

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)

sac@ibmp.org.br | 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 em meios de manutenção viral e saliva de pacientes suspeitos de infecção. 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 ORF1ab 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 e amostras de saliva.

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.

As amostras de saliva devem ser coletadas conforme WANG et al., 2004 e TO et al., 2020.

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, 7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5, QuantStudio 6 e QuantStudio 7 (Thermo Fisher Scientific®), LineGene 9600 (Bioer), CFX96 (Bio-Rad), LightCycler 480 (Roche) e IntelliQube (Biosearch Technologies).
- 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 ressuspensão 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

O procedimento abaixo se aplica aos instrumentos validados das séries 7500, QuantStudio, CFX96 e LineGene. As reações para o IntelliQube devem ser adaptadas para as condições do equipamento, conforme instruções no item 11.4, enquanto as reações para o LightCycler 480 no item 11.5.

11.1. Ressuspensão do mix de enzimas liofilizado

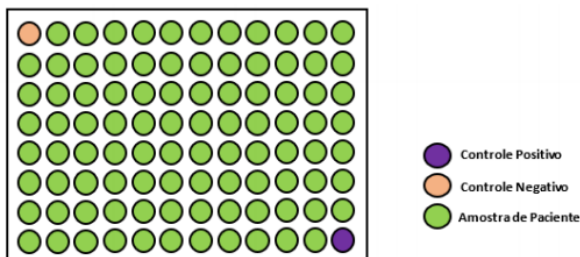
Importante: Descongelar os reagentes a temperatura ambiente e centrifugá-los (*spin*).

- Ressuspender o mix de enzima liofilizada em 400 µL do tampão de 5X.
- Adicionar 100 µL da mistura de iniciadores e sondas.
- 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.

11.2. 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*).
- Sugestão de modelo de placa



Obs: Para equipamentos em que se utilizam placas diferentes de 96 poços, ajustar os volumes proporcionalmente ao protocolo.

11.3. 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	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.

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

Legenda: *Captura de fluorescência.

** Esta etapa deve ser desconsiderada em corridas do IntelliQube.

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

11.4. Considerações para a utilização do kit com o IntelliQube

O kit é compatível com a plataforma semiautomatizada IntelliQube. Porém, é necessário adaptar o protocolo para obter reações equivalentes às obtidas com os demais instrumentos:

- Devido ao volume reduzido de amostra utilizado, recomenda-se avaliar cada amostra e cada controle em duplicatas. Nesta configuração, cada *array tape* de 768 poços pode avaliar 4 placas de amostras. Os reagentes fornecidos são suficientes para três *array tapes* de 768 poços completos;
- Preparo da mistura de PCR (exclusivamente para o IntelliQube) a mistura de reação deve ser preparada misturando o mix liofilizado com 400 µL de tampão, 500 µL de água e 100 µL de oligomix. Este mix deve ser dispensado nos poços da placa de ensaio conforme esquema gerado pelo software Intellicis;
- Na ciclagem, utilizar os passos descritos na tabela 02, exceto a etapa final a 25°C, que é incompatível com o Instrumento e não deve ser incluída. Incluir este passo pode gerar um erro que acarreta a perda dos dados obtidos da corrida;
- Para interpretação, considerar a reação como positiva para cada alvo se pelo menos uma das replicatas apresentar amplificação no canal correspondente. O resultado para cada amostra deve ser interpretado conforme a tabela 04.

11.5. Considerações para a utilização do kit com o LightCycler 480

Para a utilização do kit Biomol OneStep/COVID-19 com o instrumento LightCycler 480 são necessárias as seguintes adaptações:

- O volume final validado para as reações nesta plataforma é de 10 µL (7 µL de mistura de PCR + 3 µL RNA, CP ou CN). Desta forma, a mistura preparada conforme o item 11.1 é suficiente para aproximadamente 200 reações;
- A utilização do LightCycler 480 requer a compensação de fluorescência (color compensation). Esta compensação deve ser feita as sondas nos canais FAM, ROX e VIC separadamente, conforme instruções do manual de operação do equipamento;
- No software do equipamento, deve-se selecionar a opção Fit Points para o cálculo do Ct;
- A ciclagem, os parâmetros de análise e a interpretação dos resultados podem seguir as instruções das tabelas 02, 03 e 04, respectivamente.

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.

Equipamento	Parâmetro	ORF1ab (FAM)	gene N (HEX/VIC)	Controle Interno (ROX)
Applied Biosystems 7500/7500 FAST Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5/6/7 Real-Time PCR System	Threshold	30.000	40.000	20.000
	Baseline	5 - 15	5 - 15	5 - 15
CFX96™ RealTime PCR Detection System	Threshold	30	50	40
	Baseline	auto*	auto	auto
LineGene 9600	Threshold	auto	auto	auto
	Baseline	5 - 15	5 - 15	5 - 15
IntelliQube	Threshold	0,05	0,05	0,05
	Baseline	3 - 15	3 - 15	3 - 15
LightCycler 480**	Threshold (Noiseband)	auto	auto	auto
	Baseline	NA	NA	NA

* Caso a curva fique deformada, é necessário o ajuste manual do baseline para 2-20, especificamente para o poço em questão.

** Parâmetros ajustados automaticamente após a compensação de fluorescência (ver item 11.5)

12.2. Interpretação dos resultados

Controle Positivo (CP):

- O poço de CP deve apresentar amplificação para os três alvos avaliados ORF1ab (SARS-CoV-2) - FAM, N gene (SARS-CoV-2) - HEX/VIC e Controle Interno - ROX com Cts ≤ 35.

Controle Negativo (CN):

- O poço de CN não deve apresentar amplificação para três alvos avaliados ORF1ab (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/ μ L de amostras, os resultados obtidos representam $LoD_{95\%}$ de 1,27 cópias/ μ L (alvo N) e 3,74 cópias/ μ L (alvo ORF1ab), uma vez que são adicionados 5 μ 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 amplificações dos alvos ORF1ab 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%.

O resultado comparativo entre o método de referência (swab nasofaríngeo) e aqueles obtidos a partir das amostras de saliva apresentaram concordância de 96%, sensibilidade diagnóstica de 92% e especificidade diagnóstica de 98%.

		Referência (swab nasofaríngeo)		Total
		Positivo	Negativo	
Saliva	Detectado	216	13	229
	Não-Detectado	19	568	587
Total		235	581	816

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 regulamente 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.