



COVID-19 PCR

Instruções de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

REF K228-1

Revisão: Setembro/2021

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	6
D . Preparo da PCR	7
E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real	8
F . Validação do Resultado	10
G . Interpretação do Resultado	11
Limitações do Processo	12
Desempenho do Produto / Controle de Qualidade	12
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica	12
Repetibilidade	13
Reprodutibilidade	13
Sensibilidade Clínica	13
Sensibilidade Analítica	14
Linearidade	14
Significado Diagnóstico	14
Referências Bibliográficas	14
Atendimento ao Consumidor	14
Simbologia Universal	15

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa ou qualitativa 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 ou qualitativa do RNA do vírus SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2, 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, $MgCl_2$, Estabilizantes.
R4. Tampão Mix: TRIS-HCl.
R5. Padrão A (2×10^5 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 centrifuga de 1,5 mL.
- 4- Tubos ou placas para reação de PCR.
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 6- Microcentrifuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtex.
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 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 ponteiras com filtro. As ponteiras 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 nucléicos (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- Ressuspende o **Padrão A (R5)**** com 500µL do **Diluyente (R6)**.

2- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R5)**.

3- Pipetar 90µL do **Diluyente (R6)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.

4- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R5)** no microtubo B e homogeneizar.

5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.

6- Trocar a ponteira e pipetar 10µL 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/µL

Padrão B - 2×10^4 cópias/µL

Padrão C - 2×10^3 cópias/µL

Padrão D - 2×10^2 cópias/µL

*A diluição da curva padrão deve ser realizada para o teste quantitativo.

**A curva padrão deve ser preparada somente para o gene RdRp.

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	100reações
Mix Taq (R3)	10µL	250µL	500µL	1mL
Solução PCR E (R1)	1µL	25µL	50µL	100µL
Solução PCR Endógeno (R9)	1µL	25µL	50µL	100µL
Água (R7)	3µL	75µL	150µL	300µL

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)	10µL	250µL	500µL	1mL
Solução PCR RdRp (R2)	1µL	25µL	50µL	100µL
Água (R7)	4µL	100µL	200µL	400µL

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 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

3- Adicionar 5µL do RNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL dos controles 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 (Controles Negativo/Positivo 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 ou Teste Qualitativo.

Obs: No caso do teste qualitativo, o Padrão A (R5) deve ser utilizado como Controle Positivo de amplificação.

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/ 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

**Programação utilizada no teste quantitativo.*

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)	$0,95 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Obs: O valor do Threshold pode ser utilizado no modo automático, no entanto, deve ser realizada a sua verificação para a presença de ruídos que podem resultar em valores de Threshold fora da fase exponencial das curvas de amplificação, que neste caso, deve ser ajustado manualmente. Em caso de dúvida na análise entre em contato com o SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

2- Controles

Controle	CT		Resultado	Ampliação/ Detecção
	FAM	VIC		
Negativo	Indeterminado ou Ausência de amplificação	Indeterminado ou Ausência de amplificação	Negativo	Válida
Positivo*	Determinado ou Presença de amplificação	Indeterminado ou Ausência de amplificação	Positivo	Válida

* Controle Positivo (**R5.Padrão A**) utilizado no teste qualitativo

3- Amostras

SARS-CoV-2 (COVID-19)		Resultado	Detecção
FAM ¹ (E e RdRp)	VIC ² Controle Endógeno		
Concentração determinada ou Presença de amplificação	$CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT > 35$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada ou ausência de amplificação	$CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT > 35$	Negativo	Inválido*

1^o COVID-19

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

2^o Controle 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
Coeficiente 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
Coeficiente 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/μL (- 1,21 log), ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 0,305 moléculas alvos em 5μL 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/μL (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, dispneia, 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		INFLÂMVEL
	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



COVID-19 PCR

Español . Instrucciones de uso

REF K228-1

Revisión: Septiembre/2021

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	7
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 o cualitativa 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 o cualitativa del RNA del virus SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2, expresa en copias/ μL , utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación
	100 Pruebas
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 *

*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 (2×10^5 copias/ μL): 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 microcentrifuga 1,5mL.
- 4- Tubos o placa para reacción de PCR.
- 5- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 6- Microcentrifuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtice.
- 8- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 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 µL
Solución PCR RdRp (R2)	110 µL
Solución PCR Endógeno (R9)	110 µL

C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo*

- 1- Resuspender o **Patrón A (R5)**** con 500µL 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 90µL del **Diluyente (R6)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.
- 4- 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.
- 5- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.
- 6- Cambiar la puntera y pipetear 10µL 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 – 2×10^5 copias/µL

Patrón B – 2×10^4 copias/µL

Patrón C – 2×10^3 copias/µL

Patrón D – 2×10^2 copias/µL

* Se debe realizar una dilución de la curva estándar para las pruebas cuantitativas.

** La curva estándar debe prepararse solo para el gen RdRp.

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 los controles 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/Positivo 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 o Prueba Cualitativa.

NOTA: En el caso de pruebas cualitativas, el Estándar A (**R5**) debe ser usado como Control de amplificación positivo.

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 LPatrón B – 2×10^4 copias/ μ LPatrón C – 2×10^3 copias/ μ LPatrón D – 2×10^2 copias/ μ L**Programación utilizada en la prueba cuantitativa.***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)	$0,95 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Obs: El valor de Umbral se puede utilizar en modo automático, sin embargo, se debe verificar la presencia de ruido que pueda resultar en valores de Umbral fuera de la fase exponencial de las curvas de amplificación, que en este caso, se debe ajustar manualmente. En caso de duda en el análisis, contactar con el SAC (Servicio de Asesoría al Cliente).

2- Controls

Control	CT		Resultado	Amplificación/ Detección
	FAM	VIC		
Negativo	Indeterminada o ausencia de amplificación	Indeterminada o ausencia de amplificación	Negativo	Válida
Positivo*	Determinada o presencia de amplificación	Indeterminada o ausencia de amplificación	Positivo	Válida

* Control Positivo (**R5.Estándar A**) utilizado en la prueba cualitativa.

3- Muestras

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

¹COVID-19

Para un diagnóstico positivo de SARS-CoV-2 (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.

***Nota:** 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

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

* 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

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

Resultado en copias/mL = 750.000 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



NÚMERO DE LOTE



FECHA DE FABRICACIÓN

ESTABLE HASTA
(último día del mes)TEMPERATURA LÍMITE
(conservar a)CONTENIDO SUFICIENTE
PARA <N> TESTESCONSULTAR INSTRUCCIONES
DE USODISPOSITIVO DE
DIAGNÓSTICO IN VITROEUROPEA REPRESENTANTE
AUTORIZADOPROTEGER DEL
LUZ Y CALOR

ELABORADO POR



CONTROL



CONTROL POSITIVO



CONTROL NEGATIVO



RIESGO BIOLÓGICO



INFLAMABLE



CORROSIVO



TÓXICO



MARCADO CE

NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTÁ
DAÑADA



COVID-19 PCR

English . Usage instructions

REF K228-1

Review: September/2021

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipaments 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	6
D . PCR Preparation	7
E . Thermocycler settings for Real-Time PCR	8
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	13
Linearity	14
Diagnostic Significance	14
Bibliographic References	14
Customer Service	14
Universal Symbolology	15

FUNCTION

Quantitative or qualitative 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 or qualitative detection of SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 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, $MgCl_2$, stabilizers.

R4. Mix Buffer: TRIS-HCl.

R5. Standard A (2×10^5 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 (0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 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- Ressuspend the **Standard A (R5)**** with 500µL do **Diluent (R6)**.

2- Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of resuspended **Standard A (R5)**.

3- Pipette 90µL of the **Diluent (R6)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.

4- Pipette 10µL of **Standard A (R5)** in microtube B and mix.

- 5- Replace the tip and pipette 10µL of microtube B in microtube C and mix.
- 6- Replace the tip and pipette 10µL 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/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

*Standard curve dilution must be performed for quantitative testing.

**The standard curve must be prepared for the RdRp gene only.

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 5µL of extracted RNA sample or 5µL of Quantitative Standards or 5µL of controls in previously determined tubes.

4- Mix well.

5- The total volume of the reaction is 20µL. Each PCR run should include the relevant controls: Negative/Positive Controls 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 or Qualitative Test.

Obs: In the case of qualitative testing, Standard A (R5) must be used as Positive Amplification Control.

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 - 2×10^5 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

**Program used in the quantitative test.*

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)	$0,95 \leq R^2 \leq 1,00$	Valid

Note: The Threshold value can be used in automatic mode, however, it must be checked for the presence of noise that can result in Threshold values outside the exponential phase of the amplification curves, which in this case, must be adjusted manually. In case of doubt in the analysis, contact the SAC (Customer Advisory Service.).

2- Controls

Con- trols	CT		Result	Amplification/ Detection
	FAM	VIC		
Negative	Undetermined concentration or absence of amplification	Undetermined concentration or absence of amplification	Negative	Valid
Positive*	Determined concentration or presence of amplification	Undetermined concentration or absence of amplification	Positive	Valid

** Positive Control (**R5.Standard A**) used in the qualitative test..

3- Samples

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

¹COVID-19

For the SARS-CoV-2 (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.

***Note:** 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

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

*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 show 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



BATCH CODE



DATE OF MANUFACTURE



USED BY
(last day of month)



TEMPERATURE LIMITATION
(store at)



CONTAINS SUFFICIENT
FOR <N> TESTS



CONSULT INSTRUCTIONS
FOR USE



IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE



EUROPEAN AUTHORIZED
REPRESENTATIVE



KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT



MANUFACTURED BY



CONTROL



POSITIVE CONTROL



NEGATIVE CONTROL



BIOLOGICAL RISK



INFLAMMABLE



CORROSIVE



POISON



CE MARK



DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED



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