



KIT MOLECULAR SC2 (E/N)

Bio-Manguinhos

Teste para detecção de SARS-CoV-2 (96 Reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT MOLECULAR SC2 (E/N)

Bio-Manguinhos

Teste para detecção de SARS-CoV-2

(96 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

KIT MOLECULAR SC2 (E/N).

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular SC2 (E/N) Bio-Manguinhos, baseia-se 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 desenvolvido é um ensaio triplex que detecta e diferencia duas regiões gênicas, distintas, do SARS-CoV-2: envelope (E) e nucleocapsídeo (N), além do controle interno (CI). O CI, endógeno, é um gene constitutivo humano - RNase P (RP). O Kit Molecular SC2 (E/N) - Bio-Manguinhos se destina ao diagnóstico e vigilância epidemiológica.

Produto destinado exclusivamente 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, observando a data de validade.

4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

A metodologia para detecção e amplificação dos alvos do Kit SARS-CoV-2 (E/N) tem como base a metodologia de PCR em tempo real.

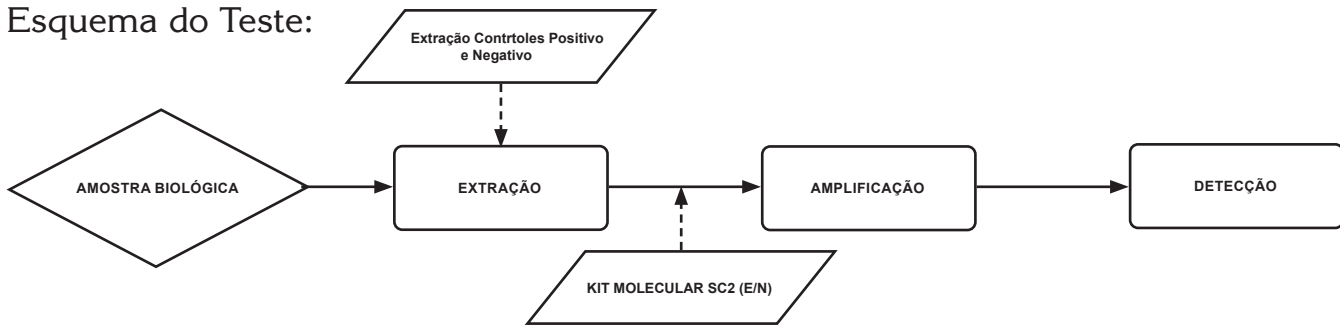
Segue, abaixo, o fluxo metodológico:

(a) Etapa prévia de **extração** de ácido nucleico da amostra biológica com inserção dos controles negativo e positivo;

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

(c) **Deteção** do ácido nucléico por RT-PCR em tempo real.

Esquema do Teste:



•Etapa de Extração:

Vide Manual de Instruções do fabricante do Kit de Extração.

Inserir ao protocolo de extração os controlos negativo e positivo do Kit Molecular SC2 (E/N) Bio-Manguinhos.

Nota: Se os controlos negativo e positivo e as amostras extraídas (RNA) não forem amplificados imediatamente após a extração, deverão ser armazenados de -30 °C a -10 °C por até 30 dias.

•Etapa de Amplificação e Deteção:

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 dos genes *E* e *N* do vírus SARS-COV-2 e do alvo *RNAse P*, controle interno da reação. Os equipamentos que podem ser utilizados na etapa de amplificação e de detecção são: ABI 7500 Real Time PCR System, Quant Studio 6 ou Quant Studio 7, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, em placas de 96 poços.

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 e/ou RNA extraído a partir de amostras coletadas por swab triplo combinado. 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.

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

6.1. Relação dos componentes fornecidos com o produto:

CONJUNTOS DE REAGENTES	Componentes	VOLUME (µL)
Amplificação	MISTURA DE PCR	1 FRASCO COM 450
	MIX (E/N/RP)	1 FRASCO COM 160
Controles	Controle Negativo	1 frasco com 400
	CONTROLE POSITIVO	1 FRASCO COM 400

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;
- Ponteiros para uso único, com filtro e estéreis, de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL;
- Pipetas de 20µL, 100µL, 200µL e 1000µL;

- Microtubo 1,5mL;
- Placa óptica de 96 reações;
- Selo óptico;
- Vortex.

6.3. Versão do Software BioLaudos

A partir da versão 2.0.0

7. 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.

8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO:

8.1. Procedimento de Amplificação

- Retirar do freezer os reagentes descritos, abaixo, e aguardar o descongelamento dos mesmos à temperatura ambiente;
- Imediatamente após o descongelamento e antes do preparo da mistura de **RT-PCR SC2**, homogeneizar e centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos,

Preparo Manual das misturas de RT-PCR SC2:

- Adicionar no microtubo da mistura de PCR, o volume de Mix (E/N/RP) de acordo a tabela abaixo (para 96 reações):

Mistura de RT-PCR SC2

CONJUNTO DE REAGENTES	VOLUME (µL)	
	1 REAÇÃO	96 REAÇÕES
MISTURA DE PCR	3,75	450*
MIX (E/N/RP)	1,25	150*

*Valores com volume morto de reação

- Homogeneizar a mistura de RT-PCR SC2 com uma pipeta (evitando formação de bolhas) ou auxílio de um *vortex*;
 - Fazer uma rápida centrifugação (*spin*);
 - Distribuir a mistura de RT-PCR SC2 na placa de amplificação, de acordo com o esquema abaixo:
- Adicionar 5µL da mistura de RT-PCR SC2 nos poços da placa óptica em cada poço.

- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes:
- Adicionar 10 µL de Controle Positivo extraído no poço H12; e adicionar 10 µL de Controle Negativo extraído no G12.
- Adicionar 10 µL de amostras de pacientes extraídas nos demais poços, para detecção de SARS-CoV-2.

Placa de Amplificação:

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

Legenda:

CNEG – Controle Negativo

CPOS – Controle Positivo

- Após a adição na placa óptica da mistura de RT-PCR SC2, dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa óptica com selo óptico. **Utilizar o vórtex para homogeneizar as misturas por 4 minutos a 1200 rpm;**
- **Elevar a placa até a altura dos olhos e verificar se em todos os poços o material está homogeneizado com coloração azul claro;**
- **Centrifugar a placa selada por 1 minuto** e iniciar a reação de RT-PCR no equipamento de PCR em tempo real.

8.2. Amplificação e Detecção

- Ligar o computador do equipamento de PCR em tempo real (ABI 7500 Real Time PCR System, Quant Studio 6 ou Quant Studio 7);
- Ligar o equipamento de PCR em tempo real;
- Colocar a placa óptica no equipamento de PCR em tempo real;
- Evitar tocar no fundo da placa. Certificar-se de que a posição A1 da placa está no canto superior esquerdo;
- No computador do equipamento de PCR em tempo real, clicar no ícone do **Software**;
- Após a inicialização do software, clicar no ícone **Template** e selecionar o template **SC2 bio_manguinhos.edt**;
- Antes de iniciar a corrida, salvá-la;
- Clicar no ícone **Start Run**;

Para geração do laudo seguir informações em **Manual de Uso para Geração de Laudo no Software BioLaudo (Bio-Manguinhos)**.

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

9.1. Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

Abaixo, estão relacionados os critérios de aceitação para aprovação dos controles negativo e positivos da rotina.

Controle	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado	Rotina válida
	Para os alvos E, N Detectado para o alvo RP	
	Ct ≤ 40 Para os alvos E e/ou N	Rotina inválida Repetir o teste. Possível contaminação.
Positivo SC2	Ct ≤ 37 Para os alvos E e N	Rotina válida
	Ct > 37 Para os alvos E e/ou N	Rotina inválida. Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

9.2 Tabela com interpretação dos Resultados

Na tabela, abaixo, estão descritos os critérios de aceitação para detecção dos alvos com relação ao valor de Ct obtido no ensaio, onde se pode definir a análise como conclusivo ou inconclusivo.

Alvos	Valor de Ct	Resultado
E	Ct ≤ 40,0	Detectado
	Ct > 40,0	Não Detectado
N	Ct ≤ 40,0	Detectado
	Ct > 40,0	Não Detectado
RP	Ct ≤ 35,0	Detectado
	35,0 < Ct ≤ 40,0	Não Detectado
	Ct > 40,0	

Na tabela, abaixo, estão descritos os critérios de interpretação de cada alvo para com relação ao diagnóstico (detectado ou não-detectado).

Interpretação de resultados SC2			
Alvo E	Alvo N	Alvo RP	Resultado
Detectado	Detectado	Detectado ou não Detectado	SARS-CoV-2 detectável
Não-detectado	Detectado	Detectado ou não Detectado	SARS-CoV-2 detectável
Detectado	Não-Detectado	Detectado ou não Detectado	SARS-CoV-2 detectável
Não-detectado	Não-Detectado	Detectado Ct < 35	SARS-CoV-2 não- detectável
Não-detectado	Não-Detectado	Não Detectado ou 35,0 < Ct ≤ 40,0	Inválido a extração deve ser repetida

- Quando o **Alvo RP** apresentar o resultado como “**Não detectado**”, e os **alvos E e N** também **forem não detectados**, é **imprescindível que a repetição do ensaio seja realizada a partir de uma nova extração e uma nova amplificação com o Mix SC2** Todos os resultados deverão ser analisados de acordo com os critérios descritos no item 9.1 -Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo e 9.2 - Interpretação de Resultados”;
- Valor de Ct do alvo RP acima de 35,0 é indicativo de possíveis problemas na etapa de extração ou da qualidade da amostra coletada. 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.

10. USUÁRIO PRETENDIDO

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

11. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

Evitar o uso de swabs alginatados ou de algodão para a coleta, pois interferem na PCR.

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

12.1 Sensibilidade analítica

O teste é capaz de detectar, na reação, 0,5 cópias/ μ L (5 cópias/reação) para o alvo E e 0,5 cópias/ μ L (5 cópias/reação) para o alvo N.

As análises PROBIT (IBM SPSS Statistics Subscription), considerando uma taxa de 95% de positividade e um intervalo de confiança (IC) de 95%, apresentaram sensibilidade estimada em 0,24 cópias/ μ L (2,4 cópias/reação) para o alvo E e 0,28 cópias/ μ L (2,8 cópias/reação) para o alvo N, quando avaliada uma diluição seriada do painel SARS-CoV-2 Verification Panel Full Genome (Seracare).

*A quantificação da amostra do painel foi realizada através da técnica de PCR digital. E, as diluições seriadas foram extraídas utilizando o equipamento extrator Chemagic Prime (Perkin Elmer). Sendo, os resultados obtidos aplicáveis somente a este kit e os números de cópias definidos por outros métodos não são necessariamente equivalentes.

13. 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): 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.

14. DESCARTE DO PRODUTO

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

Os reagentes da etapa de extração (manual ou automatizada) devem ser descartados de acordo com a orientação do fabricante.

15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e em instalações de 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.

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

Registro MS: 80142170052

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: 21.040-900 – Rio de Janeiro – RJ- Brasil
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
Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ- Brasil
CNPJ 33.781.055/0001-35
SAC: 08000 210 310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO

17. 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.
- CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay. Instructions for Use. Centers for Disease Control and Prevention, Influenza Division. 1600 Clifton Rd NE, Atlanta. Fev, 2021.
- 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.