

Instrução de Uso
Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID
 IU-IVD-013
 Revisão 05 | 08/03/2023



1. NOME COMERCIAL

Kit 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

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

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

sac@ibmp.org.br | 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 IBMP Biomol Flu A, B e COVID 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.

Produto validado para uso em equipamentos 7500 Fast, 7500 Real-Time PCR e QuantStudio DX (Thermo Fisher Scientific®).

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 IBMP Biomol Flu A, B e COVID :

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	Threshold	15.000	3.000	20.000	15.000
	Baseline	3-15	3-15	3-15	3-15
QuantStudio DX Real-Time PCR System	Threshold	20.000	10.000	50.000	30.000
	Baseline	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 \leq 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 \leq 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 \leq 35.
- Todas as amostras consideradas negativas devem apresentar amplificação do controle interno com Ct \leq 35.
- As amostras positivas para os vírus testados são consideradas positivas com Cts \leq 35 para seus respectivos alvos virais desde que apresentem curva de amplificação característica, mesmo se não houver amplificação do controle interno.

- Amostras com Ct $>$ 35 para os alvos virais devem ser retestadas (com nova extração) e somente serão consideradas positivas se houver amplificação típica independentemente do valor do Ct obtido, mesmo se não houver amplificação do CI. 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. Desempenho diagnóstico

A caracterização do desempenho diagnóstico (Tabela 6) do teste foi realizada utilizando painel de 288 amostras clínicas de swab de naso/orofaringe, das quais 60 foram caracterizadas como positivas para Influenza A e 35 positivas para Influenza B, além de 128 amostras caracterizadas como positivas para COVID-19 e 65 amostras caracterizadas como negativas para todos os alvos virais do teste.



- Deve-se utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) adequadamente para evitar contaminação cruzada.

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

			Referência		
			Positivo	Negativo	Total
Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID	Influenza A	Detectado	57	0	57
		Não detectado	3	228	231
		Total	60	228	288
	Influenza B	Detectado	35	0	35
		Não detectado	0	253	253
		Total	35	253	288
	COVID-19	Detectado	128	0	128
		Não detectado	0	160	160
		Total	128	160	288

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 95% 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%.

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;