

### 1. NOME COMERCIAL

KIT BIOMOL OneStep/COVID-19.

### 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)

+55 (41) 3316-3221 / +55 (41) 3316-3280

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

### 3. APRESENTAÇÃO

Kit de amplificação de ácidos nucleicos com total de 96 determinações (94 amostras e 2 controles).

### 4. FINALIDADE

Teste molecular para detecção de presença ou ausência de ácidos nucleicos do novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em amostras swab de naso e orofaringe de pacientes suspeitos de infecção e meios de manutenção viral. Produto destinado a auxílio no diagnóstico de pacientes com suspeita de infecção. Não consiste em método de determinação diagnóstica.

**PRODUTO PARA USO EXCLUSIVO EM PESQUISA**

### 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 armazenamento do produto deve ser feito entre -30 e -15°C. O transporte do produto deve ser feito em temperatura refrigerada (-4°C sem que ultrapasse 20°C) por no máximo 07 dias sem que a qualidade do produto seja afetada.

#### 6.1. Estabilidade do produto em uso

O Kit não deve passar por mais de 10 ciclos de congelamento e descongelamento, podendo ter seu desempenho afetado. Reagentes líquidos reconstituídos devem ser utilizados assim que reconstituídos, caso não seja possível, armazenar a 4°C por no máximo uma semana.

### 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O KIT BIOMOL OneStep/COVID-19 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 causador de COVID-19 através de dois alvos: região conservada ORF 1ab e região da proteína do nucleocapsídeo N.

A detecção da presença de ácidos nucleicos do patógeno é feita pelo uso de sondas (oligonucleotídeos marcados com fluorescência) específicas para cada alvo molecular.

O kit apresenta em sua composição um controle interno de reação o qual é analisado amostra a amostra e possui como alvo um gene endógeno humano que permite monitorar o desempenho do processo de detecção do RNA viral de sua extração até sua detecção final pelo equipamento. 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.

Além do controle interno, o kit contém um controle negativo (NTC - Água) e um controle positivo (plasmídeo - derivado de OGM classe I) para avaliação de seu desempenho. Os controles negativo e positivo devem ser analisados em reações separadas das reações destinadas às amostras.

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 swab de naso e orofaringe ou meio de manutenção viral.

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

Cuidados com as amostras de pacientes:

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina. Caso haja necessidade de armazenamento das amostras coletadas, mantê-las entre -15 e -30°C por no máximo 03 meses ou a temperaturas inferiores a -70°C por períodos superiores a 03 meses.

Ciclos de congelamento e descongelamento de amostras devem ser evitados para que o RNA viral não seja degradado.

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 -60°C e -80°C.

### 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O KIT BIOMOL OneStep/COVID-19 é composto por:

- 01 frasco contendo mix de enzimas liofilizado (NCK013-F100-E).
- 01 microtubo contendo 100 µL de mistura de iniciadores e sonda (NCK013-P).
- 01 microtubo contendo 400 µL de tampão 5X para o mix de enzimas (NCK013-B).
- 01 microtubo contendo 90 µL de Controle Positivo (NCK013-PC).
- 01 microtubo contendo 90 µL de Controle Negativo (NCK013-NC).
- 01 microtubo contendo 1100 µL de Água RNase free.

### 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.
- Centrífuga para microplacas.
- Centrífuga para microtubos.
- Cabine de segurança biológica.
- Agitador tipo vortex.
- Equipamentos de PCR em tempo real recomendados: 7500 Fast e 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

### 10. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

#### 10.1. Ressuspensão do mix de enzimas liofilizado

**Importante:** Descongelar os reagentes a temperatura ambiente e centrifugá-los (*spin*).

- Ressuspender o mix de enzima liofilizada em 400 µL do tampão de 5X.
- Adicionar 100 µL da mistura de iniciadores e sondas (*Primer - Probe Mix*).
- Adicionar 1000 µL de água RNase Free, homogeneizar gentilmente com uma micropipeta realizando 2 a 3 ciclos de pipetagem. Evitar a formação de bolhas durante a ressuspensão.
- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos antes da utilização.
- A mistura de reação preparada desta forma pode ser utilizada por até uma semana quando armazenada a 4 °C.

#### 10.2. Preparo da mistura de reação

- Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo da mistura de reação, distribuir **15,0 µL** em cada poço da placa. Incluir um poço para análise do controle negativo e um poço para análise do controle positivo.
- 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.
- Adicionar **5,0 µL** do Controle Positivo no poço correspondente.
- Adicionar **5,0 µL** de Controle Negativo no poço correspondente.
- Selar a placa com adesivo ótico e proceder com breve centrifugação (*spin*).

#### 10.3. PCR em tempo real

- Configurar no software do equipamento, conforme desenho de placa estabelecido, as amostras, o controle negativo e o controle positivo.
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 01:

Tabela 01: Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo
ORF-1ab (SARS-CoV-2)	FAM
N gene (SARS-CoV-2)	HEX/VIC
Controle Interno	ROX

- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 02:

Tabela 02: Parâmetros de ciclagem da reação de PCR para serem inseridos na programação da corrida.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
Transcrição reversa	50	15 minutos	01
Desnaturação inicial do cDNA	95	3 minutos	01
Desnaturação Anelamento	95	15 segundos	40
	55*	40 segundos	
Resfriamento do equipamento	25	10 segundos	01

Legenda: \*Captura de fluorescência.

- Selecionar a referência passiva ou interna do equipamento como "None".
- Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

## 11. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 11.1. Parâmetros de análise dos resultados

Os parâmetros de análise devem ser ajustados conforme na Tabela 03.

Tabela 03: parâmetros de análise de resultados.

Parâmetro	ORF1ab (FAM)	gene N (HEX/VIC)	Controle Interno (ROX)
Threshold	30.000	40.000	20.000
Baseline	5 - 15	5 - 15	5 - 15

### 11.2. Interpretação dos resultados

#### Controle Positivo (CP):

- O poço de CP deve apresentar amplificação para os três alvos avaliados ORF-1ab (SARS-CoV-2) - FAM, N gene (SARS-CoV-2) - HEX/VIC e Controle Interno - ROX com Cts  $\leq$  35.

#### Controle Negativo (CN):

- O poço de CN não deve apresentar amplificação para três alvos avaliados ORF-1ab (SARS-CoV-2) - FAM, N gene (SARS-CoV-2) - HEX/VIC e Controle Interno - ROX.

**Observação:** Para que a análise seja válida, os critérios de aceitação para o controle positivo e para o controle negativo devem ser atendidos em todas as corridas.

#### Amostras:

- Para os alvos ORF1ab e gene N, ampliações até o Ct 40 são válidas.
- Interpretação conforme resultados apresentados na Tabela 04:

Tabela 04: Critérios de classificação para amostras avaliadas.

Resultado para SARS-CoV-2	ORF1ab (FAM)	Gene N (HEX/VIC)	Controle Interno (ROX)	CP	CN
Detectável	+	+	+/-	+	-
Detectável*	+	-*	+/-	+	-
Não detectável	-	-	+	+	-
Não detectável**	-**	+	+/-	+	-
Inválido	+	+	+	+	+
Inválido	-	-	-	-	-

Legenda: + Curva de amplificação característica;  
- Ausência de curva de amplificação característica;

#### Observações:

\* Repita a extração e teste novamente a amostra. Caso o alvo "gene N" permaneça negativo, e amplificação de ORF1ab acontecer com Ct igual ou inferior a 30 a interpretação é SARS-CoV-2 detectável.

\*\* Repita a extração e teste novamente a amostra. Caso o alvo "ORF1ab" permaneça negativo, a interpretação é SARS-CoV-2 não detectável (possível infecção por outro(s) coronavírus).

### 11.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora de critério de classificação

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
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

## 12. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- Kit destinado para uso em pesquisa, não possui como objetivo o diagnóstico *in vitro*.
- Procedimentos de coleta, transporte e processamento de amostras inadequados podem gerar resultados falsos-negativos.
- Armazenamento inadequado dos reagentes também pode acarretar 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 as instruções de uso do produto.

## 13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Especificidade Analítica:

- Não apresenta reações cruzadas para os seguintes coronavírus analisados (número de amostras testadas): NL63 (9), HKU1 (2), 229E (3), OC43 (7).
- Não foi verificada reação cruzadas frente a amostras positivas para os seguintes patógenos (e número de amostras testadas): Adenovirus (5), Bocavirus humano (6)\*, *Chlamydia pneumoniae* (1), Enterovirus (1), *Haemophilus influenzae* (1), Influenza A (1), Influenza B (FLUB) Victoria (1), Influenza B (FLUB) Yamagata (6), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Legionella pneumophila* (1), Metapneumovirus (5), *Mycoplasma pneumoniae*, Pertussis, *Pseudomonas aeruginosa*, Rinovirus (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Streptococcus pneumoniae* (1), Vírus Parainfluenza Tipo 1 (5), Vírus Parainfluenza Tipo 2 (4), Vírus Parainfluenza Tipo 3 (2), Vírus sincicial respiratório (5).

\* Uma das amostras clínicas de Bocavirus humano dentre as seis testadas apresentou amplificação do alvo ORF-1ab e ausência de amplificação do alvo N gene.

**Sensibilidade Analítica:** Com uma confiança de 95% os limites de detecção são  $\leq$  6 cópias/reação para o alvo ORF-1ab e  $\leq$  4 cópias/reação para o alvo Gene N.

**Desempenho Diagnóstico:** A caracterização do desempenho diagnóstico do teste foi realizada utilizando um painel de 75 amostras clínicas de swab de orofaringe, das quais 10 foram identificadas como sendo positivas para o SARS-CoV-2 e 65 foram caracterizadas como infectadas por outros vírus respiratórios pelo Laboratório Central do Paraná.

		Referência (LACEN/PR)		Total
		Positivo	Negativo	
IBMP OneStep/COVID-19	Detectado	10	1	11
	Não-Detectado	0	64	64
Total		10	65	75

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 100% e especificidade diagnóstica de 98%. A taxa geral de concordância foi de 98,7%.

## 14. 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.

## 15. 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.

- Deve-se utilizar áreas específicas para as etapas de preparo de mistura de PCR, distribuição de RNA e amplificação, para que sejam evitadas contaminações cruzadas.
- Consumíveis de laboratório não devem ser reutilizados.
- Deve-se utilizar equipamento de proteção individual (EPI) como luvas e jalecos descartáveis. Luvas devem ser trocadas regularmente para evitar contaminação cruzada.
- A manipulação de amostras deve ser realizada em cabines de segurança biológica de classe II certificadas em laboratórios com nível de Biossegurança NB-2.

