

1. NOME COMERCIAL

KIT FEBRE AMARELA IBMP.

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP

CNPJ: 03.585.986/0001-05

RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775

CEP 81350-010 - CURITIBA - PARANÁ - BRASIL

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

SAC: +55 (41) 0800 400 4267 | +55 (41) 3165-4247

qualidade@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

Kit de amplificação de RNA viral com total de 26 determinações (24 amostras clínicas, 01 poço para Controle Positivo e 01 poço para Controle Negativo).

4. FINALIDADE

Teste molecular para detecção de presença ou ausência de RNA viral da Febre Amarela em amostras de soro ou plasma humano de pacientes com suspeita 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 transporte do Módulo de Amplificação - KIT FEBRE AMARELA deve ser realizado em gelo seco e o armazenamento deve ser feito entre -30 e -15°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O KIT 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. Desta forma, o kit apresenta uma reação *multiplex*, sendo ela: Febre Amarela/CI.

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.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de soro ou plasma humano de pacientes com suspeita de Febre Amarela.

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

Cuidados com as amostras de plasma e/ou soro:

- Após a coleta e processamento das amostras, manter os soros/plasmas estocados entre 2 e 8°C por até 6 horas;
- Para estocagens por períodos superiores, preparar alíquotas e congelar entre -90 e -65°C;
- As 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. Além disto, caso seja verificada a formação de crioprecipitados, eles podem obstruir a membrana da coluna utilizada para extração de RNA. Caso os crioprecipitados sejam visíveis, podem ser eliminados centrifugando a amostra a 6.800 g durante 3 minutos. O sobrenadante deve ser retirado sem misturar com o precipitado;
- Não vortexar as amostras antes da extração, somente uma breve centrifugação (*spin*), para retirar gotículas de tampas.

Cuidados no manuseio das amostras de RNA extraído:

- Utilizar técnicas assépticas;
- Usar sempre luvas de látex ou vinil durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por RNases. Mãos e partículas de poeira podem carrear bactérias e fungos que são as fontes mais comuns de contaminação por RNases;
- Trocar as luvas frequentemente e manter os tubos fechados durante os procedimentos;
- Manter o RNA no gelo ou armazenar em temperatura entre -80°C e -60°C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O KIT 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 15 µL de Controle Negativo;
- 01 microtubo contendo 150 µL de Controle Positivo.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Equipamentos de Proteção Individual (jaleco, máscara descartável, óculos de segurança, luvas sem pó descartáveis);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços) e adesivo óptico;
- 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;
- Centrifuga para microplacas;
- Centrifuga para microtubos;
- Cabine de segurança biológica;
- Agitador tipo vortex;
- 7500 Real-Time PCR *Standard* (Applied Biosystems).

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O produto pode ser usado por até 6 ciclos de congelamento/descongelamento. O estudo apresentou desempenho satisfatório mesmo após seis ciclos de descongelamento. Desta forma, sugere-se que quando não utilizado em sua totalidade, o Kit Febre Amarela pode ser usado em até seis vezes.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

O Controle Positivo fornecido deve passar pelo processo de extração de RNA viral, assim como as amostras a serem analisadas.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Resultados obtidos nas corridas serão válidos somente se atenderem aos critérios de amplificação presentes no item 14.2 para o controle positivo e para o controle interno de reação.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da Reação de RT-qPCR Febre Amarela

Importante: Descongelar os reagentes e centrifugá-los. Manter os reagentes em gelo durante todo o processo de preparo da reação.

- Identificar um tubo de 1,5/2,0 mL para o preparo da reação. Adicionar no tubo, devidamente identificado, os volumes conforme a Tabela 01 abaixo:

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

REAGENTE	26 determinações VOLUME (µL)
Mistura de PCR	310,0
Iniciadores FA Geral	96,1
Sondas FA Geral	46,5
Enzima RT	12,4
TOTAL	465,0

- Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo da mistura de reação, centrifugar o tubo e distribuir **15,0 µL** da mistura de reação em cada poço da placa, conforme o esquema sugerido na Figura 01;

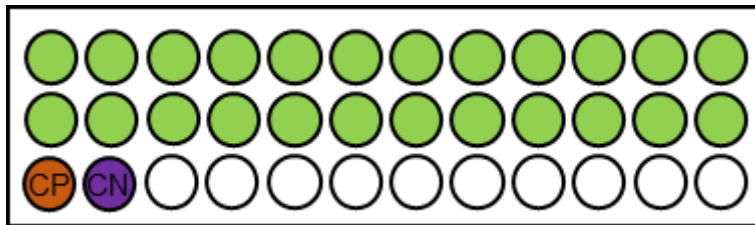


Figura 01: Esquema sugerido para montagem da placa de amplificação. (Legenda: Poços em verde destinados às amostras; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo.)

- Se necessário, aplicar adesivo selante (não-ótico) para vedar os poços durante transferência da placa para a sala de aplicação de amostras;
- Adicionar **5,0 µL** de RNA de amostra de pacientes previamente extraídas em seus respectivos poços para análise, de acordo com o desenho da placa (Figura 01);
- Adicionar **5,0 µL** de RNA extraído de Controle Positivo (Item 11) no poço correspondente, conforme o desenho esquemático (Figura 01);
- Adicionar **5,0 µL** de Controle Negativo (não necessita extração) no poço correspondente, conforme o desenho esquemático;
- Selar a placa com adesivo ótico e proceder com breve centrifugação (*spin*).

13.2. PCR em tempo real

- Ligar o equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e seu computador;
- Abrir o programa do equipamento (7500 Software) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas;
- Inserir a placa no equipamento com as posições dos poços dispostas como no desenho esquemático presente na Figura 01;

- Na tela inicial do programa, selecionar **New Experiment**, como indicado na Figura 02;



Figura 02: Tela inicial do 7500 Software.

- No menu **Setup**, submenu **Experiment Properties**, inserir o nome do experimento em "**Experiment Name**", conforme indicado na Figura 03;
- Selecionar **7500 (96 Wells)** em "**Which instrument are you using to run the experiment?**";
- Selecionar **Quantitation - Standard Curve** em "**What type of experiment do you want to set up?**";
- Selecionar **TaqMan® Reagents** em "**Which reagents do you want to use to detect the target sequence?**" Selecionar **Standard (~2 hours to complete a run)** em "**Which ramp speed do you want to use in the instrument run?**"

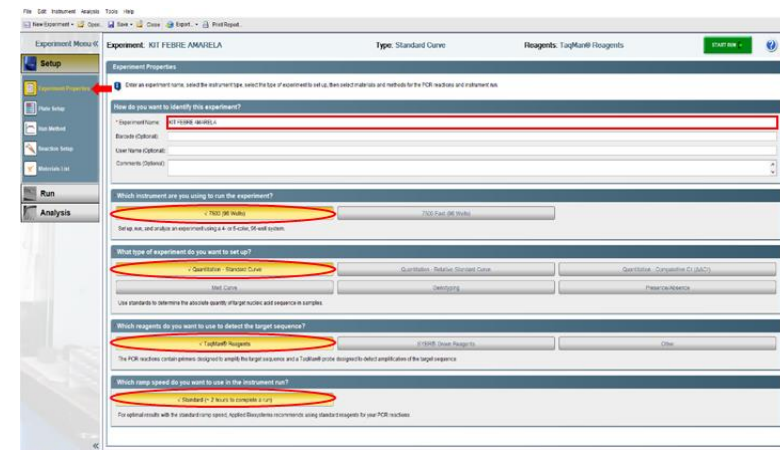


Figura 03: Página **Experiment Properties** da seção **Setup** das configurações da corrida.

- Ainda no menu **Setup**, selecionar o submenu **Plate Setup**;
- Na aba **Define Targets and Samples**, seção **Define Targets**, adicionar 02 alvos clicando no botão **Add New Target**. Incluir nessa seção os dados conforme a Tabela 02;

Tabela 02: Configurações dos alvos da corrida.

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
FEBRE AMARELA	FAM	NFQ-MGB	Red
CI	VIC	NFQ-MGB	Blue

- Na seção **Define Samples**, adicionar os campos de amostra e controles clicando no botão **Add New Sample**. Identificar os campos correspondentes de acordo com a posição na placa, conforme Figura 04;

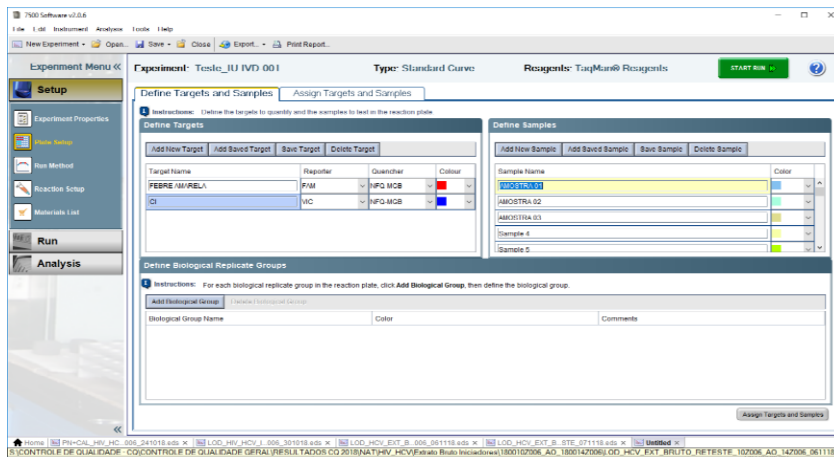


Figura 04: Configuração da aba **Define Samples**.

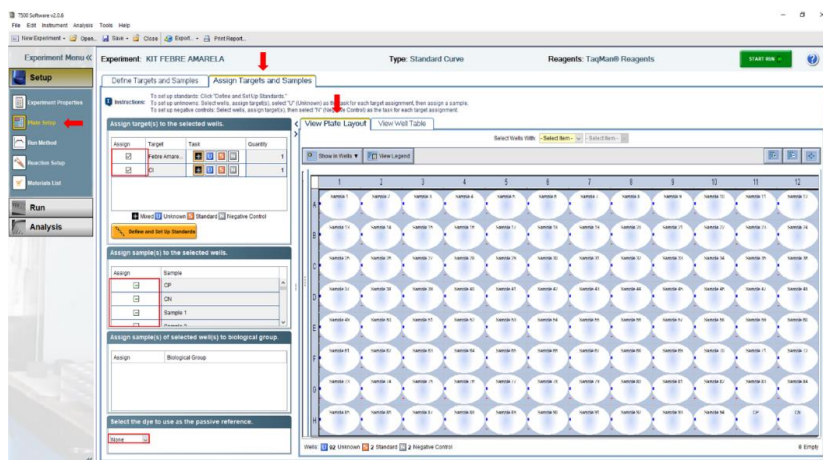


Figura 05: Configuração da aba **Assign Targets and Samples**.

- Na aba **Assign Target and Samples**, selecionar os poços de reação de acordo com o formato sugerido e identificar os **Targets** selecionando os alvos **Febre Amarela Geral e CI**;
- Selecionar cada poço da placa e atribuir a amostra que corresponde àquele poço na seção **Assign sample(s) to the selected wells**, conforme exemplo apresentado na Figura 05;
- Selecionar **None** em **Select the dye to use as the passive reference**;
- No submenu **Run Method**, aba **Graphical View**, alterar o volume de reação para **20 µL** em **Reaction Volume Per Well**, conforme Figura 06

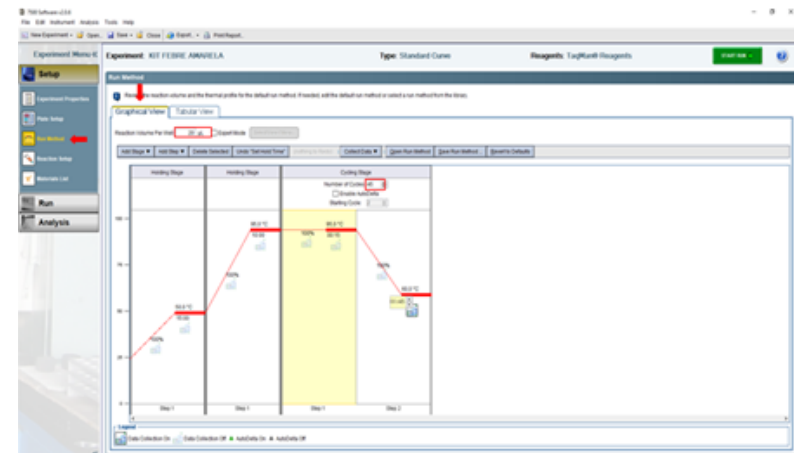


Figura 06: Página **Run Method** da seção **Setup**.

- Alterar o número de ciclos para **45** em **Number of Cycles**. No gráfico, alterar as temperaturas e durações 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)	Duração(mm:ss)
<i>Holding Stage</i>	50	15:00
<i>Holding Stage</i>	95	10:00
<i>Cycling Stage (45x)</i>	95	00:15
	60*	00:45

*Captura de fluorescência (Data Collection On).

- No menu **Run**, clicar no botão **START RUN** (conforme indicado na Figura 7). Uma janela será aberta e o usuário deverá digitar o nome do arquivo da corrida que será salvo em formato **.eds**.

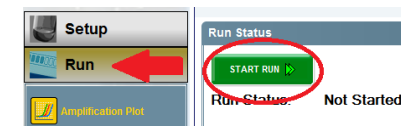


Figura 07: Botão **Start Run** na seção **Run**.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise dos resultados

- No menu *Analysis*, selecionar *Analysis Settings*;
- Uma janela de configurações de análise abrirá, conforme Figura 08. Nessa janela, na aba *Ct settings*, desafixar os itens *Use Default Settings*, *Automatic Threshold* e *Automatic Baseline* para cada alvo e inserir os valores representados na Tabela 04;

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

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Febre Amarela Geral	100.000	6	15
CI	10.000	6	15

- Clicar em *Apply Analysis Settings* e, em seguida, *Analyse*;

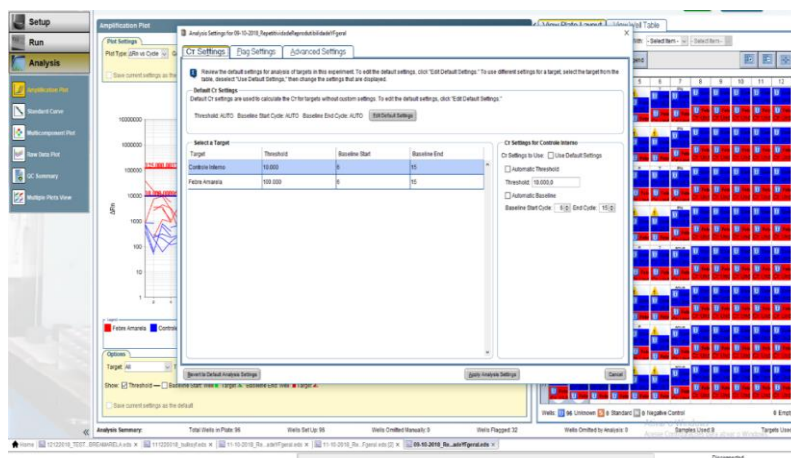


Figura 08: Seção *Analysis* para configuração dos parâmetros de análise.

14.2. Interpretação dos resultados

Controle Positivo (CP):

- O poço de CP deve apresentar amplificação dos alvos para febre amarela (FAM) e para o CI (VIC), mimetizando uma amostra positiva com Ct dos dois alvos menores que 30;

Controle Negativo (CN):

- O poço de CN não podem apresentar nenhuma amplificação, tanto para o alvo febre amarela (FAM) quanto para o CI (VIC);

Amostras:

- A amplificação típica, com curva apresentando $Ct \leq 45$, juntamente com a amplificação do CI (Ct menor que 30) caracteriza um paciente positivo, conforme Tabela 05;

Tabela 05: Critérios de classificação para amostras avaliadas.

Resultado	Ct de Febre Amarela	Ct de Controle Interno
Positivo	< 45	< 30
Negativo	Ausência de amplificação	< 30

14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora de critério de aceitação

Resultado fora do critério	Procedimento a adotar
Não amplificação de um ou de ambos os alvos para o Controle Positivo	Resultados devem ser desconsiderados. Teste deve ser repetido
Amplificação do Controle Negativo	Resultados devem ser desconsiderados. Teste deve ser repetido
Não amplificação do Controle Interno	Análise da amostra que não possui amplificação do Controle Interno deve ser repetida
Excesso de ruído ou sinal de fluorescência muito baixo	Possibilidade de degradação de RNA de amostra ou processo de extração de RNA malsucedido (principalmente quando não há amplificação do Controle Interno no teste de uma amostra). Nesse caso, recomenda-se repetir o processo de extração para a amostra e testá-la novamente
Cts muito baixos para o alvo Febre Amarela	Possibilidade de elevada carga viral do paciente (Ct do Controle Interno pode ter um valor elevado, ou ainda, não apresentar amplificação). Nesse caso, recomenda-se fazer uma diluição 1:10 da amostra de RNA em água RNase Free e testá-la novamente

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O produto é de caráter qualitativo, ou seja, permite detecção de presença ou ausência do ácido nucleico do alvo febre amarela. Não é destinado a quantificação de carga viral;
- Resíduos de etanol podem interferir na reação de PCR. Recomenda-se a utilização do kit de extração de RNA QIAamp Viral RNA Mini kit®.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A sensibilidade analítica do Kit Febre Amarela é de 0,932 cópias de RNA viral por reação, o que equivale a 80 cópias de vírus/mL de amostra de paciente. 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 onde o produto será manipulado, além do uso de tubos e plásticos esterilizados, *RNase/DNase Free* e descartáveis, bem como utilização de EPIs como luvas e máscaras 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.

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
- A temperatura do ambiente indicada para manipulação do produto é de até 25°C. 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;
- Para que o produto atinja seu desempenho ótimo, os kits de extração validados para o processo de extração de RNA viral foram o kit de extração de RNA QIAamp Viral RNA Mini kit® e o kit de extração de RNA viral - IBMP.