

PROTHERA LAMP COVID 19

Kit para a determinação qualitativa do gene N do vírus SARS-CoV-2 em saliva ou amostra nasofaríngea.

**Uso profissional. Não automatizado.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

[REF] LAMPCOV10: 10 testes

[REF] LAMPCOV25: 25 testes

[REF] LAMPCOV50: 50 testes

[REF] LAMPCOV100: 100 testes

**Khayrós Diagnóstica Fabricação,
Comercialização e Distribuição de Produtos LTDA**

CNPJ 04.299.232/0001-43

R. Biazó Vicentim, 350/360 CEP 13614-330 · Leme · SP

Responsável Técnico: Dr. Luiz Francisco Debellis
Mascaretti · CRBM-SP 3137

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), agente causador do novo coronavírus, gerou a pandemia que trouxe transtornos mundiais e, por isso, é considerado um problema de saúde pública global. O SARS-CoV-2, pertencente ao gênero da família Coronaviridae, é um retrovírus cujo material genético é composto por uma única molécula de RNA positivo (RNA+). Todo o seu genoma contém menos de 30.000 nucleotídeos. São conhecidas aproximadamente 29 proteínas virais, sendo as mais relevantes a proteína S e a proteína N, do nucleocapsídeo viral.

O período de incubação do SARS-CoV-2 é de 2 a 14 dias, sendo que na maioria das pessoas os sintomas começam em torno do quinto dia. Os casos leves representam 80% dos infectados os quais tem sintomas por um ou dois dias. Aqueles que tem os sintomas intensificados a partir do sétimo dia são considerados casos moderados. Em casos graves, o vírus pode comprometer os pulmões provocando insuficiência respiratória grave, além de poder causar lesões em outros órgãos, principalmente rins e fígado.

A transmissão do novo coronavírus ocorre por pessoas infectadas através de secreções como saliva e secreções respiratórias ou de gotículas respiratórias expelidas quando a pessoa tosse, espirra ou fala.

A pandemia demandou o desenvolvimento de novos testes para o diagnóstico da doença, particularmente testes rápidos que podem ser realizados em hospitais, clínicas e laboratórios com pouca estrutura laboratorial e com custo acessível.

O PROTHERA LAMP COVID 19 é um teste para diagnóstico *in vitro* qualitativo do SARS-CoV-2 em amostras de saliva ou swab nasofaríngeo de pessoas que começaram a apresentar os sintomas da Covid-19, monitoramento de pessoas que tiveram contato com casos confirmados da doença e monitoramento de ambientes fechados ou com maior concentração de pessoas, como escritórios ou eventos presenciais.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O RNA será extraído da amostra utilizando um kit de extração apropriado. Em seguida, a amostra será adicionada ao tubo contendo a mistura reacional, as enzimas e os primers necessários para a reação de transcrição reversa, sintetizando o cDNA a partir da fita de RNA que transformará o RNA em cDNA, e para a reação de amplificação isotérmica, onde os primers se anelarão em regiões específicas da sequência do SARS CoV-2, se este estiver presente na amostra. Ao final da reação, um reagente revelador será adicionado ao tubo de reação e, se a amostra for reagente para SARS CoV-2, o revelador intercalará no material genético amplificado gerando uma cor amarelada; se a amostra for não reagente para SARS CoV-2 a amostra reacional ficará com uma cor alaranjada.

APRESENTAÇÃO DO KIT

[REF] LAMPCOV10: 10 testes

1. Microtubos contendo mistura reacional: 10 unidades
2. Solução reveladora: 1 x 1 mL
3. Tubo de coleta para saliva: 10 unidades
4. Conjunto para coleta nasofaríngea: 10 unidades
5. Instruções de uso

[REF] LAMPCOV25: 25 testes

1. Microtubos contendo mistura reacional: 25 unidades
2. Solução reveladora: 1 x 1,5 mL
3. Tubo de coleta para saliva: 25 unidades
4. Conjunto para coleta nasofaríngea: 25 unidades
5. Instruções de uso

[REF] LAMPCOV50: 50 testes

1. Microtubos contendo mistura reacional: 50 unidades
2. Solução reveladora: 1 x 3 mL
3. Tubo de coleta para saliva: 50 unidades
4. Conjunto para coleta nasofaríngea: 50 unidades
5. Instruções de uso

[REF] LAMPCOV100: 100 testes

1. Microtubos contendo mistura reacional: 100 unidades
2. Solução reveladora: 1 x 6 mL
3. Tubo de coleta para saliva: 100 unidades
4. Conjunto para coleta nasofaríngea: 100 unidades
5. Instruções de uso

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

a. Reagentes e materiais

- Kit de extração de RNA viral
- Ponteiras descartáveis para amostra
- Luvas descartáveis
- Água destilada/autoclavada
- Controle positivo (amostra positiva confirmada, vírus SARS-CoV-2 inativado ou RNA sintético do vírus SARS-CoV-2)

b. Equipamentos:

- Termociclador ou bloco de aquecimento
- Micropipeta ajustável 1 – 2 µL

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

a) Microtubos contendo mistura reacional: deve ser mantido congelado à temperatura de -20 °C. Deve-se remover do congelador apenas a quantidade de tubos necessário de acordo com o número de amostras. Os demais tubos devem ser mantidos a -20 °C.

b) Solução reveladora: pode ser mantida refrigerada entre 2 e 8 °C ou congelada a -20 °C.

O reagente de revelação deve ser protegido de luz direta e de altas temperaturas. Caso seja estocado em freezer, é necessário que ele seja mantido em temperatura ambiente para descongelamento completo antes do uso. Após descongelar, agitar o frasco para total homogeneização.

TRANSPORTE

O kit PROTHERA LAMP COVID 19 deve ser transportado refrigerado entre 2 a 8 °C no intervalo máximo de 48 horas. Após este período, o kit deve ser armazenado em freezer (-20 °C). **Notificar a Khayrós caso a embalagem chegue em temperatura ambiente.**

AMOSTRAS

Swab da nasofaringe.

Saliva.

Armazenamento da amostra

É recomendado utilizar a amostra imediatamente após a coleta. Caso isso não seja possível, conservar sob refrigeração por no máximo 5 dias.

Caso as amostras precisem ser transportadas por um período curto (algumas horas), isso pode ser realizado em temperatura ambiente. No entanto, para períodos mais longos elas devem ser refrigeradas. Não congele a amostra coletada.

Após a etapa de extração de RNA, o mesmo deve permanecer em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

Não é recomendado ciclos de congelamento e descongelamento de amostras de RNA, por serem muito sensíveis e degradarem com facilidade. Caso seja necessário maior tempo de armazenamento do RNA extraído, é recomendado que seja mantido em freezer (-80 °C).

A RT-LAMP foi padronizada utilizando um kit de extração de RNA viral comercial (Virus RNA+DNA Preparation Kit – DPK115 – CELLCO). No entanto, outros kits e extrações in house de RNA podem ser utilizadas sem prejudicar a eficácia do PROTHERA LAMP COVID 19.

COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

COLETA DA AMOSTRA DE NASOFARINGE

1. Introduzir o swab estéril na narina do paciente, paralelamente ao palato superior, até sentir a resistência da parede posterior da nasofaringe.
2. Girar o swab por alguns segundos delicadamente.
3. Retirar o swab da cavidade nasal do paciente e repetir o processo na segunda narina.
4. Retirar o swab da cavidade nasal e colocá-lo imediatamente no tubo contendo o tampão fornecido no kit.

COLETA DA AMOSTRA DE SALIVA

1. Escovar os dentes e permanecer em jejum de alimentos e líquidos por 30 minutos.
2. Coletar a saliva no tubo enviado junto com o kit, de acordo com o volume necessário para o método de extração de RNA utilizado.
3. Armazenar a saliva em geladeira.
4. Remover a saliva da geladeira no momento da etapa de extração, de acordo com o indicado pelo kit de extração de RNA utilizado.

PREPARO DA AMOSTRA

1. Proceder a etapa de extração de RNA de acordo com as instruções do kit utilizado.
2. Utilizar o RNA extraído imediatamente na reação de PROTHERA LAMP COVID 19 ou estocar o RNA em freezer (-20°C) até o momento do uso.

PROCEDIMENTO

1. Após a extração do RNA, retirar os microtubos com a mistura reacional do congelador. Fazer um movimento brusco para baixo em cada microtubo para assegurar que toda a mistura reacional esteja contida no fundo do tubo.
2. Aplicar 1 µL de água autoclavada em um microtubo, fechar e nomear como controle negativo.
3. Aplicar 1 µL de RNA extraído em cada um dos demais microtubos.
4. Agitar vigorosamente e inserir os tubos no termociclador/bloco de aquecimento conforme o protocolo a seguir:
 - a. 37°C por 2 min
 - b. 65°C por 40 min
 - c. 95°C por 2 min
5. Após a reação, retirar os tubos do termociclador/bloco e levar para o local de revelação.

REVELAÇÃO

1. Remover a solução reveladora do congelador ou geladeira deixar chegar à temperatura ambiente.
2. Agitar o frasco para homogeneizar a solução reveladora.
3. Adicionar 1 gota do revelador em cada microtubo, fechar e agitar brevemente.
4. Dispor os tubos sob uma superfície e observar a coloração.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

NEGATIVO: surgimento de uma coloração alaranjada.

POSITIVO: surgimento de uma coloração amarelada.

OBS: Adicionalmente, pode ser utilizada uma lâmpada UVA (luz negra: 320 nm – 400 nm) para observar a coloração. Nessa condição a amostra POSITIVA apresentará uma fluorescência.

A coloração pode ser comparada à foto da bula ilustrativa enviada com cada lote e/ou com os controles positivo e negativo realizado pelo operador.

Atenção para evitar contaminação!

O PROThERA LAMP COVID 19 deve ser realizado em 2 áreas fisicamente separadas e independentes para evitar contaminação, assim como material dedicado:

1. Extração e adição de amostras: área onde é realizado o preparo de amostra para obtenção do RNA e adição do RNA extraído à mistura reacional. Deve possuir micropipeta (1 – 2 µL) dedicada e ponteiros descartáveis.
2. Revelação: Local onde é realizada a abertura dos microtubos pós RT-LAMP para adição do reagente de revelação. É estritamente recomendado que seja feita em sala independente e que os materiais, como estante de microtubos, luvas e jaleco sejam dedicados. Além disso, é recomendado que os materiais e o operador não retornem para as salas de extração ou adição de amostra após trabalhar nesta área, sem a devida higienização.

OBS: para higienização dos materiais é necessário banho de solução de hipoclorito de sódio (alvejante) 10%. Jalecos devem ser lavados e luvas devem ser descartáveis.

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se realizar um controle negativo (água autoclavada) e positivo (RNA extraído do vírus inativado COVID-19 ou uma amostra sabidamente positiva) em cada lote de amostras para garantir que não ocorreu contaminação durante a realização do teste que poderia levar a um falso positivo ou falso negativo.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICAS

Para os estudos de sensibilidade e especificidade analítica, o PROThERA LAMP COVID 19 foi testado usando um painel de vírus inativado e amostras clínicas. Quando utilizado o painel de vírus inativado, os resultados mostraram que a sensibilidade do teste foi de 100% e a especificidade foi de 100%. Como amostras clínicas foram utilizadas salivas coletadas de pacientes suspeitos (com e sem sintomas). A caracterização das amostras foi feita utilizando kit comercial de PCR em tempo real, tendo como alvos duas sequências dos genes N e do gene RP como marcador interno. Foram avaliadas um total de 127 amostras de saliva, sendo 39 positivas para SARS-CoV-2 e 88 negativas. Os resultados obtidos com o PROThERA LAMP COVID 19 e com a técnica de PCR em tempo real, bem como a sensibilidade e a especificidade encontradas são mostrados nas tabelas a seguir. A sensibilidade encontrada foi de 85% e a especificidade é de 100%, o que está de acordo com o observado na literatura ^(3, 4).

Comparativo Covid 19		PCR em Tempo Real		Resultados Totais
		Positivo	Negativo	
PROThERA LAMP COVID 19	Positivo	33	0	33
	Negativo	6	88	94
Resultados Totais		39	88	127

Sensibilidade: 85%
Especificidade: 100%

Limite de detecção

Para o teste de limite de detecção analítica foram realizadas diluições seriadas variando a concentração de 1000 a 1 cópias do vírus/µL (cultura celular da cepa Sars-Cov-2 inativado). A seguir, procedeu-se com a extração do RNA e aplicação do PROThERA LAMP COVID 19 sendo que o kit foi capaz de detectar amostras contendo a partir de 1 cópia do vírus/µL.

PRECISÃO

Intra-ensaio:

Foram testadas 10 amostras de resultados conhecidos (6 não-reagentes e 4 reagentes) em 20 réplicas sob as mesmas condições. As amostras foram corretamente identificadas em 100% das vezes.

Inter-ensaio:

Foram testadas 10 amostras de resultados conhecidos (6 não-reagentes e 4 reagentes) em 20 réplicas sob condições diferentes (lotes, operadores e dias). As amostras foram corretamente identificadas em 100% das vezes.

INTERFERENTES

Foram realizados testes com diferentes reagentes potencialmente interferentes (incluindo medicamentos de venda livre) que poderiam influenciar na detecção do SARS-CoV-2 no teste. Cada substância foi testada em triplicata adicionando-as em amostras na ausência ou presença de SARS-CoV-2. Foram avaliadas as seguintes substâncias: mucina, sangue humano, gel nasal, gotas nasais, spray nasal, spray para dor de garganta, pastilha para garganta, medicamento antiviral, medicamento gripal, antibiótico, pomada nasal, medicamento para alergia, medicamento antiinflamatório, tabaco, álcool, vitamina C, alimento, creme dental, enxaguante bucal e caféina.

Nenhuma interferência foi observada com as substâncias avaliadas.

REAÇÕES CRUZADAS

Para a avaliação de possíveis reações cruzadas do produto, submetemos o kit à amostras positivas para infecção por Adenovírus, Rhinovírus/Enterovírus, Vírus Sincicial Respiratório (VSR), MERS-CoV, Coronavírus OC43, Coronavírus 229E, Vírus Parainfluenza Tipo 1, Tipo 2, Tipo 3 e Tipo 4a, Influenza A H3N2, Influenza A H1N1 e Influenza B. Também foi avaliada a reação cruzada com diferentes microrganismos agentes de doenças de alta prevalência e flora normal ou patogênica que são razoavelmente prováveis de serem encontrados em amostras clínicas: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus salivarius*, *Candida albicans*.

Nenhuma reatividade cruzada foi observada com as doenças listadas acima.

LIMITAÇÕES DE USO

O PROThERA LAMP COVID 19 é um teste de triagem para determinar qualitativamente a presença do vírus SARS-CoV-2 em amostras de saliva e swab. O valor quantitativo não pode ser determinado com esse teste. A intensidade da cor não está necessariamente relacionada à concentração de vírus na amostra.

O PROThERA LAMP COVID 19 somente indicará a presença de vírus SARS-CoV-2 nas amostras, não devendo ser usado como critério exclusivo para o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2. Como em todos os testes diagnósticos, os resultados devem ser interpretados junto com outras informações clínicas disponíveis para o médico.

Se o resultado do teste for negativo e os sintomas clínicos persistirem, um teste adicional após alguns dias ou realizado com outros métodos clínicos é recomendado. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por SARS-CoV-2.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Não utilizar os reagentes caso a embalagem de transporte esteja em temperatura ambiente, e/ou caso os microtubos ou solução reveladora se encontre abertos ou danificados. Neste caso, entre em contato com a Khayrós.
2. Todo material é destinado para ser utilizado por profissional treinado.
3. Limpar as áreas de trabalho antes e após o uso de cada lote de amostras, com álcool 70% e/ou solução de hipoclorito de sódio (alvejante) 10%.

4. Todo material de trabalho fornecido ou não (estantes, tubos, luvas, pipetas, ponteiros) é exclusivo para cada área (extração e adição de amostras e revelação) de acordo com a necessidade.
5. É obrigatório o uso de luvas descartáveis, dedicadas para cada uma das áreas e trocá-las após o uso.
6. Usar ponteiros descartáveis e demais descartáveis – dedicadas para cada uma das áreas, quando necessária.
7. Micropipetas, quando necessárias, dedicadas e higienizadas ao final do uso com álcool 70% e/ou solução de hipoclorito de sódio (alvejante) 10%.
8. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.
9. Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.
10. Não usar o kit após a data de validade.
11. Ler cuidadosamente as instruções de uso antes de realizar o teste.
12. Não expor o kit a temperatura fora da recomendada, pois isto causará deterioração irreversível.
13. Não usar o kit quando qualquer componente apresentar característica visual em desacordo com a especificada na FISPQ do produto.
14. Manipular os componentes mantendo os cuidados habituais de segurança. Todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
15. Descartar todo o material conforme a regulamentação local (RDC nº 222 de 29/03/18 da ANVISA).
16. Conservar, manusear e descartar os materiais utilizando as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

AVISO IMPORTANTE

Considerando que os testes podem ser afetados por fatores ambientais e/ou erro do usuário e que os testes são realizados em ambiente fora do controle do fabricante, a Khayrós não se responsabiliza por quaisquer implicações decorrentes direta ou indiretamente de resultados obtidos com o uso incorreto deste produto.

BIBLIOGRAFIA

1. NOTOMI, T; MORI, Y; TOMITA, N; KANDA, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. JOURNAL OF MICROBIOLOGY, v. 53 (1), p. 1-5, 2015.
2. MENDES, G; OLIVEIRA, K; BORBA, J; OLIVEIRA, T; FIACCADORI, F; NOGUEIRA, M; BAILÃO, A; SOARES, CM; CARRILHO, E; DUARTE, G. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 30, p. 1841-1849, 2019.
3. XUEJIAO, H; QIANYUN, D; JUNMIN, L; JIERONG, C; ZIXIA, W; XIQIN Z; ZHIXIN, F; HAIJIAN, L; YUNHU, Z; PAN, Y; WENMIN, L; XIAOMING, W; SHAN, L; LEI, Z; TIEYING, H. Development and clinical application of a rapid and sensitive LAMP test for SARS-CoV-2 infection. CLINICAL SCIENCE AND EPIDEMIOLOGY, v. 5 (4), p. 1 – 12, 2020.
4. LAMB, LE; BARTOLONE, SN; WARD, E; CHACELLO, MB. Rapid detection of novel Coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification. Plos One, v.12, p. 1-15, 2020.

SIMBOLOGIA

-  Ler as instruções de uso
-  Data de validade
-  Fabricado por
-  Diagnóstico *in vitro*
-  Lote
-  Número do catálogo
-  Proteger do calor
-  O conteúdo é suficiente para (n) testes
-  Uso único