

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Febre Amarela
IU-IVD-001
Revisão: 15 - 12/12/2023



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Febre Amarela

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ –
IBMP - CNPJ: 03.585.986/0001-05 / RUA PROFESSOR
ALGACYR MUNHOZ MADER, 3775 CEP 81350-010 -
CURITIBA – PARANÁ – BRASIL

Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às
16:30 (exceto feriados)

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

Kit IBMP Biomol Febre Amarela é composto pelo módulo de
amplificação de RNA viral suficiente para 26 determinações,
sendo 24 amostras clínicas e 2 controles de reação.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa
(presença/ausência) do material genético do vírus da Febre
Amarela extraído de amostras de soro ou plasma humano,
obtidas de pacientes com suspeita de Febre Amarela. O
resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os
dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o
diagnóstico de Febre Amarela.

USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde
com conhecimento em biologia molecular, especificamente
em testes de diagnósticos baseados em qPCR.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -
15°C. A temperatura indicada para a manipulação do produto
é entre 15°C e 30°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela utiliza a técnica de reação
em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição
reversa (RT-qPCR). A RT-qPCR permite a detecção de
sequências específicas em uma amostra de RNA extraído a
partir de medidas de intensidade de fluorescência durante o
andamento da reação. Nessa técnica ocorre, inicialmente,
uma transcrição reversa (gerando a fita de cDNA a partir do
RNA da amostra) seguida pela reação em cadeia da

polimerase em tempo real (qPCR), onde a fluorescência é
captada para cada alvo.

O kit permite a identificação do vírus da Febre Amarela, além
do Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença
de RNA viral do patógeno e do Controle Interno é feita pelo
uso de sondas (oligonucleotídeos marcados com
fluorescência) específicas para cada alvo molecular. O teste
é realizado em uma reação *multiplex*, onde existem
reagentes específicos para o alvo do patógeno e para o
Controle Interno.

A amplificação do Controle Interno indica o funcionamento
adequado da reação (reagentes e operador) e a qualidade
do RNA extraído. Em resultados negativos, apenas o
Controle Interno é detectado, indicando o funcionamento da
reação de amplificação. Já a amplificação de material
genético de patógeno juntamente com a amplificação do
Controle Interno indica presença de RNA viral na amostra.

O kit possui um Controle Positivo que avalia a reação para os
dois alvos (Febre Amarela e CI) e comporta-se como um
referencial de qualidade dos reagentes e do processo como
um todo, avaliando desde a extração até a análise dos
resultados.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de
perfil qualitativo, ou seja, permite a avaliação da presença ou
ausência de cada alvo molecular.

O produto é validado para uso nos seguintes
termocicladores: 7500 Real-Time PCR System (Thermo
Fisher).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

RNA proveniente da extração do material genético de
amostras de soro ou plasma humano de pacientes com
suspeita de Febre Amarela.

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

Cuidados com as amostras de plasma e/ou soro:

Após a coleta, as amostras devem ser transportadas e
permanecer armazenadas entre 2 e 8°C por até 6 horas.
Após esse período, as amostras devem ser armazenadas
entre -80°C e -40°C.

- Amostras de soro/plasma não devem ser descongeladas
mais de uma vez. Ciclos repetidos de
congelamento/descongelamento podem desnaturar e
precipitar as proteínas, causando redução dos títulos virais e,
subsequentemente, do RNA extraído;

- Caso seja verificada a formação de crioprecipitados,
centrifugar a amostra a 6.800g durante 3 minutos e separar o
sobrenadante;
- Não vortexar as amostras antes da extração, somente
uma breve centrifugação (*spin*), para retirar gotículas de
tampas.

b. Cuidados no manuseio das amostras de RNA extraído:

Deve-se realizar a extração de RNA das amostras primárias
utilizando metodologia adequada para a matriz preconizada
para o teste, e que permita obter RNA cuja qualidade e
integridade resulte no atendimento aos critérios de análise
estabelecidos nesta Instrução de Uso.

c. Cuidados no manuseio das amostras de RNA extraído

- O RNA extraído deve ser armazenado entre -80°C e -
60°C e manipulado em gelo;
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o
manuseio do RNA para prevenir contaminação por
nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear
bactérias e fungos que são as fontes mais comuns desse tipo
de contaminante;
- Manter os tubos contendo RNA fechados durante os
procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a
adição à mistura de reação, para evitar que haja
contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela (26 determinações) é
composto por:

- 01 microtubo contendo 330 µL de Mistura de PCR 2X;
- 01 microtubo contendo 20 µL de Enzima RT
(*Transcriptase reversa*);
- 01 microtubo contendo 110 µL de Iniciadores (alvos:
febre amarela geral e CI);
- 01 microtubo contendo 60 µL de Sondas (alvos: febre
amarela geral e CI);
- 01 microtubo contendo 60 µL de Controle Negativo;
- 01 microtubo contendo 150 µL de Controle Positivo.

a. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Equipamentos de Proteção Individual (jaleco, máscara
descartável, touca, óculos de segurança, luvas sem pó
descartáveis, protetores de barba);
- Kit de extração de RNA;



- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços) e adesivo ópticos;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL);
- Ponteiras esterilizadas RNase e DNase Free com filtro (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL);
- Suporte/Estante para tubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Centrífuga para microplacas;
- Centrífuga para microtubos;
- Cabine de segurança biológica;
- Agitador tipo vórtex;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Recipientes para descarte de resíduos.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Esse é um produto de uso múltiplo. O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até 6 ciclos de descongelamentos. Após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas. Não é recomendado o congelamento/descongelamento da mistura de reação após o preparo.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

O Controle Positivo fornecido no kit deve ser extraído utilizando a mesma metodologia de extração das amostras a serem analisadas.

No momento do uso, os reagentes e amostras de RNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem talco descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
- A utilização das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;

- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras de RNA no interior de cabines tipo PCR *workstation*.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da mistura de reação

Importante: Descongelar os reagentes e realizar um *spin* ou centrifugação rápida. Manter os reagentes em gelo durante todo o processo de preparo da reação.

Importante: O Controle Positivo deve ser extraído utilizando a mesma metodologia de extração das amostras a serem testadas.

- Identificar o número de reações a serem realizadas, considerando a necessidade de inclusão de, pelo menos, um controle positivo e um controle negativo em cada corrida;
 - Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
 - Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 01, os volumes necessários para a realização da corrida;
- OBS:** Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 01: Volumes de cada reagente a serem pipetados para preparo da mistura de reação.

| Componentes da mistura | Volume para 1 reação |
|------------------------|----------------------|
| Mistura de PCR | 10,0 |
| Iniciadores FA Geral | 3,1 |
| Sondas FA Geral | 1,5 |
| Enzima RT | 0,4 |
| TOTAL | 15,0 |

- Na área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo identificado os componentes e volumes listados na Tabela 01, ajustado ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir **15,0 µL** da mistura de reação em cada poço da placa de PCR, seguindo o mapa da placa de reação;

- Selar a placa com adesivo não-ótico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

a. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar **5,0 µL** de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar **5,0 µL** de RNA extraído de Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar **5,0 µL** de Controle Negativo (CN) no poço correspondente na placa de reação;
- Selar a placa com adesivo ótico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

b. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar no software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle negativo e do controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 02;

Tabela 02: Configurações dos alvos da corrida.

| Target Name | Reporter | Quencher |
|---------------|----------|----------|
| FEBRE AMARELA | FAM | None |
| CI | VIC | None |

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE;
- Configurar os parâmetros de ciclagem de reação conforme Tabela 03;
- Alterar o número de ciclos para **45** em **Number of Cycles**. No gráfico, alterar as temperaturas e tempos de duração para os seguintes valores presentes na Tabela 03:

Tabela 03: Parâmetros de ciclagem da reação de PCR para serem inseridos na programação da corrida.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tempo | Número de ciclos |
|-----------|------------------|-------------|------------------|
| Estágio 1 | 50 | 15 minutos | 1 |
| Estágio 2 | 95 | 10 minutos | 1 |
| Estágio 3 | 95 | 15 segundos | 45 |
| | 60* | 45 segundos | |

*Estágio de captura de fluorescência.



- Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

a. Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise dos resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 04 para o equipamento 7500 (Thermo Fisher). Para o uso nos demais equipamentos não validados, entrar em contato com o Suporte e Assessoria Científica do IBMP.

Tabela 04: Configuração dos parâmetros de análise para os alvos Febre Amarela e CI.

| Equipamento | Target | Threshold | Baseline |
|---|---------------------|-----------|----------|
| 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher) | Febre Amarela Geral | 100.000 | 6-15 |
| | CI | 10.000 | 6-15 |

b. Interpretação dos resultados

- Para que a corrida seja considerada válida, o controle positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os dois alvos com Ct < 30;
 - Para que a corrida seja considerada válida, o controle negativo (CN) não deve apresentar amplificação para o alvo febre amarela (FAM), para o alvo CI, no poço do CN é aceitável amplificações com Ct > 35;
 - Para que a amostra seja considerada negativa, ela não deve apresentar amplificação do alvo Febre Amarela e deve apresentar amplificação para o controle interno com Ct < 30;
 - Para que a amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo Febre Amarela (Ct < 45), mesmo se não houver amplificação do controle interno;
 - Caso a amostra tenha resultado inválido (controle interno com Ct ≥ 30), repetir a extração e PCR da amostra.
- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 05.

Tabela 05: Critérios de classificação para amostras avaliadas.

| Resultado | Ct de Febre Amarela | Ct de Controle Interno |
|-----------|--------------------------|------------------------|
| Positivo | < 45 | Qualquer valor |
| Negativo | Ausência de amplificação | < 30 |
| Inválido | Ausência de amplificação | ≥ 30 |

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (consulte a seção Tipos de amostras e matrizes aplicáveis nestas Instruções de Uso);
- As amostras de soro e plasma podem ser usadas no Kit IBMP Biomol Febre Amarela. Para o uso de outras matrizes biológicas entrar em contato com o Suporte e Assessoria Científica do IBMP.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A sensibilidade clínica do Kit IBMP Biomol Febre Amarela é de 92,6%, e o limite de detecção é 0,932 cópias de RNA viral por reação, o que equivale a 80 cópias de vírus/mL de amostra de paciente. A especificidade analítica é de 95%. Não foram observadas reações cruzadas quando o kit foi avaliado frente a amostras de outros vírus relacionados, tais como Dengue (sorotipos 1, 2 e 3), Zika e Chikungunya.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, luvas descartáveis sem pó, óculos de segurança e máscara cirúrgica (recomendável) durante o uso deste produto;
- As reações de amplificação possuem um Controle Interno cujo alvo é um gene humano, sendo assim, é necessário manipular o produto com as precauções devidas para evitar contaminações das reações com material genético dos operadores. Medidas como realizar a limpeza adequada do ambiente, bancadas e dos equipamentos reduzem o risco de contaminação do produto com material genético proveniente de outras fontes que não sejam a amostra em teste;
- O Controle Positivo (CP) deve ser tratado como uma amostra positiva. Embora não apresente risco de contaminação para humanos, este produto deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras manipuladas em paralelo, evitando assim, resultados falsos-positivos;
- Para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações, recomenda-se realizar os processos de extração de RNA viral, preparo de reações e PCR em áreas distintas;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em cabines de segurança biológica e/ou estações de trabalho;

- Ao término da reação, evitar abrir as placas de PCR para reduzir risco de contaminação do ambiente com produtos de PCR;
- Recomenda-se realizar o monitoramento periódico das instalações laboratoriais para garantir que não haja contaminação ambiental por ácidos nucleicos ou produtos de PCR que possam levar a resultados falsos-positivos.

18. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinados ao tratamento adequado de acordo com a legislação vigente local.

19. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- Este produto deve ser manipulado por profissionais de acordo com esta instrução de uso. Caso contrário, o fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos;
- Não utilizar reagentes vencidos. O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados quando os insumos não forem armazenados e utilizados nas condições determinadas;
- Para um melhor desempenho do teste, utilizar equipamentos de medição calibrados/qualificados, conforme instruções de seus fabricantes.