

BIO GENE

COVID-19 PCR

Instruções de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

REF K228-1

Revisão: Abril/2020

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Finalidade | 3 |
| Princípio de Ação | 3 |
| Apresentação | 3 |
| Reagentes | 4 |
| Equipamentos e Insumos Operacionais..... | 4 |
| Condições de Armazenamento e Transporte | 4 |
| Cuidados Especiais | 4 |
| Amostras | 5 |
| Procedimento | 6 |
| A. Extração do RNA | 6 |
| B . Preparo dos Reagentes | 6 |
| C . Diluição do Padrão Quantitativo | 7 |
| D . Preparo da PCR | 7 |
| E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real | 9 |
| F . Validação do Resultado | 10 |
| G . Interpretação do Resultado | 12 |
| Limitações do Processo | 13 |
| Desempenho do Produto / Controle de Qualidade | 13 |
| Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica | 13 |
| Repetibilidade | 13 |
| Reprodutibilidade | 14 |
| Sensibilidade Clínica | 14 |
| Sensibilidade Analítica | 14 |
| Linearidade | 14 |
| Significado Diagnóstico | 15 |
| Referências Bibliográficas | 15 |
| Atendimento ao Consumidor | 15 |
| Simbologia Universal | 16 |

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do RNA do vírus SARS-CoV-2 (COVID-19) através da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene COVID-19 PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do RNA do vírus COVID-19 através RT-PCR em tempo real.

O método de RT-PCR em Tempo Real é usado para amplificar o RNA do patógeno.

Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração de RNA do vírus COVID-19, expressa em cópias/ μL , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

| Reagente | Apresentação |
|-----------|-------------------------|
| | 100 Testes |
| R1 | 1 x 110 μL * |
| R2 | 1 x 110 μL * |
| R3 | 4 x 600 μL * |
| R4 | 2 x 1,5 mL |
| R5 | 1 x 500 μL * |
| R6 | 1 x 1,5 mL |
| R7 | 1 x 2 mL |
| R8 | 1 x 150 μL |
| R9 | 1 x 110 μL * |

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

- R1. Solução PCR E:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R2. Solução PCR RdRp: Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R3. Mix Taq: Polimerase, dNTPs, MgCl₂, Estabilizantes.
R4. Tampão Mix: TRIS-HCl.
R5. Padrão A (2 x 10⁵ cópias/μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
R6. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.
R7. Água: Água livre de DNase/RNase.
R8. Controle Negativo: TRIS-HCl, EDTA.
R9. Solução PCR Endógeno: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador de PCR em Tempo Real).
- 2- Capela de fluxo laminar.
- 3- Tubos de centrífuga de 1,5 mL.
- 4- Tubos ou placas para reação de PCR.
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 6- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtex.
- 8- Micropipetas e ponteiras estéreis com filtro (0,5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento.

O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais

utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a ampliação/detecção de produtos amplificados. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

8- Armazenar as amostras de RNA a -20°C , caso não forem utilizadas imediatamente.

9- Não usar o kit após a data de validade.

10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de RNA extraídas de escarro, de swab de nasofaringe ou de orofaringe. Outros tipos de amostras podem ser utilizadas de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório. As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por até 3 dias¹.

RNA (extraído): Utilizar amostras de RNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas.

Para longo tempo de armazenamento, recomenda-se congelar as amostras a -70°C. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do RNA

Os ácidos nucleicos (RNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido.

B. Preparo dos Reagentes

OBS.: O reagente **R5** contém molde de RNA/DNA. Ele deve ser manipulado (ressuspendido) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes: **Solução PCR E (R1)**, **Solução PCR RdRp (R2)**, **Padrão A (R5)** e **Solução PCR Endógeno (R9)** antes da abertura dos microtubos.

2- Ressuspende cada frasco do reagente **Mix Taq (R3)*** com 600µL do reagente **Tampão Mix (R4)**.

Ressuspende os frascos de **Mix Taq (R3) conforme necessidade de uso.*

3- Ressuspende os reagentes, **Solução PCR E (R1)**, **Solução PCR RdRp (R2)** e **Solução PCR Endógeno (R9)** com o reagente **Água (R7)** de acordo com a tabela abaixo:

| Reagente | Apresentação |
|------------------------------------|--------------|
| | 100 Testes |
| Solução PCR E (R1) | 110 µL |
| Solução PCR RdRp (R2) | 110 µL |
| Solução PCR Endógeno (R9) | 110 µL |

C. Diluição do Padrão Quantitativo

- 1- Ressuspender o **Padrão A (R5)** com 500 μ L do **Diluyente (R6)**.
- 2- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R5)**.
- 3- Pipetar 90 μ L do **Diluyente (R6)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 4- Em seguida, pipetar 10 μ L do **Padrão A (R5)** no microtubo B e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10 μ L do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 6- Trocar a ponteira e pipetar 10 μ L do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 7- No final da diluição temos padrão A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A - 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B - 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C - 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D - 2×10^2 cópias/ μ L

D. Preparo da PCR

ATENÇÃO: Os reagentes **Solução PCR E (R1)** e **Solução PCR RdRp (R2)** apresentam a mesma sonda (FAM). Logo, para cada amostra, deve ser preparada 2 reações individuais, uma reação para teste de E e outra reação para o RdRp.

A **Solução PCR Endógeno (R9)** apresenta sonda VIC e volume suficiente para realização de 100 reações, logo a mesma deve ser utilizada na reação para o teste de E.

- 1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, Controles e Padrões Quantitativos a serem analisados.

D1. Preparo da PCR para o gene E e para o Controle Endógeno

1- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

| Reagentes | 1 reação | 25 reações | 50 reações | 100 reações |
|---------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Mix Taq (R3) | 10 μ L | 250 μ L | 500 μ L | 1mL |
| Solução PCR E (R1) | 1 μ L | 25 μ L | 50 μ L | 100 μ L |
| Solução PCR Endógeno (R9) | 1 μ L | 25 μ L | 50 μ L | 100 μ L |
| Água (R7) | 3 μ L | 75 μ L | 150 μ L | 300 μ L |

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

D2. Preparo da PCR para o gene RdRp sem o Controle Endógeno

1- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

| Reagentes | 1 reação | 25 reações | 50 reações | 100 reações |
|-----------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Mix Taq (R3) | 10 μ L | 250 μ L | 500 μ L | 1mL |
| Solução PCR RdRp (R2) | 1 μ L | 25 μ L | 50 μ L | 100 μ L |
| Água (R7) | 4 μ L | 100 μ L | 200 μ L | 400 μ L |

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

2- Pipetar 15 μ L da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

3- Adicionar 5 μ L do RNA extraído das amostras ou 5 μ L dos Padrões Quantitativos ou 5 μ L do **Controle Negativo (R8)** nos tubos previamente determinados.

4- Homogeneizar bem.

5- Observar que o volume total da reação é de 20µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo e Padrões Quantitativos).

6- Transportar os tubos/placa para o termociclador e seguir o descrito na seção E (Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real).

E. Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Referência Passiva: Equipamentos que utilizam o ROX como referência passiva deve ser programado com a opção “**NONE**” para referência passiva.

| Alvo | Detector | Quencher |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| E | FAM | NFQ-MGB |
| RdRp | FAM | |
| Controle Endógeno | VIC | |

Obs: • Os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Endógeno (VIC), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

• As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores FAM e VIC.

3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como:

Padrão A – 2×10^5 cópias/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/µL

Padrão C – 2×10^3 cópias/µL

Padrão D – 2×10^2 cópias/µL

4- Defina as condições dos ciclos:

| Etapas | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|---------------|--------------------|--------------|---------------|
| 1 | 55°C | 10 minutos | 1 |
| 2 | 95°C | 3 minutos | 1 |
| 3 | 95°C | 15 segundos | 50 |
| | 60°C | 60 segundos | |

Defina "Data Collection" como "stage 3, step 2 (60@0:60)".

F. Validação do Resultado**1- Curva Padrão**

| Curva Padrão | Faixa Permitida | Amplificação / Detecção |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Coefficiente de correlação (R^2) | $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$ | Válida |

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Controle Negativo

| CT Controle Negativo | | Resultado | Amplificação/ Detecção |
|-----------------------------|---------------|------------------|-------------------------------|
| FAM | VIC | | |
| Indeterminado | Indeterminado | Negativo | Válida |

3- Amostras

| COVID-19 | | Resultado | Detecção |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| FAM ¹ (E e RdRp) | VIC ² Controle Endógeno | | |
| Concentração determinada | CT ≤ 35 | Positivo | Válida |
| | CT > 35 | Positivo | Inválido* |
| Concentração indeterminada | CT ≤ 35 | Negativo | Válida |
| | CT > 35 | Negativo | Inválido* |

¹COVID-19

Para diagnóstico positivo de COVID-19 se faz necessário a detecção dos **2 genes alvos** (E e RdRp).

²Controle Endógeno

O valor de CT do Controle Endógeno pode variar de acordo com a quantidade de material biológico presente na amostra extraída.

- O CT baixo indica alta concentração de material biológico na amostra e que o processo de extração foi eficiente.

- O CT alto indica baixa concentração de material biológico na amostra e/ou extração ineficiente.

***OBS:** Os valores de CT do Controle Endógeno também podem variar de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/ RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA do patógeno podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Endógeno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do Resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação. O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

| Resultado da Amostra em Cópias/ μ L (FAM) | Cópias por Reação |
|---|-------------------|
| $\geq 1 \times 10^6$ | > 1.000.000 |
| $2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$ | Quantidade obtida |
| < 2 | < 10 |

A não detecção do RNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

1- Cálculo de conversão para cópias/mL

$$\text{Resultado em Cópias/mL} = \frac{\text{Cópias}/\mu\text{L} \times \text{Volume de eluição } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volume de amostra extraída (mL)}^{**}}$$

*Resultado da quantificação da amostra fornecido pelo equipamento em cópias/ μ L.

**De acordo com protocolo do kit de extração utilizado.

Exemplo: Volume de Eluição: 30 μ L

Volume de Amostra: 200 μ L (0,2 mL)

Quantificação da amostra: 5000 cópias/ μ L

$$\text{Resultado em cópias/mL} = \frac{(5000 \text{ cópias}/\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0,2\text{mL}}$$

$$\text{Resultado em cópias/mL} = 750.000 \text{ cópias/mL}$$

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

Amostras com presença de inibidores de PCR devem ser diluídas para reduzir o seu efeito na reação.

**DESEMPENHO DO PRODUTO
CONTROLE DE QUALIDADE****Exatidão****COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**

O kit **Bio Gene COVID-19 PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do RNA do vírus do COVID-19. Foram realizadas 50 análises e os resultados foram avaliados. Os resultados obtidos, entre os kits avaliados, apresentaram variações inferiores a 0,5 Log. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão**REPETIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas de 2 amostras positivas com concentrações distintas, os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

| | Amostra 1 | Amostra 2 |
|-------------------------------------|------------------|------------------|
| Concentração Média (Log) | 2,71 | 3,63 |
| Desvio Padrão (Log) | 0,07 | 0,10 |
| Coefficiente de Variação (%) | 2,46 | 2,77 |

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos com 1 amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Concentração Média (Log) | 2,71 | 2,69 | 2,75 |
| Desvio Padrão (Log) | 0,07 | 0,10 | 0,07 |
| Coefficiente de Variação (%) | 2,46 | 3,83 | 2,49 |

Sensibilidade Clínica

O kit **Bio Gene COVID-19 PCR** apresentou sensibilidade clínica de 99,9% e especificidade clínica de 99,9%.

| Método | | Dados Clínicos | | Total |
|----------------------------------|------------------|-----------------------|----------|--------------|
| Bio Gene COVID-19 PCR | Resultado | Positivo | Negativo | |
| | Positivo | 24 | 0 | 24 |
| | Negativo | 0 | 26 | 26 |
| RESULTADO TOTAL | | 24 | 26 | 50 |

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 0,061 cópias/ μ L (- 1,21 log), ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 0,305 moléculas alvos em 5 μ L do produto de extração do RNA adicionado a reação de amplificação. Logo a sensibilidade encontrada foi de 18,3 cópias/mL.*

* A sensibilidade pode variar de acordo com o kit de extração utilizado.

Linearidade

A linearidade encontrada nos estudos de performance foi de $1,00 \times 10^5$ cópias/ μ L (5,0 log).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Os Coronavírus (CoV) pertencem a família Coronaviridae, e estão amplamente distribuídos infectando seres humanos e outros mamíferos. Em humanos, os sintomas mais comuns apresentados são febre, tosse, dispnéia, mialgia ou fadiga. Pode causar doenças que variam do resfriado comum a doenças mais graves, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV). Em dezembro de 2019, uma série de casos de pneumonia de causa desconhecida surgiu em Wuhan na China, com sintomatologia clínica muito semelhante à pneumonia viral, após sequenciamento completo das amostras respiratórias foi evidenciado ser infecção por Coronavírus, que foi chamado de novo coronavírus (2019-nCoV). Em aproximadamente 150 países em todos os continentes já foram notificados casos de infecção. Logo, a detecção do COVID-19 por PCR real time, tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Corman VM, Landt O, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
3. Huang C, Wang Y, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506.

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR





















Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bio Gene COVID-19 PCR na ANVISA: 10269360323

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

| | | | |
|---|--|---|--|
|  | NÚMERO DE CATÁLOGO |  | FABRICADO POR |
|  | NÚMERO DO LOTE |  | CONTROLE |
|  | DATA DE FABRICAÇÃO |  | CONTROLE POSITIVO |
|  | DATA DE VALIDADE (último dia do mês) |  | CONTROLE NEGATIVO |
|  | LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a) |  | RISCO BIOLÓGICO |
|  | O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES |  | INFLÁMVEL |
|  | CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO |  | CORROSIVO |
|  | PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO |  | TÓXICO |
|  | REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO |  | MARCA CE |
|  | PROTEGER DA LUZ E CALOR |  | NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA |

BIO GENE

COVID-19 PCR

Español . Instrucciones de uso

REF K228-1

Revisión: Abril/2020

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Finalidad | 3 |
| Principio de Acción | 3 |
| Presentación | 3 |
| Reactivos | 4 |
| Equipamientos e Insumos Operacionales | 4 |
| Condiciones de Almacenamiento y Transporte | 4 |
| Cuidados Especiales | 5 |
| Muestras | 6 |
| Procedimiento | 6 |
| A . Extracción de RNA | 6 |
| B . Preparación de los Reactivos | 6 |
| C . Dilución de lo Patrón Cuantitativo | 7 |
| D . Preparación de la PCR | 8 |
| E . Definciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real | 9 |
| F . Validación de lo Resultado | 10 |
| G . Interpretación de lo Resultado | 12 |
| Limitaciones de Proceso | 13 |
| Desempeño del Producto / Control de Calidad | 13 |
| Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica | 13 |
| Repetibilidad | 14 |
| Reproductibilidad | 14 |
| Sensibilidad Clínica | 14 |
| Sensibilidad Analítica | 14 |
| Linealidad | 15 |
| Significado Diagnóstico | 15 |
| Referencias Bibliográficas | 15 |
| Asistencia al Consumidor | 15 |
| Simbología Universal | 16 |

FINALIDAD

Test para detección cuantitativa del RNA del virus SARS-CoV-2 (COVID-19) a través de la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene COVID-19 PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del RNA del virus COVID-19 a través de la RT-PCR en tiempo real. El método de RT-PCR en Tiempo Real es usado para amplificar el RNA del patógeno.

Un termociclador de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar y detectar la sonda fluorescente. El software del aparato calcula la concentración del RNA del virus COVID-19, expresa en copias/ μ L, utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

| Reactivo | Presentación |
|-----------|------------------|
| | 100 Pruebas |
| R1 | 1 x 110 μ L* |
| R2 | 1 x 110 μ L* |
| R3 | 4 x 600 μ L* |
| R4 | 2 x 1,5 mL |
| R5 | 1 x 500 μ L* |
| R6 | 1 x 1,5 mL |
| R7 | 1 x 2 mL |
| R8 | 1 x 150 μ L |
| R9 | 1 x 110 μ L* |

*Reactivos liofilizados. Los volúmenes arriba descritos corresponden el volumen final después de la resuspensión de los reactivos como se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

REACTIVOS

R1. Solución PCR E: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R2. Solución PCR RdRp: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R3. Mix Taq: Polimerasas, dNTPs, $MgCl_2$, estabilizadores.

R4. Tampón Mix: TRIS-HCl.

R5. Patrón A (2 x 10⁵ copias/ μ L): Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.

R6. Diluyente: TRIS-HCl, EDTA.

R7. Agua: Agua libre de DNase/RNase.

R8. Control Negativo: TRIS-HCl.

R9. Solución PCR Endógeno: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES**Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucción de uso (manual).

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Sistema óptico programable de detección de fluorescencia (Termociclador de PCR en Tiempo Real).
- 2- Cámara del flujo laminar.
- 3- Tubos de microcentrífuga 1,5mL.
- 4- Tubos o placa para reacción de PCR.
- 5- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 6- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtice.
- 8- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L).
- 9- Kit para extracción de ácidos nucleicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20°C (-10 a -30°C).

Después de resuspensión de los reactivos liofilizados, el producto es estable por 6 meses a partir de la fecha de resuspensión. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento.

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 2 y 30°C por hasta 7 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.

2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.

3- Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evitar contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.

4- Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.

5- Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones de amplificación y para la ampliación/detección de productos amplificados. Nunca introducir un producto de amplificación en el área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.

6- Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados debajo de una Cámara de flujo laminar. Las pipetas deben ser usadas con punteras con filtro. Las punteras empleados deben ser estériles, libres de DNases y RNAses.

7- Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos.

8- Almacenar las muestras de RNA a -20°C , caso no fueran utilizadas inmediatamente.

9- No usar el kit después de la fecha de vencimiento.

10- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

11- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

12- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

13- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Este kit puede ser utilizado con muestras de RNA extraídas de esputo, hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo. Otros tipos de muestras pueden ser utilizados de acuerdo a las recomendaciones de médico del laboratorio.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para las pruebas moleculares. Deben ser transportados y almacenados entre 2 y 8°C hasta por 3 días¹.

RNA (extraído): Utilizar muestras de RNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas.

Para un largo tiempo de almacenamiento, se recomienda congelar las muestras a -70°C. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

PROCEDIMIENTO

A. Extracción de RNA

Los ácidos nucleicos (RNA) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit escogido.

B. Preparación de los Reactivos

OBS.: El reactivo **R5** contiene molde de RNA/DNA. El debe ser manipulado (resuspender) en área apropiada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

1- Centrifugar (pulso *spin*) los reactivos: **Solución PCR E (R1)**, **Solución PCR RdRp (R2)**, **Patrón A (R5)** y **Solución PCR Endógeno (R9)** antes de la apertura de los microtubos.

2- Resuspender cada botella de lo reactivo **Mix Taq (R3)*** con 600µL del reactivo **Tampón Mix (R4)**.

*Resuspender las botellas de lo reactivo **Mix Taq (R3)** cuando sea necesario utilizar.

3- Resuspender los reactivos, **Solución PCR E (R1)**, **Solución PCR RdRp (R2)** y **Solución PCR Endógeno (R9)** con el reactivo **Agua (R7)** de acuerdo con la tabla abajo:

| Reactivos | Presentación |
|----------------------------|--------------|
| | 100 Pruebas |
| Solución PCR E (R1) | 110 μ L |
| Solución PCR RdRp (R2) | 110 μ L |
| Solución PCR Endógeno (R9) | 110 μ L |

C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo

- 1- Resuspender o **Patrón A (R5)** con 500 μ L de **Diluyente (R6)**.
- 2- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R5)** ya resuspendidas.
- 3- Pipetear 90 μ L del **Diluyente (R6)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.
- 4- Añadir 5 μ L del RNA extraído de la muestra o 5 μ L de los Patrones Cuantitativos o 5 μ L de lo **Control Negativo (R8)** en los tubos predeterminados.
- 5- Cambiar la puntera y pipetear 10 μ L del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.
- 6- Cambiar la puntera y pipetear 10 μ L del microtubo C en el microtubo D y homogenizar.
- 7- Al final de la dilución tenemos patrones A, B, C y D con las siguientes concentraciones:

Patrón A – 2 x 10⁵ copias/ μ L

Patrón B – 2 x 10⁴ copias/ μ L

Patrón C – 2 x 10³ copias/ μ L

Patrón D – 2 x 10² copias/ μ L

D. Preparación de la PCR

ATENCIÓN: Los reactivos **Solución PCR E (R1)** y **Solución PCR RdRp (R2)** tener la misma sonda (FAM). Por lo tanto, para cada muestra debe ser preparado dos reacciones individuales, una reacción para la prueba E y otra reacción para RdRp.

La **Solución PCR Endógeno (R9)** tiene una sonda VIC y un volumen suficiente para llevar a cabo 100 reacciones, por lo que debe usarse en la reacción para la prueba E.

1- Separar previamente los microtubos/pozos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras, Controles y Patrones Cuantitativos a ser analizados.

D1. Preparación de PCR para el gen E y el Control Endógeno

1- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

| Reactivos | 1 Reacción | 25 Reacciones | 50 Reacciones | 100 Reacciones |
|----------------------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|
| Mix Taq (R3) | 10 µL | 250 µL | 500 µL | 1 mL |
| Solución PCR E (R1) | 1 µL | 25 µL | 50 µL | 100 µL |
| Solución PCR Endógeno (R9) | 1 µL | 25 µL | 50 µL | 100 µL |
| Agua (R7) | 3 µL | 75 µL | 150 µL | 300 µL |

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

D2. Preparación de PCR para el gen RdRp sin Control Endógeno

1- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

| Reactivos | 1 Reacción | 25 Reacciones | 50 Reacciones | 100 Reacciones |
|------------------------|------------|---------------|---------------|----------------|
| Mix Taq (R3) | 10µL | 250µL | 500µL | 1mL |
| Solución PCR RdRp (R2) | 1µL | 25µL | 50µL | 100µL |
| Agua (R7) | 4µL | 100µL | 200µL | 400µL |

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

2- Pipetear 15µL de la solución de PCR final en los microtubos/pozos a ser utilizados.

3- Añadir 5µL del RNA extraído de la muestra o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R8)** en los tubos predeterminados.

4- Homogenizar bien.

5- Observar que el volumen total de la reacción es de 20µL, y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo y Patrones Cuantitativos).

6- Transportar los tubos/placa para el termociclador y seguir lo descrito en la sección E (Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real).

E. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real

Verificar el manual de operaciones del equipamiento de PCR en tiempo real para la programación de lo experimento.

1- Defina el tipo del experimento:

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:

Referencia Pasiva: Los equipos que utilizan el ROX como referencia pasiva deben programarse con la opción **“NONE”** para referencia pasiva.

| Alvo | Detector | Quencher |
|------------------|----------|----------|
| E | FAM | NFQ-MGB |
| RdRp | FAM | |
| Control Endógeno | VIC | |

Obs: • Los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Endógeno (VIC), pues el mismo es utilizado para control de extracción y amplificación de las muestras.
• Las muestras extraídas deben marcarse con los detectores FAM y VIC.

3- Defina los Patrones Cuantitativos (Standards) como:

Patrón A – 2×10^5 copias/ μ L

Patrón B – 2×10^4 copias/ μ L

Patrón C – 2×10^3 copias/ μ L

Patrón D – 2×10^2 copias/ μ L

4- Defina las condiciones de los ciclos:

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------|-------------|-------------|--------|
| 1 | 55°C | 10 minutos | 1 |
| 2 | 95°C | 3 minutos | 1 |
| 3 | 95°C | 15 segundos | 50 |
| | 60°C | 60 segundos | |

Defina “Data Collection” como “stage 3, step 2 (60@0:60)”.

F. Validación de lo Resultado

1- Curva Patrón

| Curva Patrón | Rango Permitido | Amplificación / Detección |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Coefficiente de correlación (R^2) | $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$ | Válida |

Si el valor de R^2 no queda entre los límites del rango permitido, el resultado es considerado inválido y la prueba debe ser repetida.

2- Control Negativo

| CT Control Negativo | | Resultado | Amplificación/ Detección |
|---------------------|---------------|-----------|-----------------------------|
| FAM | VIC | | |
| Indeterminado | Indeterminado | Negativo | Válida |

3- Muestras

| COVID-19 | | Resultado | Detección |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|
| FAM ¹ (E o RdRp) | VIC ² Control Endógeno | | |
| Concentración determinada | CT ≤ 35 | Positivo | Válida |
| | CT > 35 | Positivo | Inválido* |
| Concentración indeterminada | CT ≤ 35 | Negativo | Válida |
| | CT > 35 | Negativo | Inválido* |

¹COVID-19

Para un diagnóstico positivo de COVID-19, es necesario detectar **2 genes alvo** (E y RdRp).

²Control Endógeno

El valor CT del Control Endógeno puede variar según la cantidad de material biológico presente en la muestra extraída.

- El CT baja indica una alta concentración de material biológico en la muestra y que el proceso de extracción fue eficiente.

-El CT alta indica baja concentración de material biológico en la muestra y / o extracción ineficiente.

***OBS:** El valor de CT del Control Endógeno varía con las condiciones del proceso, tales como la eficiencia de la extracción de DNA/RNA, la concentración de las muestras y los ajustes del termociclador. Por lo tanto,

estas condiciones deben ser evaluadas cuando los valores de CT no son apropiados y los resultados relevantes se pueden validar.

Ejemplo: Las muestras con un alto número de copias de DNA/RNA pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Endógeno resultante en el valor de CT fuera del rango óptimo, este resultado no invalida el test.

Si los requisitos mencionados no fueran cumplidos, el ensayo es considerado inválido y el test debe ser repetido.

G. Interpretación de lo Resultado

El kit es capaz de detectar 10 a 1.000.000 copias por reacción.

El software del aparato calcula automáticamente la concentración de las muestras.

Ejemplo: Si el programa muestra una concentración como 2.00E+005, entonces la concentración de la muestra será 2.0×10^5 copias/ μ L.

| Resultado de la Muestra en Copias/ μ L (FAM) | Copias por Reacción |
|--|---------------------|
| $\geq 1 \times 10^6$ | $> 1.000.000$ |
| $2 \leq \text{Cantidad} \leq 9 \times 10^5$ | Cantidad obtenida |
| < 2 | < 10 |

Si el RNA del patógeno no es detectado, esto no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno está por debajo de lo límite de detección de este kit.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta los datos clínicos y las pruebas de laboratorio del paciente.

1- Cálculo de conversión para copias/mL

$$\text{Resultado en Copias/mL} = \frac{\text{Copias}/\mu\text{L} * \text{Volumen de elución } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volumen de la muestra extraída (mL)}^{**}}$$

* Resultado de la cuantificación de la muestra proporcionados por lo equipamiento en copias/ μL .

** De acuerdo con protocolo del kit de extracción utilizado.

Ejemplo: Volumen de elución: 30 μL

Volumen de la muestra: 200 μL (0,2 mL)

Cuantificación de la muestra: 5000 copias/ μL

$$\text{Resultado en copias/mL} = \frac{(5000 \text{ copias}/\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0,2 \text{ mL}}$$

$$\text{Resultado en copias/mL} = 750.000 \text{ copias/mL}$$

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

No se recomienda el uso de heparina en la toma de muestras para pruebas moleculares, debido a la inhibición de la PCR, pudiendo generar resultados falsos negativos.

Las muestras con presencia de inhibidores de la PCR deben diluirse para reducir su efecto en la reacción.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

CONTROL DE CALIDAD

Exactitud

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit **Bio Gene COVID-19 PCR** fue comparado con otro protocolo para la cuantificación del RNA del COVID-19. Fueron realizadas 50 análisis y los resultados fueron evaluados. La diferencia entre los valores de las muestras, obtenidos en los dos productos fue $\leq 0,5$ log. Con estos resultados se puede concluir que el kit presenta buena especificidad metodológica.

Precisión**REPETIBILIDAD**

Fueron realizadas 10 dosificaciones sucesivas de 2 muestras positivas con concentraciones distintas, los resultados están mostrados en la tabla abajo:

| | Muestra 1 | Muestra 2 |
|--------------------------------------|------------------|------------------|
| Concentración Promedio (Log) | 2,71 | 3,63 |
| Desvio Patrón (Log) | 0,07 | 0,10 |
| Coefficiente de Variación (%) | 2,46 | 2,77 |

REPRODUCTIBILIDAD

Fueron realizadas 10 dosificaciones durante 3 días consecutivos con 1 muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Concentración Promedio (Log) | 2,71 | 2,69 | 2,75 |
| Desvio Patrón (Log) | 0,07 | 0,10 | 0,07 |
| Coefficiente de Variación (%) | 2,46 | 3,83 | 2,49 |

Sensibilidad Clínica

El kit **Bio Gene COVID-19 PCR** presentó sensibilidad clínica de 99,9% y especificidad clínica de 99,9%.

| Método | | Datos Clínicos | | Total |
|------------------------------|------------------|-----------------------|----------|--------------|
| Bio Gene COVID-19 PCR | Resultado | Positivo | Negativo | |
| | Positivo | 24 | 0 | 24 |
| | Negativo | 0 | 26 | 26 |
| RESULTADO TOTAL | | 24 | 26 | 50 |

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 0,061 copias/ μ L (- 1,21 log), o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 0,305 moléculas alvos en 5 μ L del producto de extracción del RNA añadido a reacción de amplificación. Pronto, la sensibilidad fue de 18,3 copias/mL.*

* La sensibilidad puede variar de acuerdo con el kit de extracción utilizado.

Linealidad

La linealidad encontrada en los estudios de rendimiento fue de $1,00 \times 10^5$ copias/ μ L (5,0 log).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la familia Coronaviridae, y están ampliamente distribuidos infectando humanos y otros mamíferos. En humanos, los síntomas más comunes presentados son fiebre, tos, disnea, mialgia o fatiga. Puede causar enfermedades que van desde resfriado común a enfermedades más graves, como el síndrome respiratorio Medio Oriente (MERS-CoV) y Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV). En diciembre de 2019, una serie de casos de neumonía, de causa desconocida apareció en Wuhan en China, con síntomas muy similares a la neumonía viral, después de la secuenciación de las muestras respiratorias se encontró infección por Coronavirus, que se llamó el nuevo coronavirus (2019-nCoV). En aproximadamente 150 países en todos los continentes, se han reportado casos de infección. Por lo tanto, la detección de COVID-19 por PCR en tiempo real es muy importante por la precisión y agilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Corman VM, Landt O, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
3. Huang C, Wang Y, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497- 506.

ASISTENCIA AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit Bio Gene COVID-19 PCR en la ANVISA:
10269360323

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | NÚMERO DEL CATÁLOGO |  | ELABORADO POR |
|  | NÚMERO DE LOTE |  | CONTROL |
|  | FECHA DE FABRICACIÓN |  | CONTROL POSITIVO |
|  | ESTABLE HASTA (último día del mes) |  | CONTROL NEGATIVO |
|  | TEMPERATURA LIMITE (conservar a) |  | RIESGO BIOLÓGICO |
|  | CONTENIDO SUFICIENTE PARA <N> TESTES |  | INFLAMABLE |
|  | CONSULTAR INSTRUCCIONES DE USO |  | CORROSIVO |
|  | DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO |  | TÓXICO |
|  | EUROPEA REPRESENTANTE AUTORIZADO |  | MARCADO CE |
|  | PROTEGER DEL LUZ Y CALOR |  | NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA |

BIO GENE

COVID-19 PCR

English . Usage instructions

REF K228-1

Review: April/2020

INDEX

| | |
|---|----|
| Function | 3 |
| Principle of Action | 3 |
| Presentation | 3 |
| Reagents | 4 |
| Equipments and Operational Inputs | 4 |
| Transportation and storage Conditions | 4 |
| Special Care | 5 |
| Samples | 5 |
| Process Description | 6 |
| A . RNAExtraction | 6 |
| B . Preparation of the reagents | 6 |
| C . Dilution of Quantitative Standard | 7 |
| D . PCR Preparation | 7 |
| E . Thermocycler settings for Real-Time PCR | 9 |
| F . Result Validation | 10 |
| G. Result Interpretation | 11 |
| Process Limitations | 12 |
| Product Performance / Quality Control | 12 |
| Comparison of Methods and Methodology Specificity | 12 |
| Repeatability | 13 |
| Reproducibility | 13 |
| Clinical Sensitivity | 13 |
| Analytical Sensitivity | 14 |
| Linearity | 14 |
| Diagnostic Significance | 14 |
| Bibliographic References | 14 |
| Customer Service | 14 |
| Universal Symbology | 15 |

FUNCTION

Quantitative detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA through reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene COVID-19 PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of COVID-19 virus RNA by real-time RT-PCR.

The Real-Time RT-PCR method is used to amplify the pathogen RNA.

A thermocycler for Real-Time PCR is used to amplify and detect the fluorescent probe. Software calculates the COVID-19 virus RNA concentration, expressed in copies/ μL , using the standard curve generated from the quantitative standard, contained in the kit.

| Reagent | Presentation |
|-----------|-------------------------|
| | 100 Tests |
| R1 | 1 x 110 μL * |
| R2 | 1 x 110 μL * |
| R3 | 4 x 600 μL * |
| R4 | 2 x 1.5 mL |
| R5 | 1 x 500 μL * |
| R6 | 1 x 1.5 mL |
| R7 | 1 x 2 mL |
| R8 | 1 x 150 μL |
| R9 | 1 x 110 μL * |

*Lyophilized reagents. The volumes described above refer to the final volume after the reagents resuspension, as described in the item PROCESS DESCRIPTION, subitem B (Preparation of the Reagents).

REAGENTS

R1. E PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R2. RdRp PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R3. Mix Taq: Polymerases, dNTPs, MgCl₂, stabilizers.

R4. Mix Buffer: TRIS-HCl.

R5. Standard A (2 x 10⁵ copies/μL): Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.

R6. Diluent: TRIS-HCl, EDTA

R7. Water: DNase/RNase free water.

R8. Negative Control: TRIS-HCl.

R9. Endogenous PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS**Materials in the kit:**

- Reagents described in the previous item.
- Usage instructions (manual).

Materials needed but not contained in the kit:

- 1- Real-time PCR thermocycler.
- 2- Laminar flow hood.
- 3- 1.5 ml microcentrifuge tubes.
- 4- PCR reaction tubes or plate.
- 5- Powder free latex gloves or similar material.
- 6- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 7- Vortex.
- 8- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 9- Nucleic acid extraction kit.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The required storage temperature is -20°C (-10 to -30°C). **After resuspension of lyophilized reagents, the product is stable for 6 months from the date of resuspension.** Avoid freezing and thawing.

The kit may be transported between 2 and 30°C for 7 days. Protect from light and avoid moisture.

SPECIAL CARE**1- For professional *in vitro* diagnostic use only.**

- 2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
- 3- Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose of wastes in accordance with appropriate security procedures.
- 4- It is require skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.
- 5- It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of amplification reactions and for the amplification / detection of amplified products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.
- 6- All samples and reagents should be handled inside a laminar flow hood. It is necessary to use sterile and DNase/RNase free filter pipettes tips.
- 7- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.
- 8- Store the RNA samples at -20°C in case they will not be used immediately.
- 9- Do not use reagents after expiration date.
- 10- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
- 11- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.
- 12- Do not use the product in case of damaged packaging.
- 13- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

This kit should be used with RNA samples extracted from sputum, nasopharyngeal or oropharyngeal swab. Samples should be collected according to laboratory recommendations for molecular testing. They must be transported and stored as between 2 to 8°C for up to 3 days¹.

RNA (extracted): Use RNA samples suitable for RT-PCR amplification with adequate purity and concentration.

For long-term storage, it is recommended to freeze samples at -70°C. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

PROCESS DESCRIPTION

A. RNA Extraction

The nucleic acids (RNA) must be extracted in accord to the procedure of the chosen extraction kit.

B. Preparation of the Reagents

Note: The **R5** reagent contain RNA/DNA template. It need to be handle (resuspended) in a separated area.

1- Before open, spin (*spin* pulse) each of the following reagents: **E PCR Solution (R1)**, **RdRp PCR Solution (R2)**, **Standard A (R5)** and **Endogenous PCR Solution (R9)**

2- Resuspend each vial of **Mix Taq (R3)*** reagent with 600µL of **Mix Buffer (R4)** reagent.

*Resuspend the **Mix Taq (R3)** vials as need of use.

3- Resuspend the reagents, **E PCR Solution (R1)**, **RdRp PCR Solution (R2)** and **Endogenous PCR Solution (R9)** with **Water (R7)** reagent, in according to the following table:

| Reagent | Presentation |
|------------------------------|--------------|
| | 100 Tests |
| E PCR Solution (R1) | 110 µL |
| RdRp PCR Solution (R2) | 110 µL |
| Endogenous PCR Solution (R9) | 110 µL |

C. Dilution of Quantitative Standard

- 1- Resuspend the **Standard A (R5)** with 500 μ L of **Diluent (R6)**.
- 2- Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of resuspended **Standard A (R5)**.
- 3- Pipette 90 μ L of the **Diluent (R6)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 4- Pipette 10 μ L of **Standard A (R5)** in microtube B and mix.
- 5- Replace the tip and pipette 10 μ L of microtube B in microtube C and mix.
- 6- Replace the tip and pipette 10 μ L of microtube C in microtube D and mix.
- 7- At the end of dilution procedure, it will be available 4 standards with the following concentrations:

Standard A - 2×10^5 copies/ μ L

Standard B - 2×10^4 copies/ μ L

Standard C - 2×10^3 copies/ μ L

Standard D - 2×10^2 copies/ μ L

D. PCR Preparation

ATTENTION: The **E PCR Solution (R1)** and **RdRp PCR Solution (R2)** reagents have the same probe (FAM). Therefore, for each sample, must be prepared 2 individual reactions, one reaction for E test and another reaction for RdRp test.

The **Endogenous PCR Solution (R9)** has VIC probe and sufficient volume to realize 100 reactions, so it must only be used in the reaction for **E**.

- 1- Prior beginning the assay, select sufficient number of microtubes/wells to be used on the reaction, in accord to the number of samples, Controls and Quantitative Standards to be used.

D1. Preparation of PCR for the E gene and the Endogenous Control

1- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

| Reagents | 1 Reaction | 25 Reactions | 50 Reactions | 100 Reactions |
|------------------------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| Mix Taq (R3) | 10 µL | 250 µL | 500 µL | 1 mL |
| E PCR Solution (R1) | 1 µL | 25 µL | 50 µL | 100 µL |
| Endogenous PCR Solution (R9) | 1 µL | 25 µL | 50 µL | 100 µL |
| Water (R7) | 3 µL | 75 µL | 150 µL | 300 µL |

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

D2. Preparation of PCR for the RdRp gene without Endogenous Control

1- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

| Reagents | 1 Reaction | 25 Reactions | 50 Reactions | 100 Reactions |
|------------------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| Mix Taq (R3) | 10µL | 250µL | 500µL | 1mL |
| RdRp PCR Solution (R2) | 1µL | 25µL | 50µL | 100µL |
| Water (R7) | 4µL | 100µL | 200µL | 400µL |

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

2- Pipette 15µL of the final PCR solution in microtubes or wells previously determined.

3- Add 5 μ L of extracted RNA sample or 5 μ L of Quantitative Standards or 5 μ L of **Negative Control (R8)** in previously determined tubes.

4- Mix well.

5- The total volume of the reaction is 20 μ L. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control and Quantitative Standards.

6- Transport the tubes/plate to the thermocycler and follow the instructions in the section E (Thermocycler Settings for Real-Time PCR).

E. Thermocycler Settings for Real-Time PCR

Check the operation manual of the Real-time PCR thermocycler to program the experiment.

1- Set the type of experiment:

Quantitative Test with Standard Curve.

2- Set the fluorescent probes:

Passive Reference: Equipments that use ROX as a passive reference must be programmed with the option “**NONE**” for passive reference.

| Target | Detector | Quencher |
|--------------------|----------|----------|
| E | FAM | NFQ-MGB |
| RdRp | FAM | |
| Endogenous Control | VIC | |

Note: • Quantitative Standards do not present Endogenous Control (VIC), because it is used for extraction and amplification control of the samples.

• The extracted samples must be marked with the FAM and VIC detectors.

3- Set the quantitative standards:

Standard A - 2 x 10⁵ copies/ μ L

Standard B - 2 x 10⁴ copies/ μ L

Standard C - 2 x 10³ copies/ μ L

Standard D - 2 x 10² copies/ μ L

4- Set the cycling conditions:

| Stage | Temperature | Time | Cycles |
|-------|-------------|------------|--------|
| 1 | 55°C | 10 minutes | 1 |
| 2 | 95°C | 3 minutes | 1 |
| 3 | 95°C | 15 seconds | 50 |
| | 60°C | 60 seconds | |

Set "Data Collection" as "stage 3, step 2 (60@0:60)".

F. Result Validation**1- Standard Curve**

| Standard Curve | Permitted Range | Amplification / Detection |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Correlation Coefficient (R^2) | $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$ | Valid |

If the R^2 value does not fall within the limits of range, the result must be considered invalid and the test must be repeated.

2- Negative Control

| CT Negative Control | | Result | Amplification/ Detection |
|---------------------|--------------|----------|-----------------------------|
| FAM | VIC | | |
| Undetermined | Undetermined | Negative | Valid |

3- Samples

| COVID-19 | | Result | Detection |
|---------------------------------|--|----------|-----------|
| FAM ¹ (E or RdRp) | VIC ² Endogenous Control | | |
| Determined concentration | CT \leq 35 | Positive | Valid |
| | CT $>$ 35 | Positive | Invalid* |
| Undetermined concentration | CT \leq 35 | Negative | Valid |
| | CT $>$ 35 | Negative | Invalid* |

¹COVID-19

For the COVID-19 positive diagnosis, it is necessary to detect **2 target genes** (E and RdRp).

²Endogenous Control

The CT value of the Endogenous Control may vary according to the amount of biological material present in the extracted sample.

- The low CT indicates high concentration of biological material in the sample and that the extraction process was efficient.
- The high CT indicates low concentration of biological material in the sample and / or inefficient extraction.

***OBS:** The CT values of Endogenous Control vary with the process conditions, as the extraction efficiency of the DNA/RNA, the concentration of the samples and the thermocycler settings. Therefore, these conditions must be evaluated when the CT values are not appropriated and, in case it is relevant, the results can be validated.

Example: In some cases, the samples with high numbers of copies of DNA / RNA can inhibit the amplification of the Endogenous Control, resulting in CT value outside the optimal range, this does not invalidate the test results.

If the above requirements are not achieved, the assay must be considered invalid and must be repeated.

G. Result Interpretation

This kit is able to detect from 10 to 1.000.000 copies of RNA per reaction. The thermocycler software calculates automatically the samples concentration.

Example: If the program shows a concentration of 2.00E+005, this means that the sample concentration is 2.0×10^5 copies/ μ L.

| Sample Result in Copies/ μ L (FAM) | Copies per Reaction |
|---|---------------------|
| $\geq 1 \times 10^6$ | > 1.000.000 |
| $2 \leq \text{Quantity} \leq 9 \times 10^5$ | Quantity obtained |
| < 2 | < 10 |

The non-detection of the pathogen RNA does not exclude the presence of infection when the pathogen title is below the detection limit of this kit. The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only parameter for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient. The results obtained must be evaluated considering the clinical data and laboratory tests of the patient.

1- Conversion calculation for copies/mL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{\text{Copies}/\mu\text{L} * \text{Elution volume } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Extracted sample volume (mL)}^{**}}$$

*Result of quantification of the sample provided by the equipment in copies/ μL .

**According to the protocol of the extraction kit used.

Example: Elution volume: 30 μL

Sample volume: 200 μL (0.2 mL)

Quantification of the sample: 5000 copies/ μL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{(5000 \text{ copies}/\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0.2\text{mL}}$$

$$\text{Result in copies/mL} = 750.000 \text{ copies/mL}$$

PROCESS LIMITATIONS

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

The heparin use in the samples collection for molecular tests is not recommended, due to the PCR inhibition which can generate false negative results.

The samples with presence of PCR inhibitors should be diluted to reduce their effect on the reaction.

PRODUCT PERFORMANCE QUALITY CONTROL

Accuracy

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The **Bio Gene COVID-19 PCR** test was compared with another protocol for the quantification of the COVID-19 virus RNA. 50 analyzes were

performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was ≤ 0.5 log. This shows that the test has good methodological specificity.

Precision

REPEATABILITY

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 2 positive samples with different concentrations, obtaining the following results:

| | Sample 1 | Sample 2 |
|-------------------------------------|----------|----------|
| Average Concentration (Log) | 2.71 | 3.63 |
| Standard Deviation (Log) | 0.07 | 0.10 |
| Coefficient of variation (%) | 2.46 | 2.77 |

REPRODUCIBILITY

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 1 sample with different concentrations, obtaining the following results:

| | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| Average Concentration (Log) | 2.71 | 2.69 | 2.75 |
| Standard Deviation (Log) | 0.07 | 0.10 | 0.70 |
| Coefficient of variation (%) | 2.46 | 3.83 | 2.49 |

Clinical Sensitivity

The **Bio Gene COVID-19 PCR** showed clinical sensitivity of 99.9% and a clinical specificity of 99.9%.

| Method | | Clinical Data | | Total |
|--------------------------|----------|---------------|----------|-------|
| Bio Gene COVID-19 PCR | Result | Positive | Negative | |
| | Positive | 24 | 0 | 24 |
| | Negative | 0 | 26 | 26 |
| TOTAL | | 24 | 26 | 50 |

Analytical Sensitivity

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 0.61 copies/ μ L (- 1.21 log). This means the assay is capable to detect approximately 0.305 target molecules in 5 μ L RNA extraction product, used on the amplification reaction. The sensitivity was 18.3 copies/mL.*

* The sensitivity may vary according to the used extraction kit.

Linearity

The linearity found in the performance studies was 1.00×10^5 copies/ μ L (5.0 log).

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Coronaviruses (CoV) belong to the family Coronaviridae, and they are widely distributed infecting humans and other mammals. In humans, the most common symptoms presented are fever, cough, dyspnea, myalgia or fatigue. It can cause diseases ranging from cold common to more serious diseases, such as Respiratory Syndrome Middle East (MERS-CoV) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV). In December 2019, a series of pneumonia cases of unknown cause appeared in Wuhan in China, with symptoms very similar to viral pneumonia, after sequencing of the respiratory samples was found to be infection by Coronavirus, which was called the new coronavirus (2019-nCoV). In approximately 150 countries on all continents, cases of infection have been reported. Therefore, the detection of COVID-19 by real time PCR is very important due to its accuracy and agility.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES





















1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Corman VM, Landt O, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
3. Huang C, Wang Y, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone: 0800 031 5454
E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bio Gene COVID-19 PCR: 10269360323

UNIVERSAL SYMBOLOGY

| | | | |
|---|---------------------------------------|---|--|
|  | CATALOG NUMBER |  | MANUFACTURED BY |
|  | BATCH CODE |  | CONTROL |
|  | DATE OF MANUFACTURE |  | POSITIVE CONTROL |
|  | USED BY (last day of month) |  | NEGATIVE CONTROL |
|  | TEMPERATURE LIMITATION (store at) |  | BIOLOGICAL RISK |
|  | CONTAINS SUFFICIENT FOR <N> TESTS |  | INFLAMMABLE |
|  | CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE |  | CORROSIVE |
|  | IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE |  | POISON |
|  | EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE |  | CE MARK |
|  | KEEP AWAY FROM SUNLIGHT |  | DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED |

BIO GENE

Bioclin · QUIBASA



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130

Tel +55 31 3439 5454 . www.bioclin.com.br

FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira