -               | +                 | +/- | Parainfluenza 2/4 detectável                                      |
| +               | +               | -                 | +/- | Parainfluenza 1 e parainfluenza 3 detectáveis                     |
| +               | -               | +                 | +/- | Parainfluenza 1 e parainfluenza 2/4 detectáveis                   |
| -               | +               | +                 | +/- | Parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 detectáveis                   |
| +               | +               | +                 | +/- | Parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4 detectáveis |
| -               | -               | -                 | +   | Gene-alvo não detectável  |
| -               | -               | -                 | -   | Inválido  |

\* + = positivo  
 - = negativo

Uma amostra é considerada positiva se o RNA da amostra e **Internal Control RNA** mostrarem amplificação no sistema de detecção.

Uma amostra também é considerada positiva se o RNA da amostra mostrar amplificação, mas o **Internal Control RNA** não mostra amplificação no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** não é necessária neste caso, já que altas concentrações do fragmento amplificado podem levar a um sinal fraco ou ausente do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é considerada negativa se o RNA da amostra não mostrar amplificação, mas o **Internal Control RNA** mostra amplificação no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** pode descartar a inibição da reação PCR.

Uma amostra é considerada inválida quando o RNA da amostra e o **Internal Control RNA** não mostram amplificação no sistema de detecção. Os inibidores de PCR estão presentes na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração.

## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA®GENE Parainfluenza detecta a parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4 RNA em esfregaços nasais/garganta humana não tratados. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste é validado apenas a esfregaços nasais/garganta.
4. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequados, ou uma carga patogênica abaixo da sensibilidade analítica do teste pode levar a falsos resultados negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
6. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95 %) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
7. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o RIDA®GENE Parainfluenza.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4 (HN gene)) estão presentes.
9. Mesmo em pequenas quantidades, as substâncias de sangue humano e paracodina (dihidrocodeína) podem ter propriedades de interferência. O sangue humano interfere a partir de uma concentração de 2,4 % [v/v]. A paracodina (dihidrocodeína) interfere a partir de uma concentração de 3 % [v/v].
10. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante precisamente ao realizar o teste.

## 13. Características de desempenho

### 13.1 Características de desempenho clínico

#### 13.1.1 Limite de detecção (LoD 95%)

O LoD foi determinado medindo uma amostra de controle positivo (esfregaços nasais/garganta negativos, com espigões) em cinco etapas de diluição (em etapas de 0,25-log) para cada alvo e matriz com 20 réplicas por etapa em um lote. Isto foi seguido por uma análise de probit. Em seguida, o LoD calculado foi confirmado com 20 réplicas por alvo e matriz para a etapa/concentração da diluição calculada.

Para os testes foram utilizadas as seguintes estirpes:

Parainfluenza 1: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 2: ZeptoMetrix (#0810015CF)

Parainfluenza 3: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 4a: ZeptoMetrix (#0810060CF)

Para a detecção de parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 RNA utilizando o ensaio RIDA®GENE Parainfluenza, o MagNA Pure 96 Instrument e o LightCycler® 480 II, foram determinados os seguintes limites de detecção (LoD). Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Limite de resultados de detecção para o teste RIDA®GENE Parainfluenza para os parâmetros Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, e Parainfluenza 2/4

|     | Parainfluenza<br>1            | Parainfluenza<br>2                 | Parainfluenza<br>3               | Parainfluenza<br>4                |
|-----|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| LoD | 0,05 [TCID <sub>50</sub> /mL] | 354,00<br>[TCID <sub>50</sub> /mL] | 3,69<br>[TCID <sub>50</sub> /mL] | 67,61<br>[TCID <sub>50</sub> /mL] |

O LoD para o parâmetro Parainfluenza 1 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 0,05 TCID<sub>50</sub>\*/mL.

O LoD para o parâmetro Parainfluenza 2 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 354,00 TCID<sub>50</sub>\*/mL.

O LoD para o parâmetro Parainfluenza 3 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 3,69 TCID<sub>50</sub>\*/mL.

O LoD para o parâmetro Parainfluenza 4 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 67,61 TCID<sub>50</sub>\*/mL.

#### 13.1.2 Limite de detecção do dispositivo

Para determinar o limite de detecção do dispositivo, 20 réplicas de uma amostra de controle (50 cópias/reação) foram medidas no LightCycler® 480 II. Todas as réplicas foram positivas.

O limite de detecção do dispositivo é, portanto, 50 cópias/reação.

### 13.1.3 Especificidade analítica

#### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir devido ao seu amplo uso para infecções no trato respiratório ou ocorrência generalizada nos espécimes correspondentes. As substâncias que poderiam influenciar significativamente os resultados dos testes foram primeiramente examinadas em uma tela de interferência. Várias substâncias que poderiam estar presentes como resíduos da extração, devido ao uso disseminado em infecções do trato respiratório (várias farmácias ou medicamentos prescritos) ou devido à ocorrência disseminada nas amostras de controle correspondentes (por exemplo, mucinas na superfície das membranas mucosas ou sangue) foram inicialmente examinadas em altas concentrações (três vezes a dose diária ou simulação do "pior caso"). Se uma potencial interferência foi encontrada nesta tela de interferência para uma substância examinada, foi estabelecida uma relação dose-efeito entre a concentração da substância em questão e a interferência.

Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 10.

**Tabela 10:** Substâncias potencialmente interferentes

| Substância potencialmente interferente | Concentração |
|--|--------------|
| Amoxicilina                            | 1 mg/mL      |
| Etanol*                                | 5 % [v/v]    |
| Cloridrato de guanidina*               | 5 % (p/v)    |
| Mucina                                 | 60 µg/mL     |
| Mucosolvan                             | 10 % [v/v]   |
| Nasivin/oximetazolina                  | 10 % [v/v]   |
| Cloreto de sódio                       | 10 % [v/v]   |
| Oseltamivir                            | 25 mg/mL     |
| Paracetamol                            | 10 mg/mL     |

\* com base no volume de eluato

Foram observados efeitos inibidores para as substâncias sangue humano (2,4 %) e paracodina (dihidrocodeína) (3 %) (Consulte Limitações do método).

## Reatividade cruzada

Vários organismos comumente encontrados em esfregaços nasais/garganta (bactérias, parasitas, fungos e vírus) foram examinados. Os microorganismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente em esfregaços nasais/garganta, ou causam sintomas correspondentes como patógenos respiratórios. Para as análises foram usadas culturas bacterianas, fúngicas ou virais; sobrenadantes de culturas bacterianas, fúngicas ou virais; e padrões LGC e NIBSC dos respectivos organismos.

O PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Parainfluenza é específico para parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4. Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 11):

**Tabela 11:** Organismos potencialmente reativos cruzados

| Organismo                                      | Resultado do teste* |                 |                   |
|--|---------------------|-----------------|-------------------|
|  | Parainfluenza 1     | Parainfluenza 3 | Parainfluenza 2/4 |
| Adenovírus 7, humano, estirpe Gomen            | -                   | -               | -                 |
| Adenovírus 1, humano, estirpe de adenóide 71   | -                   | -               | -                 |
| <i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1           | -                   | -               | -                 |
| <i>Candida albicans</i>                        | -                   | -               | -                 |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i>                    | -                   | -               | -                 |
| Enterovírus tipo 71                            | -                   | -               | -                 |
| Vírus Epstein-Barr, vírus B95-8                | -                   | -               | -                 |
| <i>Haemophilus influenzae</i>                  | -                   | -               | -                 |
| Coronavírus humano 229E                        | -                   | -               | -                 |
| Coronavírus humano OC43                        | -                   | -               | -                 |
| Coronavírus humano NL63                        | -                   | -               | -                 |
| Metapneumovírus humano                         | -                   | -               | -                 |
| Influenza A H1N1 Brisbane/59/07                | -                   | -               | -                 |
| Influenza A H3N2 Texas/50/12                   | -                   | -               | -                 |
| Influenza B/Washington/02/2019                 | -                   | -               | -                 |
| Vírus Influenza B/Colorado/6/2017              | -                   | -               | -                 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>               | -                   | -               | -                 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> estirpe VPI3199 | -                   | -               | -                 |
| <i>Legionella pneumophila</i>                  | -                   | -               | -                 |
| MERS-CoV                                       | -                   | -               | -                 |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| <i>Moraxella catarrhalis</i>  | - | - | - |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe (FH de Eaton Agent)                          | - | - | - |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Controle de execução externa recombinante NATtrol) | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | - | - | - |
| Rinovírus 1A estirpe MRC-5  | - | - | - |
| RSV A (estirpe longa)   | - | - | - |
| RSV (estirpe 9320)  | - | - | - |
| SARS  | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | - | - | - |
| <i>Streptococcus salivarius</i>   | - | - | - |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> (NCTC 7465)                                       | - | - | - |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>   | - | - | - |

\* - = negativo

### 13.1.4 Precisão

A precisão do teste PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Parainfluenza foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de cinco amostras de controle usando 20 réplicas, cada uma no LightCycler® 480 II sob condições idênticas.

Precisão *interensaio*: Determinação de 5 amostras de controle em 20 execuções duas vezes em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas por diferentes operadores em condições reprodutíveis.

Precisão *interlote*: Os testes de precisão *intra-* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os dados de precisão foram obtidos utilizando cinco amostras de controle, bem como o PTC e o NTC pertencentes ao ensaio.

Os coeficientes de variação obtidos de cada medida usando o teste de tempo real multiplex RIDA®GENE Parainfluenza no LightCycler® 480 II foram menores que 3,06 %.

**Tabela 12:** Resultados precisos para o teste RIDA®GENE Parainfluenza para parainfluenza 1.

| Ct-<br>Valor<br>médio/CV | <i>Intraensaio</i> |                  |                  | <i>Interensaio</i> |                  |                  | <i>Interlote</i>       |        |
|--------------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|--------|
|                          | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lotes<br>1–3 do<br>kit |        |
| 1                        | Ct                 | -                | -                | -                  | -                | -                | -                      |        |
|                          | CV (%)             | n/a              | n/a              | n/a                | n/a              | n/a              | n/a                    |        |
| 2                        | Ct                 | 30,9             | 30,7             | 30,8               | 30,8             | 30,6             | 30,5                   | 30,6   |
|                          | CV (%)             | 0,68 %           | 0,78 %           | 0,82 %             | 1,06 %           | 1,07 %           | 1,01 %                 | 1,11 % |
| 3                        | Ct                 | 31,1             | 30,7             | 30,9               | 30,6             | 30,5             | 30,5                   | 30,6   |
|                          | CV (%)             | 0,91 %           | 1,06 %           | 1,13 %             | 1,19 %           | 0,91 %           | 0,90 %                 | 0,99 % |
| 4                        | Ct                 | 27,3             | 27,0             | 27,1               | 26,9             | 26,9             | 27,0                   | 26,9   |
|                          | CV (%)             | 0,57 %           | 1,09 %           | 0,70 %             | 1,28 %           | 1,39 %           | 1,30 %                 | 1,32 % |
| 5                        | Ct                 | 23,4             | 23,7             | 23,8               | 23,7             | 23,6             | 23,7                   | 23,6   |
|                          | CV (%)             | 0,87 %           | 1,19 %           | 0,65 %             | 1,39 %           | 1,51 %           | 1,25 %                 | 1,39 % |

**Tabela 13:** Resultados precisos para o teste RIDA®GENE Parainfluenza para parainfluenza 3.

| Ct-<br>Valor<br>médio/CV | <i>Intraensaio</i> |                  |                  | <i>Interensaio</i> |                  |                  | <i>Interlote</i>       |
|--------------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|
|                          | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lotes<br>1–3 do<br>kit |
| 1                        | Ct                 | -                | -                | -                  | -                | -                | -                      |
|                          | CV (%)             | n/a              | n/a              | n/a                | n/a              | n/a              | n/a                    |
| 2                        | Ct                 | 31,3             | 31,1             | 30,8               | 30,8             | 30,8             | 30,5                   |
|                          | CV (%)             | 0,74 %           | 1,03 %           | 1,30 %             | 1,55 %           | 1,37 %           | 1,16 %                 |
| 3                        | Ct                 | 32,2             | 31,9             | 31,7               | 31,3             | 31,6             | 31,5                   |
|                          | CV (%)             | 0,92 %           | 1,33 %           | 1,03 %             | 2,04 %           | 1,39 %           | 1,44 %                 |
| 4                        | Ct                 | 26,0             | 25,7             | 25,5               | 25,0             | 25,4             | 25,2                   |
|                          | CV (%)             | 1,06 %           | 1,57 %           | 1,17 %             | 2,78 %           | 2,61 %           | 1,85 %                 |
| 5                        | Ct                 | 22,5             | 22,7             | 21,9               | 21,8             | 22,0             | 21,9                   |
|                          | CV (%)             | 1,12 %           | 1,48 %           | 1,39 %             | 2,63 %           | 2,32 %           | 1,98 %                 |

**Tabela 14:** Resultados precisos para o teste RIDA®GENE Parainfluenza para parainfluenza 2/4.

| Ct-<br>Valor<br>médio /<br>VC | <i>Intraensaio</i> |                  |                  | <i>Interensaio</i> |                  |                  | <i>Interlote</i>       |
|-------------------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|
|                               | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lote 1<br>do kit   | Lote 2<br>do kit | Lote 3<br>do kit | Lotes<br>1-3 do<br>kit |
| 1                             | Ct                 | -                | -                | -                  | -                | -                | -                      |
|                               | CV (%)             | n/a              | n/a              | n/a                | n/a              | n/a              | n/a                    |
| 2                             | Ct                 | 31,6             | 32,0             | 31,6               | 32,1             | 31,5             | 31,6                   |
|                               | CV (%)             | 1,29 %           | 1,44 %           | 2,46 %             | 1,55 %           | 2,02 %           | 1,90 %                 |
| 3                             | Ct                 | 31,9             | 32,2             | 32,2               | 31,8             | 31,9             | 31,8                   |
|                               | CV (%)             | 1,88 %           | 3,06 %           | 2,60 %             | 2,11 %           | 2,12 %           | 2,30 %                 |
| 4                             | Ct                 | 27,0             | 26,9             | 26,8               | 26,5             | 26,6             | 26,9                   |
|                               | CV (%)             | 1,48 %           | 2,66 %           | 2,42 %             | 2,46 %           | 2,92 %           | 2,13 %                 |
| 5                             | Ct                 | 22,7             | 23,6             | 23,3               | 23,2             | 23,1             | 23,1                   |
|                               | CV (%)             | 1,30 %           | 2,05 %           | 2,03 %             | 1,90 %           | 2,86 %           | 2,28 %                 |

### 13.1.5 Reatividade analítica

A reatividade do teste PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Parainfluenza foi investigada usando várias estirpes de parainfluenza (Tabela 15).

**Tabela 15:** Testes de reatividade analítica

| Estirpe                      | Concentração                              | Resultado*      |                 |                   |
|------------------------------|---|-----------------|-----------------|-------------------|
|                              |   | Parainfluenza 1 | Parainfluenza 3 | Parainfluenza 2/4 |
| Parainfluenza 1 C35          | 0,417 ng                                  | +               | -               | -                 |
| Parainfluenza 2 Greer        | 0,01005 ng                                | -               | -               | +                 |
| Parainfluenza 3 C243         | 0,0201 ng                                 | -               | +               | -                 |
| Parainfluenza 4a M-25        | $10^{3,25}$<br>TCID <sub>50</sub> /0.2 mL | -               | -               | +                 |
| Parainfluenza 4b CH<br>19503 | 1,524 ng                                  | -               | -               | +                 |

\* + = positivo  
- = negativo

## 14. Histórico de versões

| Número da versão | Seção e designação                        |
|------------------|---|
| 2021-10-27       | Versão anterior                           |
| 2022-01-20       | Revisão geral:<br>4. Reagentes fornecidos |

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
|  | Para diagnóstico <i>in vitro</i>  |
|  | Cumpra com o manual de instruções |
|  | Número do lote                    |
|  | Data de validade                  |
|  | Temperatura de armazenamento      |
|  | Número do item                    |
|  | Número de testes                  |
|  | Data de fabricação                |
|  | Fabricante                        |

### Símbolos específicos do teste

|   |                               |
|---|-------------------------------|
|   | Reaction Mix                  |
|  | Enzyme Mix                    |
|  | Controle de extração/inibição |
|  | Controle negativo             |
|  | Controle positivo             |

## 16. Referências

1. Russell E, Ison MG. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. Clin Infect Dis. 2017;65(9):1570-6.
2. DeGroot NP, Haynes AK, Taylor C, Killerby ME, Dahl RM, Mustaquim D, et al. Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011-2019. J Clin Virol. 2020;124:104261.
3. Pawełczyk M, Kowalski ML. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17(3):16.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Human Parainfluenza Viruses (HPIVs) - Transmission 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/parainfluenza/about/transmission.html>.] 15.10.2021