



KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (E/RP) Bio-Manguinhos

Aprovado para Uso Emergencial

(24 REAÇÕES)

Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (E/RP) Bio-Manguinhos

Aprovado para Uso Emergencial

(24 REAÇÕES)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1 - NOME COMERCIAL

KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (E/RP) - Bio-Manguinhos

2 - FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular SARS-CoV-2 (E/RP) - 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 se destina para a transcrição reversa, amplificação, detecção e diferenciação do material genético (RNA viral) do Coronavírus.

O Kit Molecular SARS-CoV-2 (E/RP) - Bio-Manguinhos se destina ao 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.

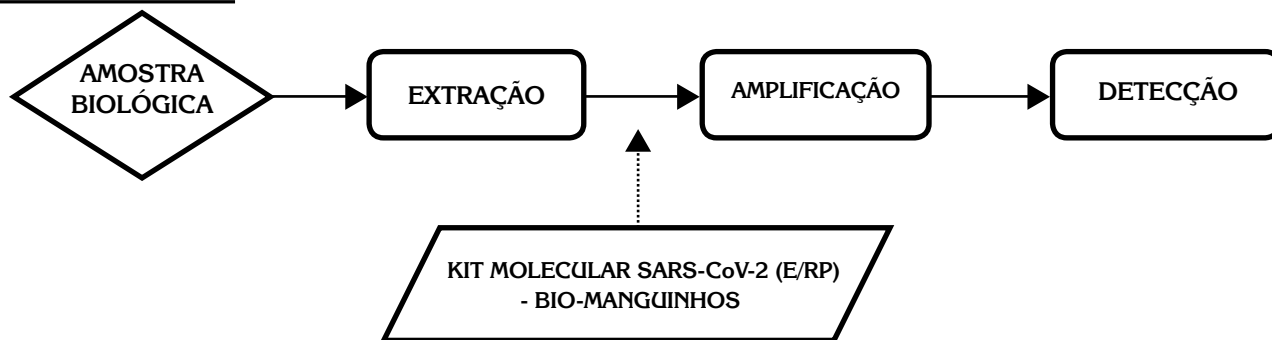
4 - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

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 (E/RP) 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 PRE-SERVAÇÃO

Amostras de aspirado de nasofaringe e/ou de swab triplo combinado. Outras amostras podem ser utilizadas de acordo com recomendações médicas ou do laboratório/usuário, visando a potencial detecção de material genético do Coronavírus.

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 30 µL
	Controle Positivo	1 frasco com 30 µL
AMPLIFICAÇÃO	Mistura de PCR	1 frasco com 250 µL
	ROX	1 frasco com 10 µL
	MIX E	1 frasco com 180 µL
	MIX RP	1 frasco com 180 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 das misturas **E** e **RP**, centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos;

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

- Identificar dois tubos de 1,5mL; cada um com o respectivo nome das misturas de RT-PCR (**E** e **RP**).
- Adicionar a cada tubo o volume de reagentes de acordo com o número de reações:

Mistura de RT-PCR **E**

CONJUNTO DE REAGENTES	VOLUME (µL)		
	1 REAÇÃO	12 REAÇÕES	24 REAÇÕES
Mistura de PCR	3,75	56,25	101,25
Rox	0,08	1,2	2,16
Mix E	6,18	92,7	166,86

Mistura de RT-PCR **RP**

CONJUNTO DE REAGENTES	VOLUME (µL)		
	1 REAÇÃO	12 REAÇÕES	24 REAÇÕES
Mistura de PCR	3,75	56,25	101,25
Rox	0,08	1,2	2,16
Mix RP	6,18	92,7	166,86

- Homogeneizar as misturas de RT-PCR **E** e **RP** com uma pipeta (evitando formação de bolhas);
- Manter refrigerado até a finalização do preparo de todas as misturas de RT-PCR.
- Distribuir as misturas de RT-PCR **E** e **RP** na placa de amplificação, de acordo com a sugestão de esquema abaixo:

- Adicionar 10 µL da mistura de RT-PCR **E** nos poços da placa óptica compreendidos entre A1 e H1; A3 a H3; A5 a H5;
- Adicionar 10 µL da Mistura de RT-PCR **RP** nos poços da placa óptica compreendidos entre A2 e H2; A4 a H4; A6 a H6;

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

- Adicionar 5 μ L de Controle Negativo nos poços G5 e G6;
- Adicionar 5 μ L de Controle Positivo nos poços H5 e H6;
- Adicionar 5 μ L de amostras de pacientes nos poços compreendidos entre A1 e H1; A3 a H3; A5 a F5. / Mistura de PCR E;
- Adicionar 5 μ L de amostras de pacientes nos poços compreendidos entre A2 e H2; A4 a H4; A6 a F6 / Mistura de PCR RP;

- Desenho da placa de amplificação para 1x24 reações de E e 1x 24 reações de RP.

	Mix E	Mix RP	Mix E	Mix RP	Mix E	Mix RP						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G					CNEG	CNEG						
H					CPOS	CPOS						

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

- Após a adição na placa óptica das misturas de PCR E e RP, dos controles e das amostras dos pacientes, utilizar o vortex 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.

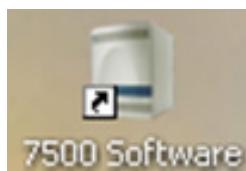
Ligar o equipamento 7500 Real Time PCR System.

Centrifugar a placa óptica (*spin*).

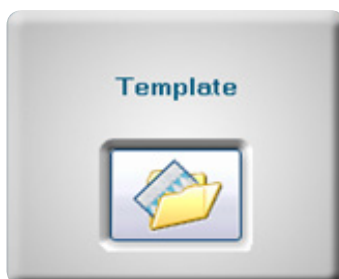
Colocar a placa óptica no equipamento de detecção 7500 Real Time PCR System.

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

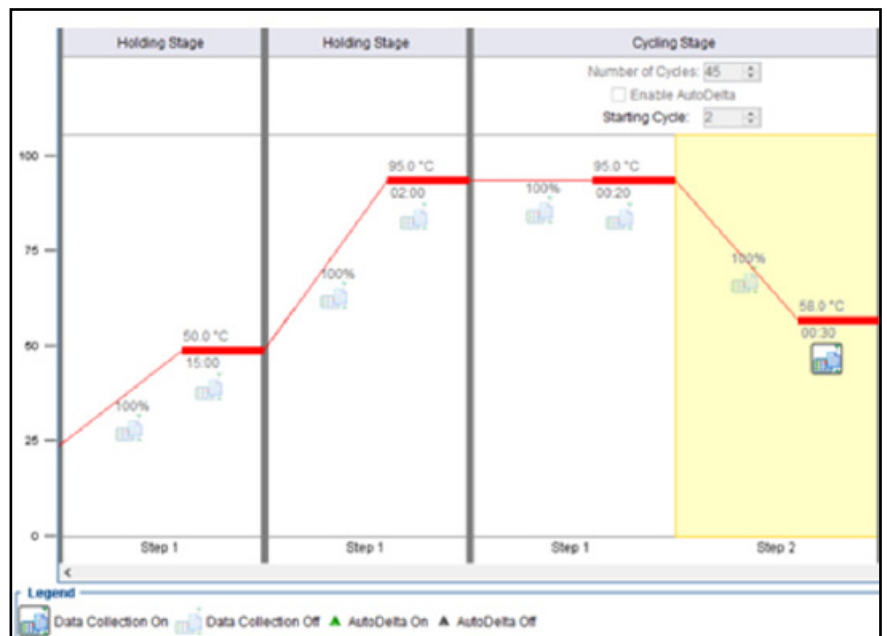
Clicar no ícone **7500 Software**;



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

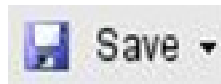


Abrir o arquivo **SARS_Cov_E_RP.edt** e salvá-lo, antes de iniciar a corrida.



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

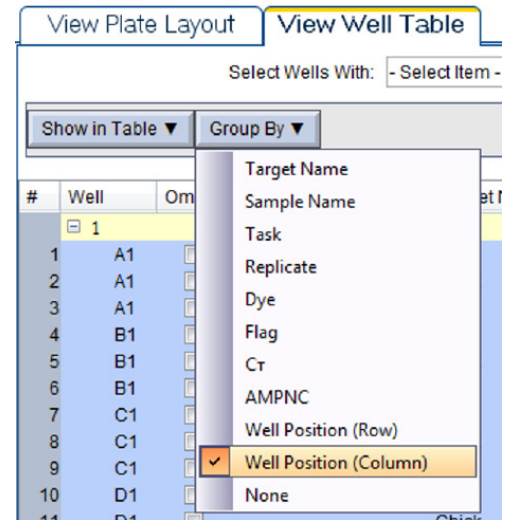
Nomear a corrida e clicar no ícone **SAVE**;



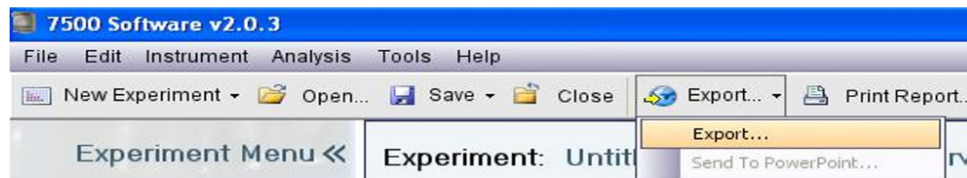
Clicar no ícone **Start Run**;



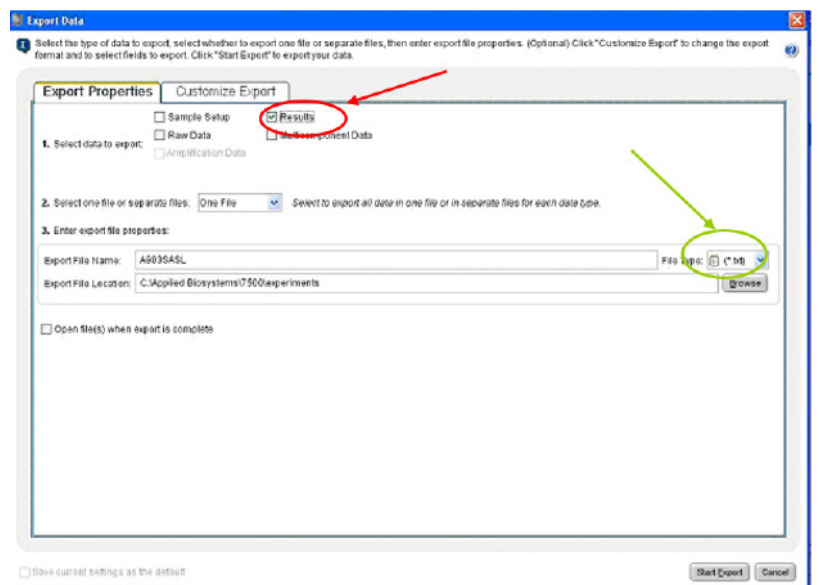
Após o fim da corrida, clicar no ícone **Analyse** e clicar na aba **View Well Table**. Clicar em Group By e selecionar **Well Position (column)**.



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_E_RP_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;

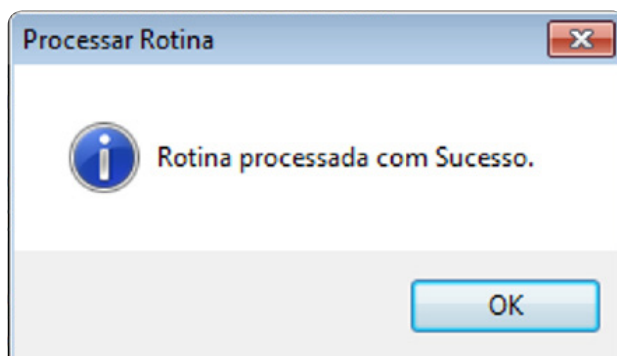
Clicar em Processar **Rotina**;

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 (E/RP) 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 CoV2_E_RP_txt;

Clicar em **Processar**;



Clicar em **Fechar**;

Clicar em **Consultar Rotina**;

Clicar em **Consultar**;

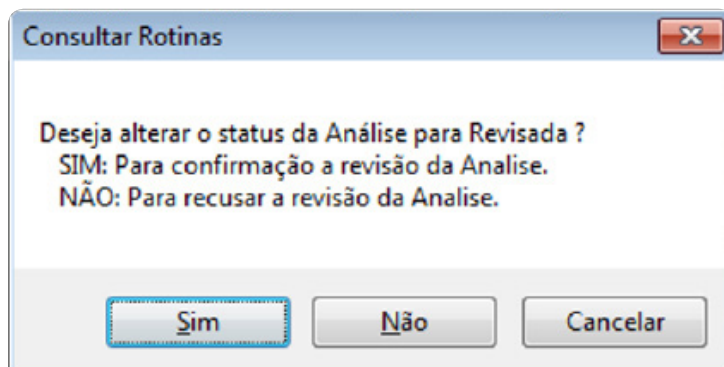
Clicar duas vezes no ícone  correspondente a rotina a ser analisada;

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**.

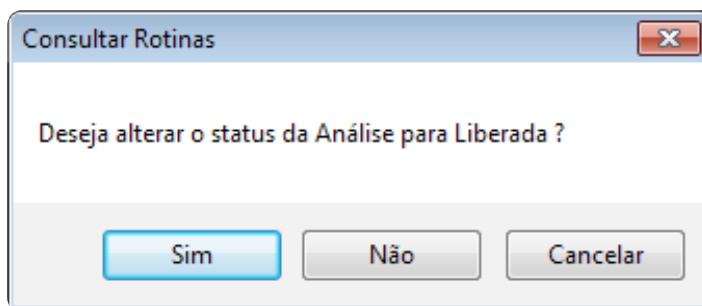
Após revisão do laudo, clicar no ícone **Revisar** e clicar em **SIM** para alterar o Status para revisada;



Colocar a senha do **Revisor**;

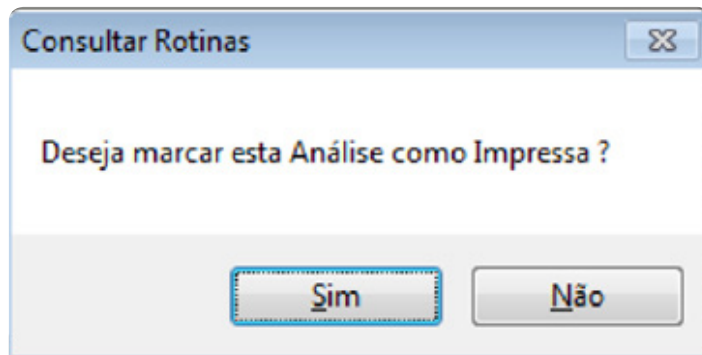
Se o aprovador for diferente do revisor, o aprovador tem que entrar no sistema com seu login e CPF. Entrar na rotina desejada e clicar no ícone **Aprovar**;

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



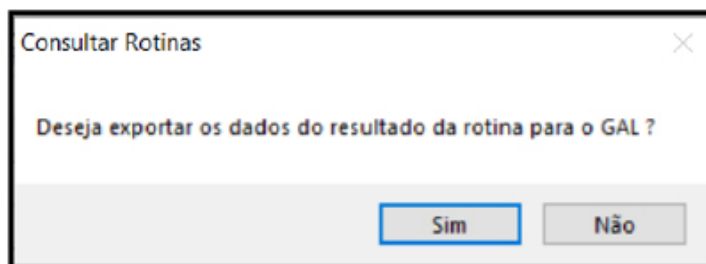
Colocar a senha do Aprovador;

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	INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS		
E	Ct ≤ 37	Detectável (+)	E	RP	RESULTADO
	Ct > 37	Não Detectável (-)	+	+ ou -	Sars-CoV 2 detectável
RP	Ct ≤ 35	Detectável (+)	-	+	Sars-CoV 2 não detectável
	Ct > 35	Não Detectável (-)	-	-	RP não detectável, repetir extração e RT-PCR
			37 < Ct ≤ 45	+	Inconclusivo, repetir RT-PCR
			37 < Ct ≤ 45	-	Inconclusivo, 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.

• Não é esperada amplificação do Controle Positivo no MIX RP.

• 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 e não houve reação cruzada para estes vírus.

14 - CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

14.1 Sensibilidade analítica

A análise de PROBIT (IC de 95 %) indicou uma sensibilidade para o alvo E: LOD de 0,97 cópias/reação (50 % positividade) e de 1,99 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 80142170041

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES nº: 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 deste manual, entre em contato com o 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, Elie 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.
- OPAS, Diagnóstico por Laboratorio de COVID-19. Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19. 30 de março de 2020.