



KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (EDx) Bio-Manguinhos

Aprovado para Uso Emergencial

(1 x 96 reações)
Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (EDx) Bio-Manguinhos

(1 x 96 REAÇÕES)
Uso em diagnóstico *in vitro*

Aprovado para Uso Emergencial

1. NOME COMERCIAL

KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (EDx) - Bio-Manguinhos

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular SARS-CoV-2 - Bio-Manguinhos, se baseia na tecnologia de PCR em tempo Real e é indicado para o processamento de amostras clínicas, previamente submetidas a etapa de extração de ácidos nucleicos. O produto foi desenvolvido para ser realizado em ensaio duplex da transcrição reversa, amplificação, detecção e diferenciação do material genético (RNA viral) do Coronavírus.

O Kit Molecular SARS-CoV-2 - Bio-Manguinhos é aplicado no diagnóstico e vigilância epidemiológica do Coronavírus.

Produto destinado para uso em diagnóstico *in vitro*.

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E MANUSEIO

Conjunto de Reagentes: -30 °C a -10 °C.

Obs.: Todos os reagentes deverão ser armazenados nas temperaturas indicadas no rótulo externo, desde o ato do recebimento até a utilização do conjunto.

4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

A metodologia para detecção molecular do vírus SARS-CoV-2 tem como base a plataforma PCR em tempo real.

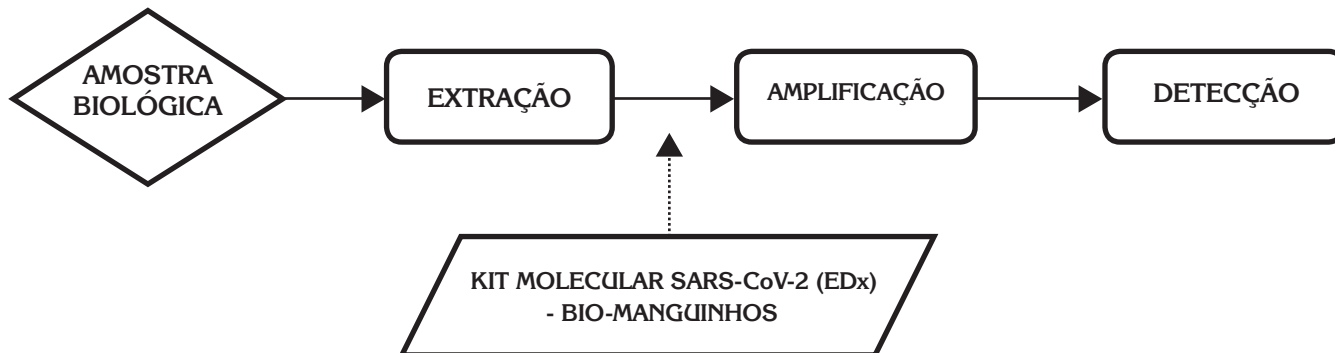
O fluxo metodológico segue abaixo:

(a) etapa prévia de **extração** de ácido nucléico da amostra biológica

(b) **amplificação** do ácido nucléico;

(c) **detecção** do ácido nucleico por RT-PCR em tempo real.

Esquema do Teste:



• Etapa de Extração

Opções

Manual: Vide Manual de Instruções do fabricante do Kit de Extração.

Nota: Se os controles e as amostras extraídas (RNA) não forem amplificados imediatamente após a extração, deverão ser armazenados de -30 °C a -10 °C por no máximo 15 dias. Após esse período os mesmos devem ser descartados

• Etapa de Amplificação e Detecção

As sequências de iniciadores e sondas do Kit Molecular SARS-CoV-2 (EDx) - Bio-Manguinhos são do Protocolo de Berlim (Corman VM et al, 2020).

A transcrição reversa do RNA em cDNA antecede à amplificação. A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência é usada para determinar a presença de SARS-COV-2 e de RNase P. O equipamento utilizado na etapa de amplificação e de detecção é o 7500 Real Time PCR System.

5. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

Este produto deve ser utilizado com RNA extraído a partir de aspirado de nasofaringe. O RNA proveniente de outras amostras podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas e/ou do laboratório/usuário, visando a potencial detecção de material genético do Coronavírus (SARS-CoV2).

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

6.1 Relação dos componentes fornecidos com o produto:

CONJUNTO DE REAGENTES	COMPONENTES	VOLUME (µL)
CONTROLES	Controle Negativo	1 frasco com 50 µL
	Controle Positivo	1 frasco com 50 µL
AMPLIFICAÇÃO	Mistura de PCR	1 frasco com 880 µL
	Mix E/RP	1 frasco com 250 µL

6.2 Materiais necessários não fornecidos:

- Kit de extração de ácido nucléico
- Acessórios para automação das etapas de extração e de preparo da Mistura de RT-PCR.
- Luva descartável sem talco
- Sacos de descarte de lixo biológico
- Microcentrífuga
- Ponteiras para uso único, com filtro e estéreis, de 20 μL , 100 μL , 200 μL e 1000 μL
- Placa óptica de 96 reações.

7. VERSÃO DO SOFTWARE BIOLAUDOS

A partir da versão 2.0.0

8. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Conjunto de Reagentes: -30 °C a -10 °C.

Obs.: Todos os reagentes deverão ser armazenados nas temperaturas indicadas no rótulo externo, desde o ato do recebimento até a utilização do conjunto.

Não são de responsabilidade do fabricante:

- Insumos armazenados fora da temperatura especificada;
- Os procedimentos da etapa de extração;
- Ocorrência de contaminação ambiental (amplicon);

Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização do kit de acordo com os procedimentos de cada Laboratório.

9. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO:

9.1 Procedimento de Amplificação - Real Time 7500

Retirar do freezer os reagentes descritos abaixo e aguardar o descongelamento, dos mesmos, à temperatura ambiente;

Antes do preparo da mistura **E/RP**, centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos;

Preparo Manual das misturas de RT-PCR **E/RP**:

- Identificar um tubo de 1,5 mL; com o respectivo nome da mistura de RT-PCR **E/RP**.

- Adicionar ao tubo o volume de reagentes de acordo com o número de reações:

MISTURA DE RT-PCR **E/RP**

CONJUNTO DE REAGENTES	VOLUME (μL)	
	1 REAÇÃO	96 REAÇÕES
Mistura de PCR	7,8	780
Mix E/RP	2,2	220

- Homogeneizar a mistura de RT-PCR **E/RP** com uma pipeta (evitando formação de bolhas);

- Manter refrigerado até a finalização do preparo de todas as misturas de RT-PCR.

- Distribuir a mistura de RT-PCR **E/RP** na placa de amplificação, de acordo com a sugestão de esquema abaixo:

- Adicionar 10 μL da mistura de RT-PCR **E/RP** nos poços da placa óptica compreendidos entre A1 a H12.

- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes:

- Adicionar 5 μ L de Controle Negativo no G12;
- Adicionar 5 μ L de Controle Positivo no poço H12;
- Adicionar 5 μ L de amostras de pacientes nos poços compreendidos entre A1 a F12.

- Desenho da placa de amplificação para fazer 1x96 reações:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	CNEG
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	CPOS

Legenda: **CNEG** – Controle Negativo | **CPOS** – Controle Positivo

- Após a adição na placa óptica da mistura de RT-PCR E/RP, dos controles e das amostras dos pacientes, utilizar o vórtex para homogeneizar as misturas e selar a placa óptica com selo óptico.
- Centrifugar a placa selada e iniciar a reação de RT-PCR no equipamento 7500 Real Time PCR System.

9.2 Amplificação e Detecção

Ligar o computador do equipamento 7500 Real Time PCR System.

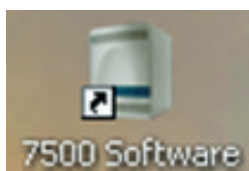
Ligar o equipamento 7500 Real Time PCR System.

Centrifugar a placa óptica (spin).

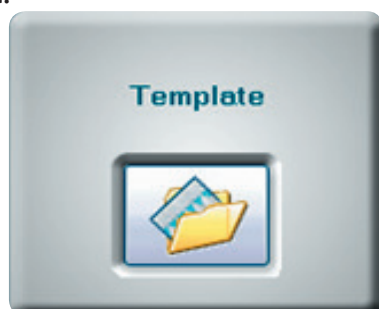
Colocar a placa óptica no equipamento de detecção 7500 Real Time PCR System.

Evitar tocar no fundo da placa. Certificar-se de que a posição A1 da placa está no canto superior esquerdo;

Clicar no ícone 7500 Software;



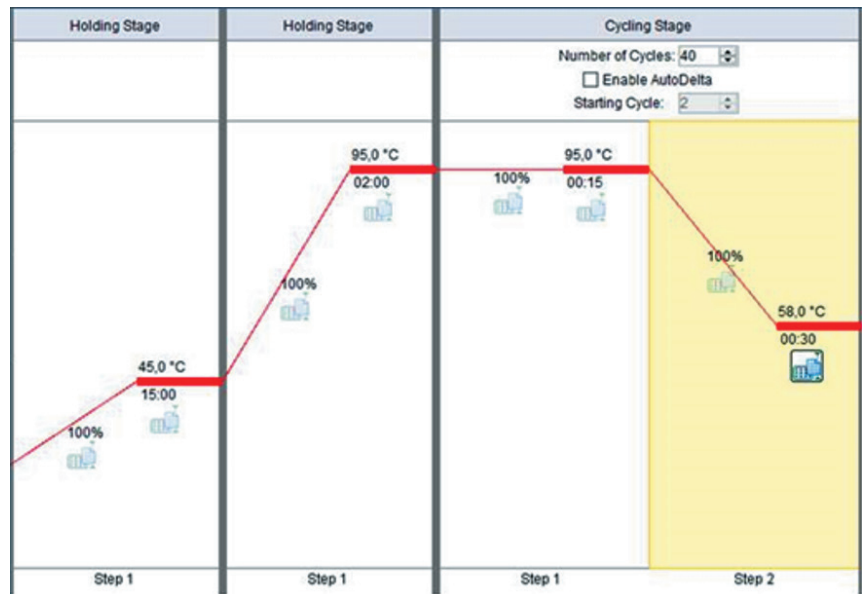
Após a inicialização do software, clicar no ícone *Template* (abaixo). Na janela que abrirá, selecionar o template **SARS_Cov_E96D.edt**.



Abrir o arquivo **SARS_Cov_E96D.edt** e salvá-lo, antes de iniciar a corrida.

Parâmetros de Análise:

ALVO	REPORTER	QUENCHER
E	FAM	NFQ
RP	VIC	NFQ



ALVO	THRESHOLD	BASELINE START	BASELINE END
E	0,2	AUTO	AUTO
RP	0,15	AUTO	AUTO

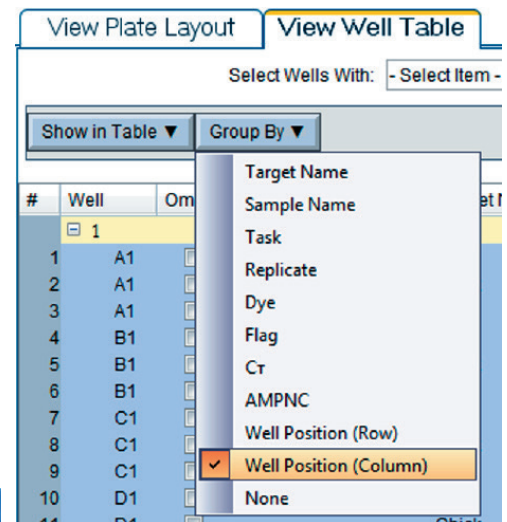
Nomear a corrida e clicar no ícone **SAVE**



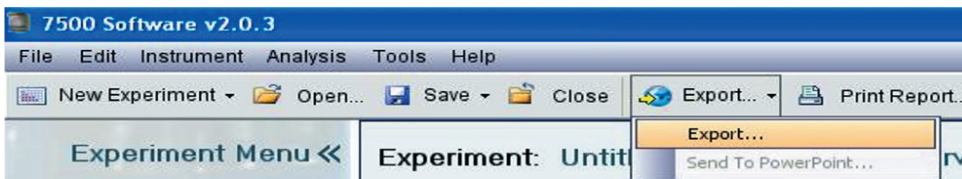
Clicar no ícone **Start Run**.



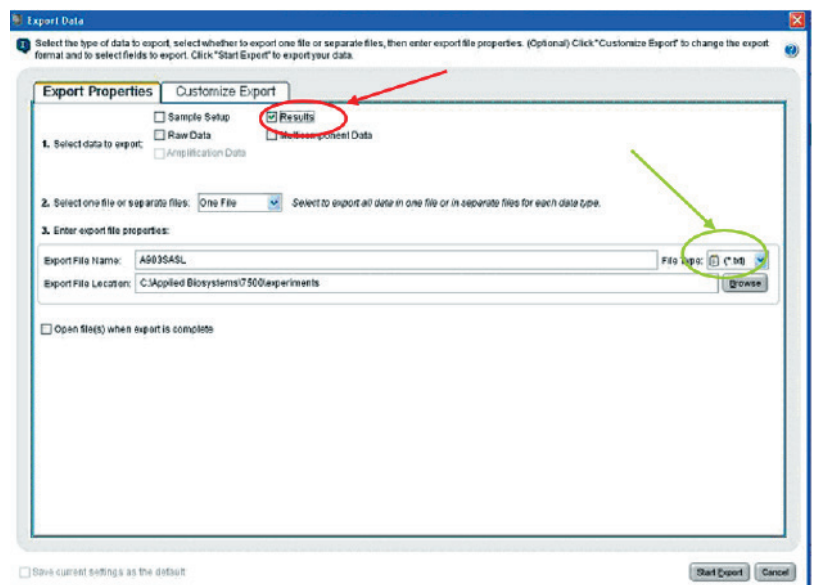
Após o fim da corrida, clicar no ícone **Analyse** e clicar na aba **View Well Table**. Clicar em **Group By** e selecionar **Well Position (column)**.



Para gerar o arquivo .txt, clicar no ícone **Export**.



Abrirá a janela abaixo. Confirmar se somente **Results** estiver selecionado (círculo vermelho) e colocar o mesmo nome do arquivo em **Export File name** e alterar a opção **File type** para ***.txt** (círculo verde). Em **Browse** (círculo verde) selecionar área de trabalho/desktop e selecionar pasta Sars CoV2_E96D_txt.



Clicar em **Start Export**.

Start Export

Clicar em **Close Export Tool**.

Fechar o software.

Copiar o arquivo.txt em um CD ou DVD.

10. GERAÇÃO DE LAUDO

10.1 Geração do Laudo Coletivo (obrigatório)

Clicar no ícone do Software Biolaudos;




Fazer o login informando o CPF e a senha;

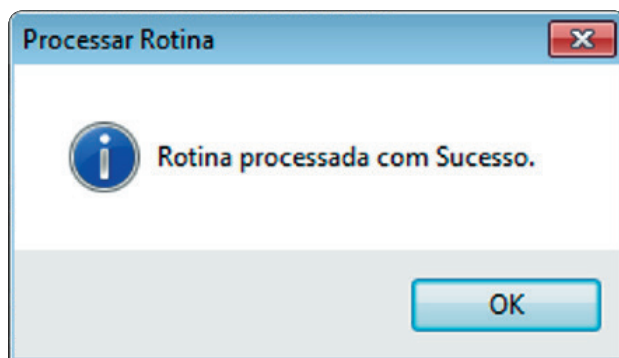
Clicar em Processar **Rotina**;

Colocar o número do Lote e validade do Lote (campo de preenchimento obrigatório) e clicar **Avançar**;

Conferir se o teste é o Kit SARS-CoV-2 (EDx) e escolher o tipo de material. Clicar em **Avançar**;

Clicar no ícone  e selecionar o arquivo txt referente a rotina a ser processada na área de trabalho/desktop pasta Sars Co*2_E96D_txt;

Clicar em **Processar**;



Clicar em **Fechar**;

Clicar em **Consultar Rotina**;

Clicar em **Consultar**;

Clicar duas vezes no ícone  correspondente a rotina a ser analisada;

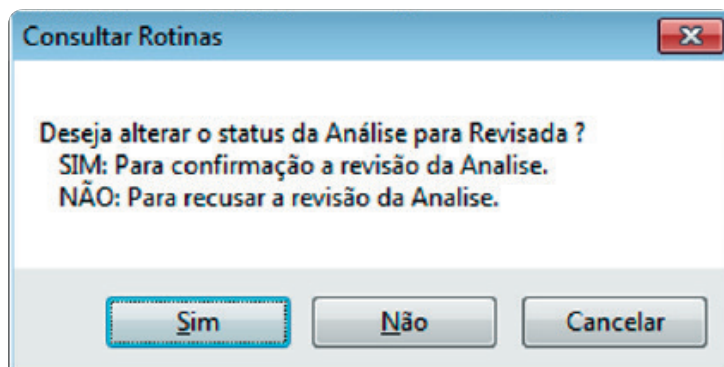
O laudo está disponível no ícone **Resultados**;

Para preencher o campo de identificação das amostras, clicar no ícone **Ler Códigos** e digitar ou ler os códigos de barras das amostras seguindo o mapa de aplicação;

Após, a identificação das amostras, há a possibilidade de importar os dados das amostras do GAL. Para isso, clicar em **Importar do GAL**.

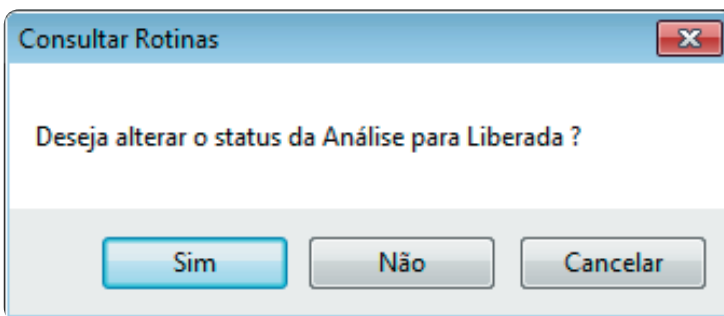
Após revisão do laudo, clicar no ícone **Revisar** e clicar em **SIM** para alterar o Status para revisada;

Colocar a senha do **Revisor**;



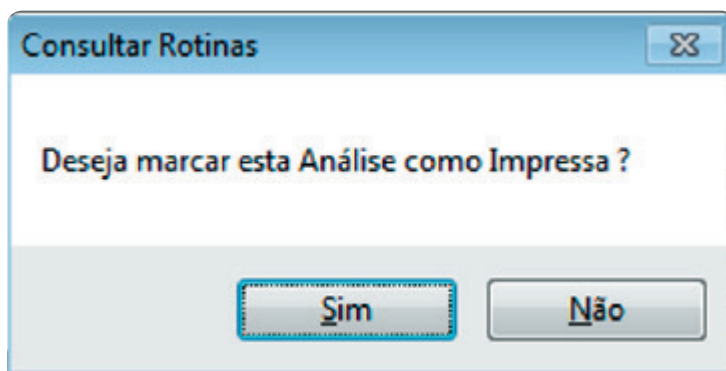
Se o aprovador for diferente do revisor, o aprovador tem que entrar no sistema com seu login e CPF. Entrar na rotina desejada e clicar no ícone **Aprovar**;

Clicar em **SIM** para alterar o Status para Liberada;



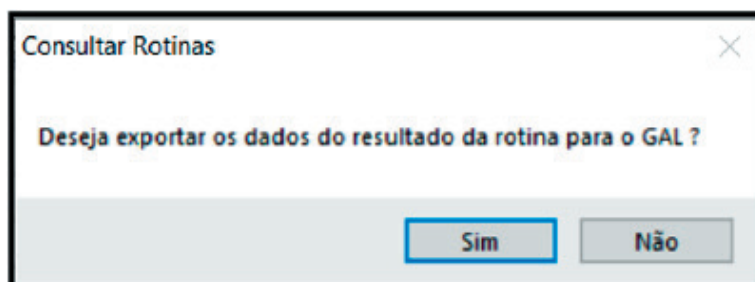
Colocar a senha do Aprovador;

Clicar em **Marcar como Impresso** caso o laudo tenha sido impresso;



O laudo fica disponível no ícone **Resultados** e a relação dos pacientes testados no ícone **Pacientes**; Os resultados podem ser exportados para o Sistema GAL. Clicar no ícone **Exportar para GAL**.

Clicar em **Sim** para exportar os dados da rotina para o GAL



10.2 Geração do Laudo Individual (opcional)

Clicar 2 vezes no ícone ;

Preencher os dados obrigatórios marcados em negrito: **data da coleta**, **data do recebimento**, **material**, **nº da visita**, **nome completo**, **sexo** e **nascimento**;

Clicar em **Gravar**;

Para visualizar o laudo, clicar 2 vezes no ícone .

11. OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

11.1 Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

CONTROLE	CT	RESULTADO
NEGATIVO	Não detectável	Rotina Válida
	Ct ≤ 40	Rotina inválida. Repetir o teste, possível contaminação
POSITIVO	Ct ≤ 37	Rotina Válida
	Ct > 37	Rotina inválida. Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

11.2 Interpretação dos Resultados:

ALVOS	CT	RESULTADO
E	Ct ≤ 40	Detectável (+)
	Ct > 40	Não Detectável (-)
RP	Ct ≤ 35	Detectável (+)
	Ct > 35	Não Detectável (-)

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS		
E	RP	RESULTADO
+	+ ou -	Sars-CoV 2 detectável
-	+	Sars-CoV 2 não detectável
-	-	RP não detectável, repetir extração e RT-PCR

• Todos os resultados deverão ser analisados de acordo com os critérios descritos no item 11.1 -Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo e 11.2 - Interpretação de Resultados”.

• Valor de Ct do alvo RP acima de 35,0 é indicativo de possíveis problemas na extração ou da qualidade da amostra. Neste caso, a extração deverá ser repetida.

• No caso de repetição do ensaio, mantendo-se o resultado inconclusivo, a amostra deverá ser encaminhada para o Laboratório de Referência de Rede Vigilância de Influenza do SVS/MS.

12. USUÁRIO PRETENDIDO

Profissional técnico capacitado para processamento de amostras clínicas, utilização de insumos/kit e equipamentos necessários para o diagnóstico molecular, com base na tecnologia de PCR em Tempo Real.

13. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

Evitar utilizar swabs alginatados ou de algodão para a coleta, pois interfere na reação de PCR.

Foram feitas análises de amostras positivas para Influenza A e B, HIV, HCV, HBV, Febre Amarela, Zika, Chikungunya e/ Dengue e não houve reação cruzada para estes vírus.

Não foi observada nenhuma interferência ou inibição em amostras com EDTA, hemólise, heparina, lipemia e/ou ictéricas (Acrometrix Inhibition Panel -Thermo Scientific).

14. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

14.1 Sensibilidade analítica

A análise de PROBIT (IC de 95%) indicou uma sensibilidade para o alvo E: LOD de 2,48 cópias/reação (50% positividade) e de 8,87 cópias/reação (95% positividade).

Sumarizando, estabeleceu-se o limite de detecção para Coronavírus: 50 cópias/reação.

15. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Ao manusear qualquer um dos reagentes observe as precauções necessárias. A qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento às boas práticas de laboratório tais como:

- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) tais como luvas descartáveis (sem talco) e jaleco em todas as etapas do teste;
- Após o uso, desprezar ponteiros, tubos, placas, reagentes, insumos/produtos no descarte de risco biológico;
- Desprezar a placa óptica, após a amplificação e detecção, em descarte biológico;
- Todas as sobras de reagentes deverão ser descartadas após a utilização de cada módulo do kit, de acordo com os procedimentos de cada laboratório;
- Não usar reagentes com a validade vencida;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes.
- O teste deve ser usado somente para monitoramento in vitro e USO PROFISSIONAL, de acordo com as instruções fornecidas no kit.

16. DESCARTE DO PRODUTO

Após o uso os componentes do produto devem ser descartados em recipientes destinados ao lixo biológico.

Os reagentes de extração automatizada devem ser descartados de acordo com a orientação do fabricante.

17. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e instalações em acordo com normas internas de Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório. O fabricante garante a qualidade do kit mediante seu uso adequado, descrito nestas instruções de uso, bem como orientações dadas durante o treinamento fornecido ao usuário.

18. RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Registro MS 80142170045

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES n°: 21433-02.

Fabricado e Distribuído por:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

CNPJ 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ

CNPJ 33.781.055/0001-35

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

SAC: 08000.210.310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

Para versão impressa desse manual, entre em contato com SAC.

19. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Chaolin Huang*, Yeming Wang*, Xingwang Li *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 24/01/2020.
- Dawei Wang, Bo Hu, Chang Hu *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. Original investigation, *JAMA*. 07/02/2020.
- Leen Vijgen, Elien Moës, Els Keyaerts, Sandra Li, and Marc Van Ranst. A Pancoronavirus RT-PCR Assay for Detection of All Known Coronaviruses. *Methods in Molecular Biology*, vol. 454: SARS- and Other Coronaviruses, Edited by: D. Cavanagh.
- Na Zhu, Dingyu Zhang, Wenling Wang *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. Brief report, *The new england journal of medicine*. 24/01/2020.
- Poon L, Chu D, Peiris M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. School of Public Health, The University of Hong Kong, Hong Kong. 2020.
- Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten Charité Virology, Berlin, Germany. Olfert Landt, Tib-Molbiol, Berlin, Germany. Marion Koopmans, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands. Maria Zambon, Public Health England, London. Diagnostic detection of Wuhan Coronavirus 2019 by real-time RTPCR. V1, 13/01/2020.
- Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten Charité Virology, Berlin, Germany. Olfert Landt, Tib-Molbiol, Berlin, Germany. Marion Koopmans, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands. Maria Zambon, Public Health England, London. Diagnostic detection of Wuhan Coronavirus 2019 by real-time RTPCR. V2, 17/01/2020.