

Instruções de Uso para o Kit de Detecção de Ácido Nucléico do Vírus da Influenza A / Vírus da Influenza B (método PCR)

SOMENTE PARA USO PROFISSIONAL E PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

[Nome do produto] Kit de detecção de ácido nucleico do vírus Influenza A / vírus Influenza B (Método PCR)

[NOME técnico] VÍRUS INFLUENZA

[Especificações de embalagem] 50 testes / caixa

[Item nº] ZC-LG-201-2

[Uso esperado]

Este produto é usado para detectar qualitativamente o RNA de ácido nucleico do vírus influenza A (FLuA) e do vírus influenza B (FLuB) em amostras de esfregaços orofaríngeos da população.

A gripe é uma doença infecciosa respiratória aguda causada pelo vírus da gripe. Tem uma alta incidência na primavera e no inverno, rápida disseminação, tem uma alta incidência e tem um curto período epidêmico, causando facilmente surtos ou pandemias de difícil controle. Os vírus da gripe incluem Tipo A, Tipo B e Tipo C. O Tipo A é o mais provável de causar epidemias, seguido pelo Tipo B, e o Tipo C raramente causa epidemias. Os vírus da gripe são transmitidos principalmente por gotículas de ar, geralmente causando febre, fadiga, dores musculares e sintomas respiratórios leves a moderados. Em casos graves, eles podem causar pneumonia, miocardite e insuficiência cardíaca. Como os sintomas de infecção e as características epidêmicas causadas por esses vírus são semelhantes, não é muito confiável distinguir os patógenos com base apenas nos sintomas clínicos. Os métodos de diagnóstico de laboratório incluem isolamento de vírus, detecção de antígeno e detecção de ácido nucleico. Os resultados do teste são apenas para referência clínica e não podem ser usados isoladamente como base para confirmar ou excluir casos.

[Princípio de Funcionamento]

Este kit adota a tecnologia de PCR fluorescente em tempo real para, a partir de uma região conservada da região codificadora da proteína M do vírus influenza A e do gene da proteína N do vírus influenza B como a região alvo, e projetar iniciadores específicos Taqman para o vírus influenza A e vírus influenza B. Através da detecção de um tubo, a detecção rápida de dois patógenos pode ser realizada ao mesmo tempo. Após a extração do ácido nucleico, as amostras clínicas são adicionadas aos reagentes de detecção fornecidos no kit para preparar tubos de reação de PCR. A amplificação do RT-PCR é realizada por um instrumento de PCR quantitativo fluorescente e o sinal de fluorescência é detectado, então o software do equipamento desenha automaticamente a curva de amplificação em tempo real. Este kit é equipado com um controle de referência interno, que é usado para monitorar o processo de coleta, armazenamento, transporte e extração de ácido nucleico da amostra para evitar erros de julgamento de resultados falsos negativos.

[Principais ingredientes]

Componente	Especificação e quantidade	Principais ingredientes
Solução de reação de	600µL x tubo	Íon magnésio, mistura de nucleotídeos, etc.

amplificação de ácido nucleico		
Mistura de enzimas	200µL x tubo	DNA polimerase, transcriptase reversa, enzima UNG
Solução de reação do vírus Influenza A / B	200µL x tubo	Vírus da influenza A, vírus da influenza B e Primers RnaseP e sondas de referência interna
Controle positivo	500µL x tubo	Partículas semelhantes a vírus contendo 4 x (10 ⁶ ~10 ⁷) cópias / ml de fragmentos específicos de Influenza A, Influenza B e RnaseP
Controle positivo fraco	500µL x tubo	Partículas semelhantes a vírus contendo 4 x (10 ³ ~10 ⁴) cópias / ml de fragmentos específicos de Influenza A, Influenza B e RnaseP
Controle negativo	500µL x tubo	0,9% de cloreto de sódio

Atenção:

- Os componentes de diferentes números de lote não podem ser usados de forma intercambiável.
- Reagentes necessários, mas não fornecidos: kits de extração de ácido nucleico, você pode usar os reagentes de extração e purificação de ácido nucleico produzidos pela Shanghai Berger Medical Technology Co., Ltd. (Shanghai Fengxie No. 20180202).

[Condições de armazenamento e período de validade]

- Armazenar protegido da luz a -20 ± 5 °C. O período de validade é de 12 meses.
- Ser armazenado protegido da luz a -20 ± 5 °C não afetará a vida útil. Evite congelar e descongelar repetidamente. Até 6 ciclos de congelamento e descongelamento não afetaram o efeito de detecção.
- Data de produção e data de validade: Veja a embalagem externa.

[Instrumento aplicável]

Instrumento de PCR quantitativo de fluorescência ABI 7500.

[Requisitos de amostra]

- Tipo de amostra: esfregaço orofaríngeo.
- A coleta de amostras de esfregaço orofaríngeo é realizada de acordo com a coleta de amostras de esfregaço orofaríngeo no "Clinical Nursing Practice Guidelines" (edição 2011).
Etapas da operação: use um abaixador de língua para pressionar suavemente a língua e limpe rapidamente o arco palatino em ambos os lados da boca, faringe e amígdalas do paciente com um swab (swab recomendado com cabo de plástico, swab de poliéster com alça de plástico e cotonete de náilon com alça de plástico), evitando que o swab toque nas outras partes; mergulhe a cabeça do swab na solução de amostragem (3mL contendo tampão antibiótico para evitar o crescimento de bactérias e fungos, 3mL de solução de Hank, 3mL tampão de fosfato), na solução de amostragem, pressione a cabeça do cotonete várias vezes, descarte a ponta (cauda) e aperte a tampa do tubo para evitar que resseque. Identifique as amostras coletadas: número de série, tipo de amostra, horário de coleta. Antes da extração da amostra, agite o tubo de coleta (esticador externo, resistente a criopreservação a -80 °C) com um misturador de vórtice por 1 minuto, misture bem e execute a extração do ácido nucleico.
- As amostras devem ser testadas a tempo após a coleta e o teste deve ser concluído dentro de 3 dias de armazenamento a 2~8 °C, e deve ser armazenado a -40 ± 5 °C ou menos, e o armazenamento

por 12 meses ~~sem~~ não afetará os resultados do teste. Evite congelar e descongelar repetidamente. Seis (06) ciclos de congelamento e descongelamento não afetarão os resultados do teste.

[Método de teste]

1. Preparação de reagentes (área de preparação de reagentes)

Retire a solução de reação de amplificação de ácido nucleico, a mistura de enzimas e a solução de reação de vírus influenza A / vírus influenza B do kit, descongele em temperatura ambiente, agite e misture bem e, em seguida, centrifugue imediatamente.

Calcule o número de reagentes a serem usados N (N = número de amostras + 1 tubo de controle positivo + 1 tubo de controle positivo fraco + 1 tubo de controle negativo), configure o sistema de reação de acordo com a tabela a seguir, adicione-o a um tubo de centrifugação de volume apropriado, agite e misture bem e centrifugue imediatamente, transfira alíquotas de 20µL para tubos de reação de PCR e transfira para a área de processamento de amostra.

Nome do componente	Volume adicionado (µL) / teste pessoa
Solução de reação de amplificação de ácido nucleico	12
Mistura de enzimas	4
Solução de reação Influenza A / B	4
Volume Total	20

2. Processamento de amostra (área de processamento de amostra)

① Extração de ácido nucléico: Realizar extração de ácido nucleico na amostra de teste, controle positivo, controle positivo fraco e controle negativo de acordo com as instruções do kit de extração de ácido nucléico.

② Amostragem: Adicione 5µL do ácido nucleico da amostra de teste, 5µL controle positivo, 5µL controle positivo fraco e 5µL de controle negativo ao tubo de reação de PCR preparado acima e certifique-se que o volume final é de 25µL / tubo, feche bem a tampa do tubo e centrifugue imediatamente.

3. Detecção de amplificação por PCR (área de amplificação de ácido nucleico)

① Coloque o tubo de reação de PCR em um instrumento de PCR quantitativo de fluorescência para detecção de amplificação.

② Configuração de parâmetros de ciclo.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1 Transcrição reversa	50°C	15 min	1 ciclo
2 Predenaturação	95°C	5 min	1 ciclo
3 Desnaturação Recozimento / Extensão / Detecção de Fluorescência	95°C 55°C	15s 40s	45 ciclos

Instrução:

① Na etapa 3, configure a detecção de fluorescência a 55 ° C.

② A calibração ROX não está selecionada para o instrumento de PCR fluorescente ABI7500 e "Nenhum" foi selecionado para o grupo de extinção.

4. Configuração de parâmetros de análise de resultados

Ver.1

Configuração de limite: ajuste o valor inicial, o valor final e o valor limite da linha de base de acordo com a imagem após a análise (o valor inicial é recomendado para ser definido em 3-15, o valor final é recomendado para ser definido em 5-20, e (a curva de amplificação do controle negativo deve ser ajustada para reta ou abaixo da linha limite), clique em "Análise" para obter automaticamente os resultados da análise e visualize os resultados na interface do "Relatório".

[Corte positivo]

Um total de 356 amostras conhecidas foram testadas. O ponto de corte positivo para Influenza A é determinado como valor CT = 40 através da curva de característica de operação do receptor (ROC), com sensibilidade de 100% e especificidade de 99,0%. O ponto de corte positivo do Influenza B é determinado como valor CT = 39, a sensibilidade é 100% e a especificidade é 98,4%.

[Interpretação dos resultados do teste]

1. Padrões de controle de qualidade

Os requisitos a seguir devem ser atendidos no mesmo experimento ao mesmo tempo, caso contrário, este experimento será inválido.

Canal de Fluorescência	Canal FAM (FLuA)	Canal VIC (FLuB)	Canal ROX (Referência interna)
Nome do Controle			
Controle negativo	UNDET	UNDET	UNDET
Controle positivo	CT≤30	CT≤30	CT≤30
Controle positivo fraco	CT≤36	CT≤36	CT≤36

2. Interpretação dos resultados

① As análises e interpretações dos resultados de detecção da amostra de teste são realizadas quando o instrumento está normal e os resultados do teste do controle positivo, controle positivo fraco e controle negativo atendem aos padrões de controle de qualidade.

② Interpretação positiva: as condições para a interpretação dos seguintes resultados devem ser estabelecidas canal ROX CT ≤ 40.

a: canal FAM CT ≤ 40, positivo para vírus influenza A; b: canal VIC CT ≤ 39, positivo para vírus influenza B;

③ É interpretado como negativo quando canal FAM ou canal VIC CT não tem valor, padrão interno CT ≤ 40, e a amostra está abaixo do limite de detecção.

④ Reteste: o resultado é interpretado como na área cinzenta experimental se o canal FAM CT > 40 e o padrão interno CT ≤ 40, e a amostra deve ser retestada. O resultado será interpretado como positivo para Influenza A se os resultados do reteste forem consistentes com o anterior; será interpretado como negativo para Influenza A se não houver valor e o padrão interno CT ≤ 40. O resultado será interpretado como na área cinzenta experimental se o canal VIC CT > 39 e o padrão interno CT ≤ 40, e a amostra deve ser reexaminada. Será interpretado como positivo para Influenza B se os resultados do reteste forem consistentes com o anterior. Se não houver valor CT e o padrão interno CT ≤ 40, o resultado será considerado negativo para o vírus influenza B.

[Limitações do método de teste]

1. Os resultados do teste deste kit são apenas para referência clínica, e o diagnóstico clínico e o tratamento dos pacientes devem ser considerados de forma abrangente em conjunto com seus sintomas / sinais, histórico médico, outros testes laboratoriais e respostas ao tratamento.

2. Análise de resultados falsos negativos:

① Coleta, transporte e processamento de amostras não razoáveis e baixos títulos de vírus na amostra podem levar a resultados falsos negativos.

② A mutação da sequência alvo do vírus influenza ou a alteração da sequência causada por outros motivos podem levar a resultados falsos negativos.

③ Para um novo tipo repentino de vírus influenza A, o tipo de amostra mais adequado para detecção e o melhor tempo de amostragem após a infecção podem não ter sido confirmados. Portanto, a coleta de amostras de vários locais no mesmo paciente reduzirá a possibilidade de resultados falsos negativos.

3. A sequência de ácido nucleico a ser testada pode aparecer no corpo por um longo tempo, independentemente da atividade do vírus. Um teste de ácido nucléico positivo não significa necessariamente que você esteja infectado com o vírus correspondente ou que ele seja o fator causador dos sintomas clínicos

[Índice de desempenho do produto]

1. O limite de detecção mais baixo: 1×10^3 cópias / mL.

2. O status de conformidade do produto de referência nacional do vírus influenza A / B influenza (370006) é o seguinte:

① A taxa de coincidência de 6 produtos de referência positivos foi de 100%;

② A taxa de coincidência de 6 produtos de referência negativos foi de 100%;

③ Os produtos de referência de precisão CV1 e CV2 são repetidos 10 vezes, respectivamente, e o CV não é superior a 5,0%;

④ Produto de referência para o menor limite de detecção;

Nº	Título de vírus	Resultado dos testes
S1	2.1×10^2 TCID ₅₀ /L	Influenza B positivo, Influenza A negativo
S2	2.0×10^2 TCID ₅₀ /L	Influenza B positivo, Influenza A negativo
S3	2.5 TCID ₅₀ /L	Influenza A positivo, Influenza B negativo
S4	1.0×10^2 TCID ₅₀ /L	Influenza A positivo, Influenza B negativo
S5	9.8 TCID ₅₀ /L	Influenza A positivo, Influenza B negativo

3. Taxa de coincidência de produtos de referência positivos / negativos dentro da empresa: a taxa de coincidência de 6 produtos de referência positivos 100%; a taxa de coincidência de 6 produtos de referência negativos foi de 100%.

4. A mesma referência de precisão é detectada por 20 dias, 2 pessoas com reagentes de 3 lotes e indica que os CVs de precisão intra-ensaio e inter-ensaio; precisão intra-dia e inter-dia; precisão intra-operador e inter-operador ; intra-laboratorial e interlaboratorial não são superiores a 5,0%.

5. Reação cruzada: não há reação cruzada para vírus que podem apresentar reação cruzada com amostras de vírus influenza A / B (adenovírus tipo 3, adenovírus tipo 7, coronavírus humano, citomegalovírus, enterovírus, vírus parainfluenza humano tipo 1/2/3, vírus do sarampo , metapneumovírus humano, vírus da caxumba, vírus sincicial respiratório, rinovírus) e outros patógenos (*Bacillus*

pertussis, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*).

6. Teste de interferência: A validação é realizada para substâncias interferentes endógenas como hemoglobina 500mg/dL, mucina $\leq 0,9$ mg/mL, glóbulo branco 1×10^{10} /L, sangue humano 50%; e substâncias interferentes exógenas como benzocaina 5µg/mL, epinefrina 0,96mg/L, oximetazolina 0,345mg/L, solução de cloreto de sódio contendo conservante 0,1mg/mL, beclometasona 0,65mg/L, dexametasona 0,5mg/L, flunisolida 0,43mg/L, budesonida 0,2mg/L, mometasona 100µg/L, fluticasona 200ng/mL, enxofre 0,5 g/L , *Thryallis glauca* 0,2 g/L, triancinolona 45 µg/mL, mentol 32 µg/L, zanamivir 142 ng/mL, mupirocina 4,49 mg/L, tobramicina 4µg/mL e não há interferência com a detecção do kit.

7. Desempenho clínico: Ensaios clínicos concluídos de 650 amostras em quatro instituições clínicas, em comparação com produtos semelhantes já no mercado. A taxa de coincidência positiva para o Influenza A foi de 99,37%, a taxa de coincidência negativa foi de 99,80% e a taxa de coincidência total 99,69%; a taxa de coincidência positiva para o Influenza B foi de 100%, a taxa de coincidência negativa foi de 99,60% e a taxa de coincidência total foi de 99,69%.

[Precauções]

1. Antes de testar, você deve ler este manual cuidadosamente e operar em estrita conformidade com os requisitos.

2. Este kit é um reagente de diagnóstico in vitro e a operação requer um certo grau de profissionalismo, e o operador deve ser treinado profissionalmente.

3. O ácido nucléico do patógeno detectado por este kit é o RNA, e todos os consumíveis usados durante a operação não devem conter DNase e RNase.

4. As operações laboratoriais são realizadas de acordo com as "Measures for the Administration of Clinical Gene Amplification Testing Laboratories in Medical Institutions". A operação do experimento deve ser realizada nas áreas correspondentes, e os instrumentos, equipamentos, consumíveis e roupas de trabalho utilizados em cada área não devem ser intercambiáveis, para evitar contaminação.

5. Os componentes dos diferentes números de lote do kit não podem ser usados de forma intercambiável. Cada componente deve ser descongelado à temperatura ambiente antes do uso, agitado e misturado completamente e centrifugado imediatamente antes do uso.

6. Evite gerar bolhas quando a solução de reação for dividida em alíquotas e preste atenção para verificar se cada tubo de reação está bem tampado antes de usar a máquina.

7. Após o experimento, a bancada deve ser limpa a tempo e desinfetada com hipoclorito de sódio 10%, álcool 75% e luz ultravioleta.

8. As amostras de teste envolvidas no kit devem ser consideradas infecciosas e todas as operações laboratoriais devem cumprir as

"Diretrizes Gerais para Biossegurança de Laboratórios de Microbiologia Patogênica"; o tratamento de resíduos médicos deve ser gerenciado de acordo com os "Regulamentos de Gerenciamento de Resíduos Médicos".



Fabricado por: Shanghai BioGerm Medical Technology Co., Ltd Address: Room 1302, 1303, 1304, 1304, 1305, 1306, 1307, 1309, Building 3, No. 1588 Huhang Highway, Fengxian District, Shanghai,China.

Importado por: CPMH - Comércio e Indústria de Produtos Médico-Hospitalares e Odontológicos LTDA. CNPJ: 13.532.259/0001-25. Endereço: SIA TRECHO 17 VIA IA-4 LOTE 1235 PARTE 03 - ZONA INDUSTRIAL (GUARA) CEP: 71.200-260 - BRASÍLIA/DF. Telefone: (61) 3233-3396. AFE ANVISA nº 8.08.598-4. Responsável Técnico: RANDE PEREIRA AVELAR CRO/DF: 5476. Registro ANVISA nº: 80859840215.