

Instrução de Uso

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Flu A, B e

COVID

IU-IVD-013

Revisão 07 | 03/07/2025

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 – PARANA – BRASIL

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8h30min às 16h30min (exceto feriados).

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

3. APRESENTAÇÃO

Kit contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético (RNA) dos vírus Influenza A, Influenza B e SARS-CoV-2, extraídos de amostras do trato respiratório superior, obtidas de pacientes com suspeita de infecção ou coinfeção por estes patógenos. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico de Influenza A, Influenza B e COVID-19.

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 diagnósticos baseados em PCR em tempo real.

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

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

A manipulação do conteúdo do módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID utiliza a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

A RT-qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma dos patógenos, em RNA extraído de amostras do trato respiratório superior. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA da amostra biológica) seguida da qPCR, na qual ocorre a avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID permite a identificação dos vírus Influenza A, Influenza B e SARS-CoV-2, além de um Controle Interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do Controle Interno é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo molecular (oligonucleotídeos marcados com fluoróforos), em reação multiplex.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Amostras

com resultados não detectáveis para os alvos moleculares pesquisados devem apresentar amplificação apenas do CI. A amplificação do CI indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador), além de refletir a 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 moleculares dos patógenos devem ter seu resultado considerado válido independente da amplificação do CI.

O kit possui um Controle Positivo (CP) sintético biosseguro (que não oferece risco biológico aos operadores ou ao ambiente), que deve apresentar resultado detectável para todos os alvos moleculares pesquisados, incluindo o CI. O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos pesquisados exceto para o CI.

Este kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência dos alvos moleculares. O produto não é validado para análise quantitativa.

Produto validado para uso com os seguintes termocicladores: 7500 Fast, 7500 Real-Time PCR e QuantStudio DX (Thermo Fisher Scientific®).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de *swab* naso/orofaríngeo em meio de manutenção viral.

8.1 Condições de coleta, manuseio, preparo e preservação de amostras



As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina. Caso haja necessidade de armazenamento das amostras coletadas, mantê-las entre -30°C e -15°C por no máximo 3 meses ou em temperaturas próximas a -70°C por períodos maiores.

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

8.2 Extração de RNA

Deve-se realizar a extração de RNA das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter RNA cuja qualidade e integridade resulte no atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

8.3 Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA ou RNA extraído

- O RNA extraído deve ser armazenado em temperaturas inferiores a -70°C;
- Sempre usar luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear micro-organismos, 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 Flu A, B e COVID é composto por um módulo de amplificação contendo:

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

9.1 Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vórtex;
- Banho de gelo ou rack termoestável para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga para placas de 96 poços;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, toucas, luvas sem pó descartáveis, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de RNA;
- Micropipetas de precisão (volumes de 0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços) ou strip de tubos compatíveis com o equipamento de PCR em tempo real;
- Ponteiras livres de RNAses e DNAses com filtro (volumes de 0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;

- Suporte/estante para tubos de 1,5 a 2,0 mL.

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 4 ciclos de descongelamento. Após, as 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

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 rack termoestável.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem pó 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



- 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 1, os volumes necessários para realização da corrida;
- OBS:** Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 1. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID.

Componente	Volume para uma reação
Mistura de PCR	10 µL
Enzimas	0,8 µL
Oligomix	4,2 µL
Total	15 µL

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- 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, seguindo o mapa da placa de reação;
- Selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

13.2 Adição de amostras e controles

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

13.3 Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle negativo e do controle positivo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2;

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

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
Influenza A	FAM	None
Influenza B	VIC	None
COVID-19	TEXAS RED	None
CI	Cy5	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE;
- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 3;

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01
Estágio 2	95	2 minutos	01
Estágio 3	95	15 segundos	40
	55*	30 segundos	

* Estágio de captura de fluorescência.

- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1 Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 4, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 4. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real-Time PCR e 7500 Fast	Influenza A	15.000	3-15
	Influenza B	3.000	3-15
	COVID-19	20.000	3-15
	CI	15.000	3-15
QuantStudio DX Real-Time PCR System	Influenza A	20.000	Automático
	Influenza B	10.000	Automático
	COVID-19	50.000	Automático
	CI	30.000	Automático

14.2 Interpretação dos resultados



- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para os quatro alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 35;
 - Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos três alvos virais e deve apresentar amplificação do Controle Interno (CI) com Ct ≤ 30;
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos Influenza A, Influenza B e COVID-19, e deve apresentar amplificação do Controle Interno (CI) com Ct < 35. Amostras com Ct ≥ 35 para o controle interno são consideradas inválidas e o processo deve ser repetido desde a extração;
 - Para que uma amostra seja considerada positiva deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para os alvos Influenza A e/ou Influenza B e/ou COVID-19, com Ct < 35, mesmo que não haja 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 no reteste independentemente do valor do Ct obtido, mesmo se não houver amplificação do CI.
- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID.

Amostra				CP	CN	Resultado
FLU A	FLU B	COVID-19	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+/-	+	-	Influenza A detectável

Amostra				CP	CN	Resultado
FLU A	FLU B	COVID-19	CI			
-	+	-	+/-	+	-	Influenza B detectável
-	-	+	+/-	+	-	COVID-19 detectável
-	+	+	+/-	+	-	Influenza B e COVID-19 detectáveis
+	-	+	+/-	+	-	Influenza A e COVID-19 detectáveis
+	+	-	+/-	+	-	Influenza A e B detectáveis
+	+	+	+/-	+	-	Influenza A, B e COVID-19 detectáveis
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio Inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio Inválido
-	-	-	-	+	-	Amostra Inválida

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

- Amostras sem amplificação para os alvos virais e com amplificação do CI fora dos critérios de aceitação indicados no item 14.2 são consideradas inválidas e o processo deve ser repetido desde a extração;
- Ensaios que não apresentem amplificação para algum dos alvos do CP devem ser repetidos;

- Ensaios que não apresentem amplificação do CI no poço correspondente ao CN devem ser repetidos.

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 8. TIPOS DE AMOSTRAS E MATRIZES APLICÁVEIS nessa Instruções de Uso);
- Amostras de RNA extraído de coletas em *swab* naso e/ou orofaríngeo podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID;
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui possibilidade de infecção por Influenza A, Influenza B ou COVID-19;
- Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico somente na fase aguda da doença. Amostras clínicas devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina para testes moleculares seguindo as recomendações do Ministério da Saúde ou das respectivas Secretarias de Saúde.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1 Sensibilidade Analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção, foram testadas 10 diluições da mistura de RNA dos três alvos virais.

O limite mínimo de detecção do Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID, com confiança de 95%, é de ≥ 27,9 cópias/reacção

para Influenza A, ≥ 57 cópias/reação para Influenza B e $\geq 28,4$ cópias/reação para SARS-CoV-2.

16.2 Especificidade Analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: 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 Precisão

Ensaio de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizadas por dois operadores distintos, através de oito replicatas para cada diluição, em três equipamentos diferentes. Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade demonstraram coeficientes de variação inferiores a 10%.

16.4 Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de 288 amostras clínicas de *swab* naso/orofaríngeo, previamente caracterizadas utilizando RT-qPCR. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID.

	Método de Referência		
	Positivo ou detectável	Negativo ou não detectável	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 (CI95 86,1 - 99,0%), 100% para Influenza B (CI95 90,0 - 100%) e 100% para COVID-19 (CI95 97,2 - 100%). O teste apresenta especificidade diagnóstica de 100% para Influenza A (CI95 98,7 - 100%), 100% para Influenza B (CI95 98,6 - 100%) e 100% para COVID-19 (CI95 97,7 - 100%). A taxa geral de concordância é de 99%.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nesta Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucléico proveniente de outras fontes deve ser mitigado por meio da adoção de boas práticas de laboratório;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva. Mesmo não apresentando risco biológico para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação acidental de amostras ou do ambiente, o que pode levar a resultados falso-positivos;

- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- Realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de misturas de reação e a etapa de PCR em áreas físicas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e do ambiente;
- 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 falso-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 COMERCIAL

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo da validade determinado pelo fabricante;
- 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;
- Devem ser utilizados instrumentos de medição e detecção calibrados e/ou qualificados, sempre que aplicável;
- As condições de coleta e armazenamento das amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;



- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de RNA obtidas de *swab* naso/orofaríngeo. O uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Flu A, B e COVID;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 dessa Instrução de Uso.