

## RIDA® GENE RSV & hMPV

**REF** PG5905



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 RSV & hMPV, realizado no Roche LightCycler® 480 II, é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação do vírus sincicial respiratório (A/B) e do metapneumovírus humano (A/B) RNA em esfregaços nasais/garganta humana não tratados e BAL de pessoas com sinais e sintomas de infecção do trato respiratório aguda.

O teste RIDA®GENE RSV & hMPV se destina a apoiar o diagnóstico de infecções virais (RSV & hMPV) em pacientes com sintomas de infecção respiratória em conexão com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não excluem a infecção por RSV ou hMPV e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

O vírus sincicial respiratório humano (RSV) é considerado um dos patógenos mais potentes para infecções agudas do trato respiratório inferior, como inflamação pulmonar e bronquiolite<sup>(1,2,3)</sup>. Uma alta incidência de infecções por RSV tem sido encontrada especialmente em crianças com menos de 6 meses<sup>(4,5)</sup>. O RSV está associado a elevada morbidade e mortalidade não apenas em crianças, mas também em idosos, pacientes com doenças prévias e adultos com sistema imunológico comprometido<sup>(2,6)</sup>. RSV é um vírus RNA não segmentado, envelopado, que pertence à família Pneumoviridae<sup>(2,3)</sup>. O genoma viral, uma molécula de RNA de cadeia simples (ssRNA), códigos para 11 proteínas<sup>(6)</sup>. Dada a antigenicidade da sua proteína G, a estirpe é dividida em dois grupos antigênicos: RSV A e B. Atualmente, são conhecidos 14 genótipos de RSV A e 25 genótipos de RSV B<sup>(2,6)</sup>. Vários estudos têm chegado unanimemente à conclusão de que o RSV é o vírus respiratório mais comumente detectado<sup>(2,6,7)</sup>. Em particular, os surtos de RSV ocorrem durante o inverno, de novembro a março. O pico de infecções é principalmente em janeiro<sup>(1,3,8)</sup>. O RSV geralmente se manifesta junto com outros vírus respiratórios<sup>(2,3)</sup>.

O metapneumovírus humano (hMPV) foi isolado pela primeira vez em 2001 a partir de amostras do trato respiratório de crianças menores de 5 anos de idade<sup>(9)</sup>. O metapneumovírus humano é uma partícula envolvida do tipo vírus que pertence à família Pneumoviridae, como o RSV. O genoma viral é um RNA de cadeia simples (ssRNA) que consiste em 8 genes. A estirpe hMPV foi dividida em dois genótipos diferentes, A e B. Cada grupo também é dividido em dois subgenótipos 1 e 2 (A1, A2, B1, B2) que são baseados nas diferenças genéticas das proteínas de superfície F e G. Ambos os genótipos podem coexistir e circular simultaneamente durante o mesmo período, enquanto o grupo A é geralmente o genótipo dominante. Entretanto, a distribuição depende da sazonalidade e da região<sup>(3,5,9,10)</sup>. Infecções com hMPV podem ocorrer durante todo o ano, mas a infecção geralmente atinge o pico no final

da estação do inverno. A clara sazonalidade é evidente, especialmente com altas taxas de infecção em janeiro<sup>(9,11)</sup>. As coinfeções com outros patógenos do trato respiratório, como o vírus sincicial respiratório (RSV), foram descritas várias vezes<sup>(9)</sup>.

De acordo com estudos, RSV e hMPV, além da influenza, são os patógenos virais predominantes durante a estação do inverno e, portanto, mostram uma sazonalidade consistente<sup>(12)</sup>. Os sintomas mais comuns de infecções respiratórias agudas são febre, tosse, dor de garganta, dores de cabeça, taquipneia, estertores, estridor, chiado na respiração ou sintomas do trato respiratório superior (rinorreia e espirros) e fadiga<sup>(9,11)</sup>.

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE RSV & hMPV é um teste RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação do vírus sincicial respiratório (A/B) e do metapneumovírus humano (A/B) RNA em esfregaços nasais/garganta humana não tratados e BAL.

Após o isolamento do DNA, os fragmentos de genes específicos de RSV (gene F) e hMPV (glicoproteína F) (se presente) 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 RSV & hMPV contém **Internal Control RNA** (ICR) 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
PGZ5905RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	amarelo, pronto para uso
PGZ5905EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	vermelho, pronto para uso
PGZ5905IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	laranja, pronto para uso
PGZ5905NC	N	No Template Control	1 ×	450 µl	branco, pronto para uso
PGZ5905PC	P	Positive Control	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

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-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<sup>®</sup>GENE RSV & hMPV:

Reagentes
Água PCR (livre de nuclease)

### 6.2 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA<sup>®</sup>GENE RSV & hMPV:

Equipamentos
Plataforma de extração: Instrumento MagNA Pure 96 (Roche)
Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler <sup>®</sup> 480 II (Roche)
RIDA <sup>®</sup> 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 e BAL

Para a preparação de RNA a partir de esfregaços nasais e de garganta e BAL, recomenda-se o kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV no Instrumento 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 RSV & hMPV 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 RSV & hMPV 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

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR Desnaturação</u>	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ 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	Detecção	Canal de detecção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	RSV	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	hMPV	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/ $\mu$ 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	Positivo	N/A *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	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.

Para determinar o limite de detecção (LoD 95%) (Seção 13.1.1), o limite foi definido da seguinte forma:

Detecção	Matriz	Limiar elevado (% de fluorescência total)
RSV A	LBA	4,9 %
	Esfregaço nasal/garganta	6,5 %
RSV B	LBA	3,5 %
	Esfregaço nasal/garganta	6,0 %
hMPV A1	LBA	7,9 %
	Esfregaço nasal/garganta	7,0 %
hMPV A2	LBA	9,9 %
	Esfregaço nasal/garganta	10,9 %

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

**Tabela 8:** Interpretação dos resultados

Detecção de			
RSV	hMPV	ICR	Resultado
<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/ negativo</b>	<b>RSV detectável</b>
negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/ negativo</b>	<b>hMPV detectável</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/ negativo</b>	<b>RSV e hMPV detectáveis</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>Gene-alvo não detectável</b>
negativo	negativo	<b>negativo</b>	<b>Inválido</b>

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 RSV & hMPV detecta o vírus sincicial respiratório (A/B) e o metapneumovírus humano (A/B) RNA a partir de esfregaços nasais/garganta humana não tratados e BAL. 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 e BAL.
4. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-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 RSV & hMPV.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (RSV (gene F) e hMPV (glicoproteína F)) estão presentes.
9. Mesmo em pequenas quantidades, as substâncias dihidrocodeína e azitromicina podem ter propriedades de interferência. A paracodina interfere a partir de uma concentração de 3,0 % [v/v]; a azitromicina interfere a partir de uma concentração de 25,2 mg/ml.
10. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante com precisão ao realizar o teste.

## 13. Características de desempenho

### 13.1 Características de desempenho clínico

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

Uma amostra de controle positivo (BAL negativo ou esfregaço nasal/garganta, fortificado) foi medida em cinco passos de diluição (em passos de 0,25-log) para cada alvo e matriz com 20 réplicas por passo num lote para determinar o LoD. 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:

RSV A 2006 isolado, ZeptoMetrix, #0810040ACF

RSV B estirpe: CH93(18)-18, ZeptoMetrix, #0810040CF

hMPV-16 tipo A1, estirpe: IA10-2003, ZeptoMetrix, #0810161CF

hMPV-8 tipo B2, estirpe: Peru6-2003, ZeptoMetrix, #0810159CF

Para a detecção de RSV e hMPV RNA com o auxílio do ensaio RIDA®GENE RSV & hMPV, do instrumento MagNA Pure 96 e do LightCycler® 480 II, foram determinados os limites de detecção (LoD) mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Limites dos resultados de detecção do teste RIDA®GENE RSV & hMPV para os parâmetros RSV e hMPV.

	RSV A	RSV B	hMPV A1	hMPV B2
LoD BAL	190,11 TCID <sub>50</sub> */ml	4,15 TCID <sub>50</sub> */ml	1,01 TCID <sub>50</sub> */ml	0,63 TCID <sub>50</sub> */ml
Esfregaço nasal/garganta LoD	193,20 TCID <sub>50</sub> */ml	6,89 TCID <sub>50</sub> */ml	5,70 TCID <sub>50</sub> */ml	5,22 TCID <sub>50</sub> */ml

\*TCID: Dose infecciosa de cultura de tecidos

O LoD para o parâmetro RSV A em BAL foi determinado em 190,11 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro RSV A no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 193,20 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro RSV B em BAL foi determinado em 4,15 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro RSV B no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 6,89 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro hMPV A1 em BAL foi determinado em 1,01 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro hMPV A1 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 5,70 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro hMPV B2 em BAL foi determinado em 0,63 TCID<sub>50</sub>\*/ml.

O LoD para o parâmetro hMPV A1 no esfregaço nasal/garganta foi determinado em 5,22 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
Mucosolvan (cloridrato de ambroxol)*	10 % [v/v]
Amoxicilina	1 mg/ml
Sangue humano	2 % [v/v]
Mucina	60 µg/ml
Nasivin 0,05 % (oximetazolina)**	10 % [v/v]
Cloreto de sódio	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (dipropionato de beclometasona)**	10 % [v/v]
Tobramina	4 µg/ml

\*Substância testada apenas para a matriz BAL

\*\*Substâncias testadas apenas para o esfregaço nasal/garganta da matriz

Foram observados efeitos inibitórios para as substâncias paracodina (3 %) e azitromicina-ratiopharm (25,2 mg/ml) (ver as limitações do método).

### Reatividade cruzada

Foram investigados vários organismos (bactérias, vírus, fungos) que são comumente encontrados na matriz BAL ou em esfregaços nasais/gargantas. Os microorganismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente em ambas as matrizes, ou causam sintomas correspondentes como patógenos respiratórios. Para as análises foram usadas bactérias (entre  $10^6$  e  $10^9$  UFC\*/ml), culturas fúngicas ou virais; sobrenadantes de culturas de células infecciosas de vírus, bactérias ou fungos; isolados; ou padrões LGC ou NIBSC do organismo em particular.

O RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE RSV & hMPV é específico para RSV e hMPV. Não foram detectadas atividades cruzadas com as seguintes espécies (Tabela 11):



**Tabela 11:** Organismos potencialmente reativos cruzados

Organismo	Resultado do teste	
	RSV	hMPV
<i>Acinetobacter baumannii</i> estirpe 5377	negativo	negativo
Adenovírus 1, humano, estirpe de adenóide 71	negativo	negativo
Adenovírus 4	negativo	negativo
Adenovírus 7, humano, estirpe Gomen	negativo	negativo
Adenovírus 31	negativo	negativo
Adenovírus 34	negativo	negativo
Adenovírus 37	negativo	negativo
<i>Aspergillus terreus</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> estirpe 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydia psittaci</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	negativo	negativo
Echovírus 11	negativo	negativo
Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O6)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
Enterovírus tipo 71, estirpe 2003 isolada	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	negativo	negativo
Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	negativo	negativo
Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	negativo	negativo
Coronavírus humano 229E	negativo	negativo
Coronavírus humano OC43	negativo	negativo
Coxsackievírus humano A2, estirpe Fleetwood	negativo	negativo
Coxsackievírus humano B4	negativo	negativo
Citomegalovírus humano	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 1, estirpe C35	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 2, estirpe Greer	negativo	negativo
Vírus parainfluenza sorotipo 3	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 4a, estirpe M-25	negativo	negativo

Genogrupo A de rinovírus humano	negativo	negativo
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	negativo	negativo
Influenza A H3N2 Texas/50/12	negativo	negativo
Influenza B/Washington/02/2019	negativo	negativo
Influenza B/Colorado/6/2017	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe MGH 78578	negativo	negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> subesp. <i>Pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe FH de Eaton Agent	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> estirpe FAM18	negativo	negativo
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
<i>Serratia marcescens</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , estirpe NCTC 7465	negativo	negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus salivarius</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo

\*CFU: Unidades formadoras de colônias

### 13.1.4 Precisão

A precisão do teste RT-PCR em tempo real RIDA®GENE RSV & hMPV 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 em duplicado em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas por dois técnicos diferentes 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.

O coeficiente de variação máximo obtido das medições com o teste RT-PCR em tempo real RIDA®GENE RSV & hMPV no LightCycler® 480 II foi de 1,93%.

**Tabela 12:** Resultados da precisão do teste do RIDA®GENE RSV & hMPV para RSV.

Valor médio Ct/CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1–3 do kit	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
2	Ct	34,3	34,6	34,6	33,6	33,6	33,7	
	CV (%)	1,72 %	1,31 %	1,27 %	1,47 %	1,63 %	1,88 %	1,66 %
3	Ct	32,1	32,6	32,6	31,2	31,1	31,6	31,3
	CV (%)	0,94 %	1,06 %	0,93 %	1,72 %	1,62 %	1,86 %	1,85 %
4	Ct	25,9	25,9	26,1	24,6	24,5	25,0	24,7
	CV (%)	0,87 %	0,67 %	0,68 %	1,35 %	1,50 %	1,84 %	1,93 %
5	Ct	22,4	22,7	22,8	21,3	21,3	21,7	21,4
	CV (%)	0,84 %	0,73 %	0,66 %	1,25 %	1,84 %	1,62 %	1,85 %

**Tabela 13:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE RSV & hMPV para hMPV.

Valor médio Ct/CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1–3 do kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	33,6	33,5	33,7	32,9	33,0	32,8
	CV (%)	0,80 %	1,17 %	0,83 %	1,44 %	1,43 %	1,64 %
3	Ct	31,6	31,8	31,7	30,6	30,6	30,8
	CV (%)	0,80 %	0,50 %	0,80 %	1,40 %	1,11 %	1,27 %
4	Ct	25,1	25,4	25,4	24,1	24,1	24,4
	CV (%)	0,97 %	0,72 %	0,69 %	1,92 %	1,80 %	1,80 %
5	Ct	21,8	21,9	21,8	20,9	20,8	20,9
	CV (%)	0,83 %	0,94 %	0,79 %	1,27 %	1,65 %	1,63 %

### 13.1.5 Reatividade analítica

A reatividade do teste RT-PCR em tempo real RIDA®GENE RSV & hMPV foi investigada usando estirpes RSV e subtipos hMPV (Tabela 14). As estirpes RSV testadas e os subtipos hMPV foram detectados usando o teste RT-PCR em tempo real RIDA®GENE RSV & hMPV.

**Tabela 14:** Testes de reatividade analítica

Estirpe	Concentração	Resultado*	
		RSV	hMPV
hMPV 5 tipo B1	10 <sup>-1.70</sup> U/ml	-	+
hMPV 8 tipo B2	10 <sup>2.10</sup> U/ml	-	+
hMPV 16 tipo A1	10 <sup>0.82</sup> U/ml	-	+
hMPV 20 tipo A2	10 <sup>0.34</sup> U/ml	-	+
RSV A (isolado: 2006 isolado)	10 <sup>2.53</sup> U/ml	+	-
RSV A estirpe longa	3,74 x 10 <sup>1</sup> PFU**/ml	+	-
RSV B (estirpe:CH93(18)-18)	10 <sup>0.82</sup> U/ml	+	-
RSV B estirpe 9320	8,9 x 10 <sup>0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	+	-

\*+ = positivo (pelo menos 2 de 3 réplicas positivas)

- = negativo










\*\*Unidades formadoras de flocos

## 14. Histórico de versões

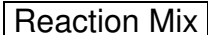




Número da versão	Seção e designação
16/11/2015	Versão da edição
24/08/2021	Revisão geral: 1. Uso previsto 2. Sumário e explicação do teste 3. Princípio do teste 4. Reagentes fornecidos 5. Instruções de armazenamento 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários 8. Coleta e armazenamento de amostras 9. Realização do teste 10. Controle de qualidade 11. Interpretação dos resultados 12. Limitações do método 13. Características de desempenho

## 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. Harun A, Beyza E. Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital: Japanese Journal of Infectious Diseases. 2019; 72(5): 318–322.
2. Luo H-J, Huang X-B, Zhong H-L, Ye C-X, Tan X, Zhou K, Yuan L, Zhang S-F, Zhu X, Lin C-J, Wang W-J, Xu L, Cao K-Y. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011-2016 in southern China. International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases. 2020; 90: 5–17.
3. Park E, Park PH, Huh JW, Yun HJ, Lee HK, Yoon M., Lee S, Ko G. Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014. Epidemiology and Infection, 2017; 145(15): 3226–3242.
4. Fillatre A, François C, Segard C, Duverlie G, Hecquet D, Pannier C, Roussel C, Zawadzki P, Brochot E, Castelain S. Epidemiology and seasonality of acute

- respiratory infections in hospitalized children over four consecutive years (2012-2016). *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018; 102: 27–31.
5. Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16: 301.
  6. Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *BioMed Research International*. 2017; 3459785.
  7. Nguyen VH, Dubot-Pérès A, Russell FM, Dance DAB, Vilivong K, Phommachan S, Syladeth C, Lai J, Lim R, Morpeth M, Mayxay M, Newton PN, Richet H, De Lamballerie X. Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR - the importance of Respiratory Syncytial Virus. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 9318.
  8. Soudani N, Caniza MA, Assaf-Casals A, Shaker R, Lteif M, Su Y, Tang L, Akel I, Muwakkat S, Chmairie A, Homsy M, Dbaibo G, Zaraket H. Prevalence and characteristics of acute respiratory virus infections in pediatric cancer patients. *Journal of Medical Virology*. 2019; 91(7): 1191–1201.
  9. Rodriguez PE, Frutos MC, Adamo MP, Cuffini C, Cámara JA, Paglini MG, Moreno L, Cámara A. Human Metapneumovirus: Epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PloS One*. 2020; 15(12): e0244093.
  10. Evelyn O, Jaime FS, David M, Lorena A, Jenifer A, Oscar G. Prevalence, clinical outcomes and rainfall association of acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in Bogotá, Colombia. *BMC Pediatrics*. 2019; 19(1): 345.
  11. Halaji M, Hashempour T, Moayedi J, Pouladfar GR, Khansarinejad B, Khashei R, Moattari A, Musavi Z, Ghassabi F, Pirbonyeh N. Viral etiology of acute respiratory infections in children in Southern Iran. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019; 52: e20180249.
  12. Al-Romaihi HE, Smatti MK, Ganesan N, Nadeem S, Farag E, Coyle PV, Nader, JD, Al-Khatib HA, Elmagboul EB, Al Dhahry S, Al-Marri SA, Al Thani AA, Al Khal A, Al Maslamani MA, Yassine HM. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PloS One*. 2019; 14(6): e0218097.