

### 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

SAC 0800 400 4267 | +55 41 3165 4247

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

[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.

### PRODUTO PARA 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 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 entre -35°C e -80°C.

### 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 em 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 1100 µL de Água RNase Free
- 01 frasco contendo 450 µL de Tampão de Ressuspensão
- 01 frasco contendo 110 µL de Oligomix
- 01 frasco contendo 50 µL de Controle Positivo
- 01 frasco contendo 50 µL de Controle Negativo
- 01 frasco para 96 reações de Mix/RT (liofilizado)

#### 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 vórtex.
- Equipamentos de PCR em tempo real recomendados: 7500 Fast e 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).
- Kit para extração de RNA viral QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

### 10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Recomenda-se o uso do módulo uma única vez, onde foi observado um desempenho ótimo de amplificação. Quando o mix é ressuspenso e não consumido em sua totalidade de uma só vez, recomenda-se utilizar o produto no máximo até o terceiro dia após a reconstituição.

### 11. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

Alvo	Fluoróforo	Quencher
ORF1ab (SARS-CoV-2)	FAM	NFQ-MGB
N gene (SARS-CoV-2)	HEX/VIC	NFQ-MGB
Controle Interno	ROX	NFQ-MGB

- 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	Temp. (°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.

### 12. ANÁLISE DOS RESULTADOS

#### 12.1. 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

## 12.2. 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	+	+	-	+	-
Detectável	+	-	+	+	-
Detectável	+	-	-	+	-
Detectável	-	+	+	+	-
Detectável	-	+	-	+	-
Não detectável	-	-	+	+	-
Inválido	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Inválido	+/-	+/-	+/-	-	+/-

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

### 12.2.1. 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

## 13. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- 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.

Obs: Para que os resultados deste teste sejam garantidos, deve-se seguir as instruções de uso do produto.

## 14. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Especificidade Analítica

Não foi verificada reação cruzada frente a amostras positivas para os seguintes patógenos (e número de amostras testadas): Coronavírus cepas: NL63 (9), OC43 (6), HKU1 (2), 229E (3); Adenovírus (5), Bocavírus humano (4), Influenza B (FLUB) Victoria (1), Influenza B (FLUB) Yamagata (6), Metapneumovírus (5), Rinovírus (3), Vírus Parainfluenza Tipo 1 (5), Vírus Parainfluenza Tipo 2 (4), Vírus Parainfluenza Tipo 3 (2), Vírus sincicial respiratório (5).

Pode apresentar reações cruzadas para coronavírus OC43, amplificação de 1 amostra entre 7 amostras avaliadas e; Bocavírus humano, amplificação de 2 amostras entre 6 amostras avaliadas.

**Sensibilidade Analítica:** Com uma confiança de 95% os limites de detecção são  $\leq$  6,363 cópias/reação para o alvo N e  $\leq$  18,705 cópias/reação para o alvo ORF1ab. Com relação a quantidade de cópias do vírus/ $\mu$ L de amostras, os resultados obtidos representam  $LoD_{95\%}$  de 1,27 cópias/ $\mu$ L (alvo N) e 3,74 cópias/ $\mu$ L (alvo ORF1ab), uma vez que são adicionados 5  $\mu$ L de amostras por reação.

**Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica:** A caracterização do desempenho diagnóstico do teste foi realizada utilizando um painel de 240 amostras clínicas de swab de orofaringe, das quais 163 negativas e 77 positivas para o SARS-CoV-2. O kit BIOMOL OneStep/COVID-19 identificou, dessas 240 amostras, 143 amostras como negativas e 97 amostras como positivas. O resultado de concordância do kit BIOMOL OneStep/COVID-19 frente a referência foi de 92%. A sensibilidade diagnóstica foi de 100%, uma vez que as 77 amostras positivas para SARS-CoV-2 apresentaram amplificação de acordo com o perfil estabelecido para este kit. A especificidade diagnóstica foi de 88%, uma vez que das 163 amostras negativas, 143 apresentaram amplificação somente do gene controle humano, indicando que a amostra é negativa. Por outro lado, o teste foi capaz de detectar SARS-CoV-2 em 20 amostras caracterizadas previamente como negativas. Cabe mencionar que todas as amostras são provenientes de pacientes com suspeita de COVID e infecção por SARS-CoV-2.

**Precisão:** Para todas as amostras que apresentaram ampliações dos alvos ORF1-ab e Gene N (alvos específicos para SARS-CoV-2) o desvio padrão relativo (DPR%) entre todas as réplicas analisadas não ultrapassaram os 10% do critério de aceitação, conforme esperado.

**Exatidão:** Ao avaliar a proximidade dos resultados obtidos pelos testes de precisão de medição entre analistas, foi verificado que

todos os resultados foram satisfatórios, por estarem dentro do critério de aceitação de 90% a 110%.

## 15. 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.

## 16. 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.
- A coleta de amostras deve ser realizada por profissionais treinados e após extraída deve ser armazenada em condições que mantenham sua estabilidade até o momento de execução do teste.
- 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.
- O produto foi validado usando kit extração de RNA viral QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), seguindo estritamente os protocolos recomendados pelos respectivos fabricantes.
- Devem ser utilizados equipamentos de medição (micropipetas) calibrados e o equipamento de PCR em tempo real deve ser calibrado e qualificado.
- O fabricante não garante os resultados obtidos, caso o produto não seja armazenado nas condições descritas nessa instrução.
- 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.
- O Controle Positivo deve ser manuseado com cuidado para evitar a contaminação das amostras avaliadas.