

## 1. NOME COMERCIAL

IBMP Biomol Flu A, B e COVID.

## 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

SAC 0800 400 4267 | +55 41 3165 4247

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

[sac@ibmp.org.br](mailto:sac@ibmp.org.br) | [www.ibmp.org.br](http://www.ibmp.org.br)

## 3. APRESENTAÇÃO

O Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID é composto pelo módulo contendo 96 reações de amplificação capazes de detectar e diferenciar o vírus da Influenza A, vírus da Influenza B e SARS-CoV-2 e coinfeções (94 amostras e 2 controles).

## 4. FINALIDADE E MODO DE USO

Teste molecular discriminatório capaz de detectar a presença ou ausência de ácidos nucleicos (RNA) dos vírus da Influenza A, vírus da Influenza B e SARS-CoV-2, além da detecção de um Controle Interno humano (CI) de reação. As amostras a serem testadas são provenientes da extração de RNA de trato respiratório superior de pacientes com suspeita de infecção ou coinfeção por estes patógenos.

## PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

## 5. USUÁRIO PRETENDIDO

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

## 6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -15°C e o transporte entre -80°C e -35°C. Esse é um produto de uso múltiplo, validado para passar por até 4 ciclos de descongelamento e congelamento, com subsequente descarte de sobras de reagentes.

## 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

Os testes realizados com o Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID são baseados na técnica da 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 etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA da amostra) seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), na qual a fluorescência é captada para cada alvo. O Kit Biomol Influenza A, Influenza B e COVID-19 permite a identificação de SARS-CoV-2, vírus da Influenza A e vírus da Influenza B, além de detectar o Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do CI é feita através do uso iniciadores e de sondas (oligonucleotídeos marcados com fluoróforos) específicos para cada alvo molecular. A amplificação típica de um ou mais vírus demonstra uma reação com resultado positivo para a amostra. Amostras com resultados negativos para os alvos virais (patógenos) devem apresentar amplificação apenas do CI. A amplificação do CI indica o

funcionamento adequado da reação (reagentes e operador) além da qualidade do RNA extraído da amostra. Caso o CI não seja detectado, a amostra deve ter seu material genético extraído novamente. Entretanto, é importante ressaltar que amostras apresentando amplificação para os alvos virais (patógenos) devem ter seu resultado considerado válido independente da amplificação do CI. A interpretação dos resultados pode ser encontrada na Tabela 5.

O kit possui um Controle Positivo (CP) biosseguro (não oferecendo riscos de contaminação aos operadores) que avalia todos os alvos específicos (patógenos) e o CI, comportando-se como referencial de qualidade dos reagentes e do processo de amplificação. O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais relacionadas com possíveis casos de contaminação (patógenos). Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia-se a presença ou ausência dos alvos moleculares.

## 8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA provenientes de *swab* de naso ou orofaringe coletados em meio de manutenção viral.

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

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina, recomenda-se sua coleta, preferencialmente, entre o 3º e o 7º dia após o início dos sintomas. Caso haja necessidade de armazenamento das amostras coletadas, mantê-las entre -30°C e -15°C por no máximo 3 meses ou a temperaturas inferiores próximas a -70°C por períodos superiores.

Ciclos de congelamento e descongelamento das amostras ou do RNA extraído devem ser evitados por conta de possível degradação do RNA viral.

Usar sempre luvas de látex ou vinil durante o manuseio das amostras ou do RNA extraído a fim de prevenir contaminação por RNases. É recomendado trocar as luvas frequentemente e manter os tubos fechados sempre que possível durante os procedimentos.

Manter o RNA no gelo ou armazenado em temperaturas próximas a -70°C.

## 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID é composto por:

- 01 microtubo contendo 1050 µL de Mistura de PCR;
- 01 microtubo contendo 90 µL de Enzimas;
- 01 microtubo contendo 450 µL de Oligonucleotídeos;
- 01 microtubo contendo 30 µL de Controle Positivo (CP);
- 01 microtubo contendo 30 µL de Controle Negativo (CN).

### 9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

Para a realização dos testes, os seguintes materiais devem ser providenciados pelo usuário:

- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, toucas, luvas sem pó descartáveis, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de RNA;
- Etanol absoluto (para o módulo de extração);
- Tubos para armazenamento das amostras;
- Microtubos de 1,7 a 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL e 100-1000 µL);
- Centrífuga;
- Ponteiras esterilizadas livre de enzimas do tipo RNase e DNase com filtro;
- Suporte/estante para tubos de 1,7 ou 2,0 mL;

- Cabine de segurança biológica;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Agitador tipo *vortex*;
- Equipamento de PCR em tempo real (7500 Fast, 7500 Real-Time PCR ou QuantStudio DX).

#### 10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O transporte do Módulo de Amplificação Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID deve ser realizado em gelo seco (entre -80°C e -35°C). Após descongelado, o produto pode passar por até 4 ciclos de congelamento/descongelamento e ter as sobras descartadas.

#### 11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

A extração do RNA deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Sugerido: RNA QIAamp Viral RNA Mini Kit®, Qiagen). Após esse procedimento, o RNA deve ser usado imediatamente ou armazenado em freezer -80°C até a reação de RT-qPCR.

#### 12. RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscaras, touca e luvas descartáveis sem pó durante o uso deste produto;
- Não utilizar reagentes vencidos;
- A manipulação das micropipetas deve respeitar a faixa de volume;
- A temperatura do ambiente indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 25°C;
- As reações possuem um Controle Interno onde o alvo de detecção é uma região do genoma humano. Portanto, é necessário manipular o produto com as precauções devidas referentes às boas práticas de laboratório para evitar contaminações das reações com material genético dos operadores;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva para todos os vírus e para o CI do kit. Mesmo não apresentando risco para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras reais evitando resultados falso-positivos;
- É necessário realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de reações e PCR em áreas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações;
- A etapa de extração de RNA, prévia a aplicação deste produto é de essencial para a eficiência da reação, portanto, é imprescindível seguir as instruções do fabricante do kit de extração;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação ter ocorrido para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em cabines de segurança biológica;
- As amostras de trato respiratório superior ou inferior e/ou RNAs extraídos a partir de amostras de pacientes devem ser armazenados em temperatura adequada antes de sua utilização para evitar sua degradação e invalidação do teste. As amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas por no máximo até 72 h entre 4°C e 8°C. Após esse tempo as amostras devem ser armazenadas entre -35°C e -20°C e os RNAs extraídos devem ser armazenados próximos a -70°C;
- 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;
- Para um melhor desempenho do teste, seguir corretamente as instruções de uso e utilizar equipamentos de medição calibrados.

#### 13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

##### 13.1. Preparo da mistura de reação

**Importante:** Descongelar os reagentes e centrifugá-los. Manter os reagentes em gelo ou *cooler* durante todo o processo de preparo das reações. Uma placa de PCR de 96 poços é utilizada para 96 reações de amplificação e detecção, sendo 94 poços para amostras de pacientes, 01 poço para reação do Controle Negativo e 01 poço para reação do Controle Positivo.

- Separar 1 tubo de 1,7 ou 2,0 mL para a mistura dos insumos de RT-qPCR;
- Adicionar ao tubo, devidamente identificado, os componentes listados na Tabela 1;

Tabela 1. Preparo da mistura de reação do Kit Biomol Influenza A, Influenza B e COVID-19:

Mistura de Reação		
Componente da mistura de reação	Volume para 1 reação	Volume para 1 placa (96 reações)
Mistura de PCR	10,0 µL	1000 µL
Enzimas	0,8 µL	80 µL
Oligonucleotídeo	4,2 µL	420 µL
Total	15 µL	1500 µL

- Homogeneizar gentilmente por pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 15 µL da mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços;
- Se aplicável, selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

##### 13.2. Aplicação das amostras de RNA e dos controles

Em local apropriado para manipulação de ácidos nucleicos, as amostras e controles devem ser aplicados nos poços correspondentes. Fica a critério do operador analisar a maneira mais adequada de distribuição das amostras na placa.

- Adicionar 5,0 µL de cada amostra de RNA extraído nos poços correspondentes;
- Adicionar 5,0 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente;
- Adicionar 5,0 µL de Controle Negativo (CN) no poço correspondente;
- Selar a placa com adesivo ótico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

##### 13.3. PCR em tempo real

- Configurar no *software* do equipamento conforme desenho de placa estabelecido pelo usuário, as amostras, o controle negativo e o controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2.

Tabela 2. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Target Name	Reporter	Quencher
Influenza A	FAM	NONE
Influenza B	VIC	NONE
COVID-19	TEXAS RED	NONE
Controle Interno	Cy5	NONE

- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de ciclagem da reação de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01
Estágio 2	95	2 minutos	01
Estágio de ciclagem	95	15 segundos	40
	55*	30 segundos	

\* Certificar-se de que a captura de fluorescência ocorra neste estágio.

- Selecionar a referência passiva do equipamento como *NONE*;
- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

## 14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Os parâmetros de análise devem ser ajustados conforme Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de análise dos resultados.

		Influenza A	Influenza B	COVID-19	Controle Interno
7500 Real-Time PCR System (standard), 7500 Fast Real-Time PCR System	<i>Threshold</i>	15.000	3.000	20.000	15.000
	<i>Baseline</i>	3-15	3-15	3-15	3-15
QuantStudio DX Real-Time PCR System	<i>Threshold</i>	20.000	10.000	50.000	30.000
	<i>Baseline</i>	AUTO	AUTO	AUTO	AUTO

### 14.2. Interpretação dos resultados

#### Controle Positivo (CP):

- O poço CP deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados, apresentando Ct  $\leq$ 35.

#### Controle Negativo (CN):

- O poço CN não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos virais e controle interno com Ct  $<$ 30.

**Observação:** Para que a análise seja válida, os critérios de aceitação para o CP e CN devem ser atendidos.

#### Amostras:

Abaixo os padrões de interpretação conforme resultados apresentados:

- O teste é considerado válido somente se o CN apresentar amplificação do controle interno com Ct  $<$ 30. O teste também só é considerado válido se o CP apresentar amplificação para todos os quatro alvos, três alvos virais e controle interno com Ct  $<$ 35.
- Todas as amostras consideradas negativas devem apresentar amplificação do controle interno com Ct  $<$ 35.

- As amostras positivas para os vírus testados são consideradas positivas com Cts  $<$ 40 para seus respectivos alvos virais desde que apresentem curva de amplificação característica, mesmo se não houver amplificação do controle interno.

O kit é capaz de detectar coinfeções desde que os vírus detectados estejam dentro das faixas de interpretações destacadas acima.

Tabela 5. Critérios de interpretação e avaliação dos resultados.

Na amostra				CP	CN*	Resultado
Influenza A	Influenza B	COVID-19	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+/-	+	-	Detectável Influenza A
-	+	-	+/-	+	-	Detectável Influenza B
-	-	+	+/-	+	-	Detectável COVID-19
-	+	+	+/-	+	-	Detectável Influenza B e COVID-19
+	-	+	+/-	+	-	Detectável Influenza A e COVID-19
+	+	-	+/-	+	-	Detectável Influenza A e Influenza B
+	+	+	+/-	+	-	Detectável Influenza A, Influenza B e COVID-19
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio Inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio Inválido
-	-	-	-	+	-	Amostra Inválida

\*Tanto o CP quanto o CN devem apresentar amplificação do controle interno. O CP deve ainda apresentar amplificação para os três alvos virais e controle interno

## 15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- Procedimentos de coleta, transporte e processamento de amostras inadequados podem gerar resultados falsos-negativos;
- Armazenamento inadequado dos reagentes pode apresentar resultados falsos-negativos;
- Interferentes comuns para técnicas moleculares podem interferir no desempenho do teste;
- Para que os resultados deste teste sejam garantidos, deve-se seguir todas as instruções de uso do produto.

## 16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 16.1. Sensibilidade Analítica

Os limites de detecção com confiança de 95% são  $\geq$  27,9 cópias/reação para Vírus da Influenza A,  $\geq$  57 cópias/reação para Vírus da Influenza B e  $\geq$  28,4 cópias/reação para SARS-CoV-2.

### 16.2. Especificidade Analítica

Não apresenta reações cruzadas frente a amostras positivas para os seguintes patógenos (entre parênteses o número amostral): Adenovírus (5), Bocavírus humano (5), Coronavírus 229E (5), Coronavírus HKU1 (3), Coronavírus NL63 (5), Coronavírus OC43 (5), Metapneumovírus humano (5), Parainfluenza 1 (5), Parainfluenza 2 (5), Parainfluenza 3 (5), Rhinovírus humano (5), Vírus sincicial respiratório (5), *Candida albicans* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Klebsiella oxytoca* (2), *Mycobacterium tuberculosis* (1), *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus epidermidis* (2), *Streptococcus agalactiae* (1) e *Streptococcus pyogenes* (3).

### 16.3. Reatividade

O Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID foi testado frente aos tipos do vírus da Influenza A H1, H1N1, H3 e H5; cepas do vírus da Influenza B Victoria e Yamagata; e das linhagens de SARS-CoV-2 B.1.1.28, B1.1.33, P.1 (variante Gama), P.1-like, P.2 (variante Zeta), B.1.1.7 (variante Alpha), B.1.617.2 (variante Delta) e C.37 (variante Lambda). Todos apresentaram resultado detectável para seus respectivos alvos e ausência de reações-cruzadas. Avaliação *in silico* valida a aplicação deste produto também para as linhagens de SARS-CoV-2 B.1.351 (variante Beta), B.1.617.1 (variante Kappa), B.1.421/B.1.429 (variante Epsilon), B.1.526 (variante Iota), B.1.621 (variante Mu) e B.1.1.529 (variante Ômicron).

### 16.4. Desempenho diagnóstico

A caracterização do desempenho diagnóstico (Tabela 6) do teste foi realizada utilizando painel de 238 amostras clínicas de *swab* de naso/orofaringe, das quais 22 foram caracterizadas como positivas para Influenza A e 23 positivas para Influenza B, além de 41 amostras caracterizadas como positivas para COVID-19 e 152 amostras caracterizadas como negativas para todos os alvos virais do teste.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico frente a amostras clínicas previamente testadas.

		Referência			
		Positivo	Negativo	Total	
Kit Biomol Flu A, B e COVID	Influenza A	Detectado	21	0	21
		Não detectado	1	216	217
		Total	22	216	238
	Influenza B	Detectado	23	0	23
		Não detectado	0	215	215
		Total	23	215	238
	COVID-19	Detectado	41	0	41
		Não detectado	0	110	110
		Total	41	110	238

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 99,4% (95,5% para Influenza A, 100% para Influenza B e 100% para COVID-19). O teste apresenta especificidade diagnóstica de 100% para todos os alvos virais. A taxa geral de concordância é de 99,6%.

### 17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Nenhum risco residual identificado.

### 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 de uso.

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

• O produto deve ser utilizado dentro do prazo da validade determinado pelo fabricante. O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário utilize o produto fora do prazo de validade estabelecido.

- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso ou as condições de armazenamento dos insumos.
- Para um melhor desempenho do teste é necessária a utilização de instrumentos de medição e detecção devidamente calibrados e/ou qualificados.
- Os reagentes do Kit não devem ser reutilizados.
- Deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) adequadamente para evitar contaminação cruzada.