

KIT MOLECULAR 4PLEX SC2/VOC

Bio-Manguinhos

Teste para detecção de SARS-CoV-2 e triagem de variantes

(96 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



KIT MOLECULAR 4PLEX SC2/VOC Bio-Manguinhos

Teste para detecção de SARS-CoV-2 e triagem de variantes

(96 Reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

Kit Molecular 4Plex SC2/VOC Bio-Manguinhos

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O Kit Molecular 4Plex SC2/VOC, 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. Este ensaio apresenta um formato quadriplex (detecção de 4 alvos), utilizando sondas TaqMan e é capaz de detectar o vírus SC2 através da amplificação de alvo no gene N, e, simultaneamente, triar amostras com perfis sugestivos para as diferentes VOCs através da combinação de resultados obtidos (presença ou ausência) das deleções (Del) S106, G107 e F108, no gene ORF1a (nsp6) e DelH69 e V70 no gene Spike das amostras testadas. Este protocolo associa a detecção e a triagem inicial das VOCs **Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron**. Como controle interno (CI), o ensaio detecta uma região do gene constitutivo humano, RNaseP (RP).

Produto destinado exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro*.

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO

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

Não são de responsabilidade do fabricante:

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

Observações:

* 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.

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

4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

A metodologia para detecção e amplificação dos alvos do Kit Molecular 4Plex SC2/VOC tem como base a metodologia de PCR em tempo real.

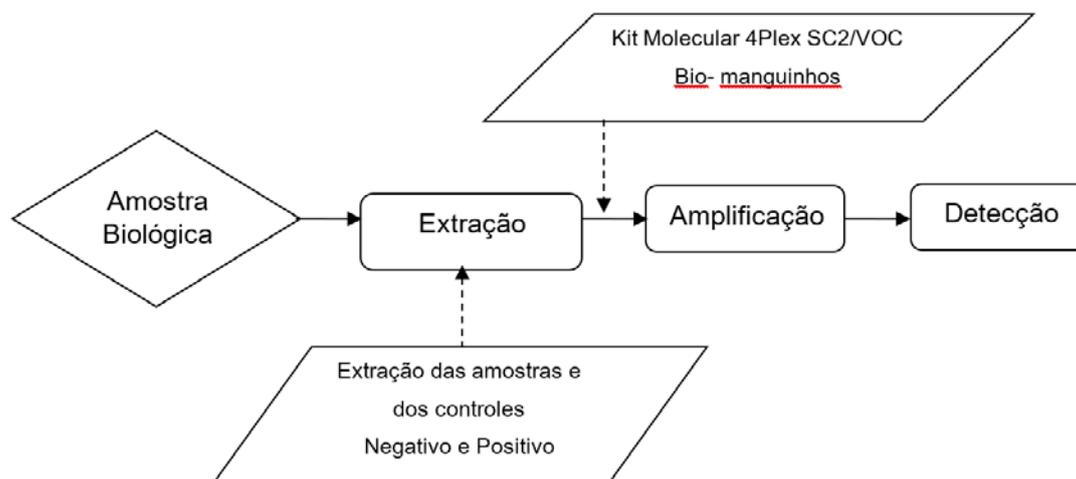
Segue, abaixo, o fluxo metodológico:

(a) etapa prévia de **extração** de ácido nucléico da amostra biológica em conjunto com os controles negativo e positivo do produto.

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

(c) **detecção** 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 de RNA.

Adicionar ao protocolo de extração os controles negativo e positivo do Kit Molecular 4Plex SC2/VOC Bio-Manguinhos em conjunto com as amostras clínicas.

Nota: Se o RNA extraído das amostras clínicas e dos controles positivo e negativo não forem amplificados imediatamente após a extração, deverão ser armazenados de -30°C a -10°C.

• Etapa de Amplificação e Detecção

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 do gene N do vírus SARS-CoV-2 e do alvo *RNase P*, controle interno da reação. Os equipamentos indicados para serem utilizados na etapa de amplificação e de detecção são: o ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), Quant Studio 6 ou Quant Studio 7, somente 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. 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-CoV-2).

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 528
	Mix SC2/VOC	1 frasco com 690
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 20 μL , 100 μL , 200 μL e 1000 μL
- Pipetas de 20 μL , 100 μL , 200 μL e 1000 μL
- Microtubo 1,5mL
- Placa óptica de 96 reações
- Selo óptico
- *Vortex*

6.3 Versão do software bioLaudos

BioLaudos a partir da versão 2.0.0

7. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO

7.1 Procedimento de Amplificação - Real Time ABI 7500, Quant Studio 6 ou 7 em placa de 96 poços.

- 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 4Plex**, homogeneizar e centrifugar (*spin*) os tubos de todos os insumos,

Preparo Manual das misturas de RT-PCR 4Plex:

- Adicionar no microtubo da mistura de PCR, o volume de Mix SC2/VOC de acordo a tabela abaixo (para 96 amostras):

Mistura de RT-PCR 4Plex SC2/VOC

Conjunto de reagentes	Volume (μL)	
	1 reação	96 reações
Mistura de PCR	4,4	528*
Mix SC2/VOC	5,6	672*

*Valores incluindo o volume morto de reação

- Homogeneizar a mistura de RT-PCR 4Plex SC2/VOC com uma pipeta (evitando formação de bolhas) ou auxílio de um *vortex*;
- Fazer uma rápida centrifugação (*spin*);
- Distribuir a mistura de RT-PCR 4Plex SC2/VOC na placa de amplificação, de acordo com a sugestão do desenho abaixo:
 - Adicionar 10 μL da mistura de RT-PCR 4Plex SC2/VOC em cada poço da placa óptica.
- Distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras dos pacientes, conforme indicado no desenho da placa de amplificação abaixo:
 - Adicionar 10 μL de Controle Positivo no poço H12; e adicionar 10 μL de Controle Negativo no G12.
 - Adicionar 10 μL de amostras de pacientes nos demais poços, para detecção do 4Plex SC2/VOC.

Desenho da placa de amplificação (96 reações)

	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 4Plex SC2/VOC dos controles e das amostras dos pacientes, selar a placa óptica com selo óptico. **Utilizar o *vortex* para homogeneizar as misturas por 4 minutos a 1200 rpm;**
- Verificar se em todos os poços o material está homogeneizado com coloração azul claro;

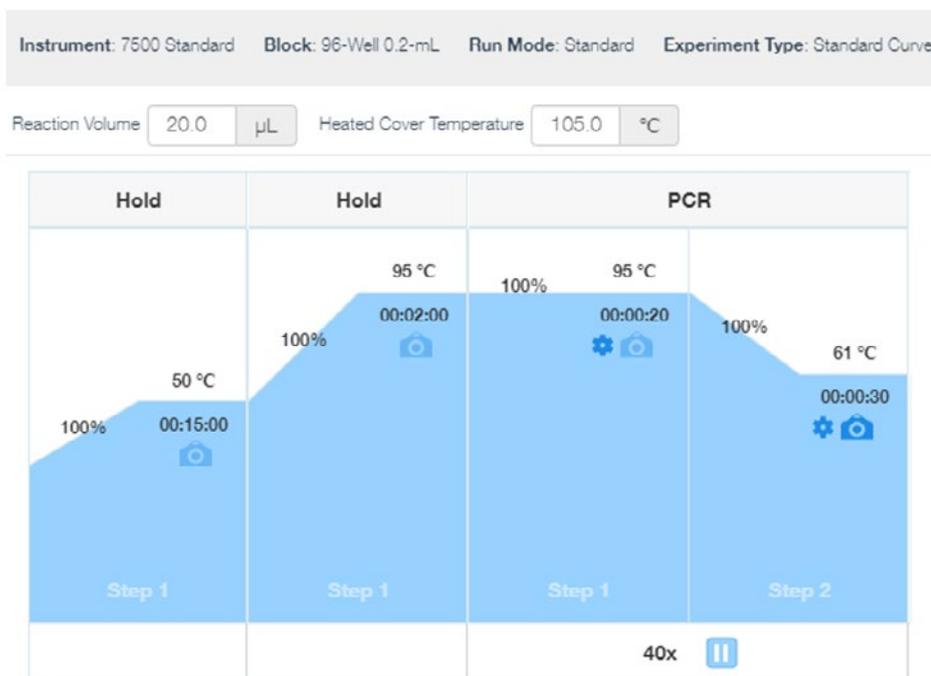
Centrifugar a placa selada por 30 segundos e iniciar a reação de RT-PCR no equipamento de PCR em tempo real.

7.2 Amplificação e detecção

- Recomendamos entrar em contato com o SAC/DIACM de Bio-Manguinhos (pelo e-mail: moleculares@bio.fiocruz.br ou 08000 210 310) para instruções de instalação e utilização do Template (.edt) para corrida no equipamento de detecção;
- Ligar o computador do equipamento de PCR em tempo real;
- Ligar o equipamento de PCR em tempo real (ABI 7500 Real Time PCR System, Quant Studio 6 ou 7);
- 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, clicar no ícone do **Software**;
- Após a inicialização do software, clicar no ícone **Template** (abaixo).



Abrir o template **Deteccao de 4Plex SC2 VOC.edt**:



- Antes de iniciar a corrida, salvá-la;
- Clicar no ícone **Start Run**;



- Após o término da corrida, salvar a corrida (.eds) e copiá-la em um *pendrive*.

Para geração do laudo seguir as informações do Manual de Uso para Geração de Laudo no Software “BioLaudos” (Bio-Manguinhos).

8. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

8.1 Critérios de Aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo

Abaixo estão relacionados os critérios de aceitação para aprovação da rotina de RT-PCR para os Controles Negativo e Positivo.

Controle	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado para todos os alvos virais Detectado para o alvo RP	Rotina válida
	Detectado com $Ct \leq 40$ para qualquer um dos alvos virais	Rotina inválida Repetir o teste. Possível contaminação.
Positivo	$Ct \leq 35$ para o alvo SC2- N	Rotina válida
	SC2-N/RP $Ct > 35$ para o alvo SC2- N e/ ou RP	Rotina inválida Repetir o teste, possível perda de amostra e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

8.2 Tabela de 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 de RT-PCR, onde se pode definir a análise como detectado ou não-detectado.

Alvos	Valor de Ct	Resultados
WT del. 69_70	$Ct \leq 40,0$	Detectado
WT del. NSP6	$Ct \leq 40,0$	Detectado
SC2-N	$Ct \leq 40,0$	Detectado
RP	$Ct \leq 35,0$	Detectado

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

Interpretação de resultados alvos 4Plex SC2/VOC				
WT del. 69/del. 70	WT del. nsp6	SC2-N	RP	Resultado
D	D	D	NA	SARS CoV2 detectado. Variante selvagem para as deleções
ND	D	D	NA	SARS CoV2 detectado. Identificada a del.69 e del.70
D	ND	D	NA	SARS CoV2 detectado. Identificada a del.S106, del.G107 e del.F108 (nsp6)
ND	ND	D	NA	SARS CoV2 detectado. Identificada a del.69 e del.70 e del.S106, del.G107 e del.F108 (nsp6)
ND	ND	ND	D	SARS CoV2 Não detectado.
ND	ND	D	ND	SARS CoV2 detectado. Identificada a del.69 e del.70 e del.S106, del.G107 e del.F108 (nsp6)
ND	ND	ND	ND ou Ct>35	Repetir amostra.
D	D	ND	ND ou Ct>35	Inconclusivo. Repetir amostra.
D	ND	ND	ND ou Ct>35	Inconclusivo. Repetir amostra.
ND	D	ND	ND ou Ct>35	Inconclusivo. Repetir amostra.

D: detectada; ND: não detectada; NA: não avaliado

- Quando o **Alvo RP** apresentar o resultado como “**Não detectado**”, e o alvo **SC2-N** também for não detectado, é imprescindível que a repetição do ensaio seja realizada a partir de uma nova extração e uma nova amplificação. 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 e se, o mesmo resultado permanecer, deve ser solicitada uma nova coleta;
- Quando o **Alvo SC2-N** apresentar o resultado como “**detectado**”, o alvo **RP** poderá não ser avaliado para a conclusão do ensaio.

9. USUÁRIO PRETENDIDO

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

10. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

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

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

11.1 Sensibilidade analítica

O teste é capaz de detectar 5 cópias/ μ L (50 cópias/reação) para o alvo SC2-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 SC2.

Observação: 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

12. 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.

13. 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.

14. 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.

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

Registro MS 80142170057

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES nº: 21433-02.

Fabricante Legal:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

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

CNPJ 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Unidade Fabril:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio- Manguinhos

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

CNPJ: 33.781.055/0015-30

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.

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO

16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Chantal Vogels ,Joseph Fauver ,Nathan Grubaugh . Multiplexed RT-qPCR to screen for SARS-CoV-2 B.1.1.7, B.1.351, and P.1 variants of concern V.2. Protocols.io. Jan, 2021.
- 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.
- 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.