

Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR)

Instruções de Uso

Ref.: **804**
MS 10009010357

Finalidade . Sistema para detecção qualitativa baseado na tecnologia de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), para detecção do ácido ribonucleico (RNA) de SARS-CoV-2, previamente extraído, de amostras biológicas de vias aéreas respiratórias, preferencialmente de lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo e escarro humano.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico in vitro].

Princípio . O ensaio de RT-PCR se utiliza de uma transcriptase reversa para converter RNA em DNA complementar (cDNA), seguido da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar as sequências alvo específicas e sua detecção por sondas alvo específicas. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante *quencher* para confirmar a presença dos fragmentos de sequências dos genes RdRp, E e N do SARS-CoV-2. Para confirmar a integridade dos reagentes do Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) Ref. 804, o ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controle Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR. As sondas específicas estão marcadas com o fluoróforo FAM™, Texas Red™ e JOE™ e a de Controle Interno está marcada com o fluoróforo Cy5™.

Características do sistema . O produto Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804 é um teste de diagnóstico in vitro baseado na tecnologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) que permite a detecção de material genético do Coronavírus da doença de COVID-19 em amostras de RNA extraído de lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab de orofaringe e escarro humano.

RT-PCR é considerado o método de escolha pelo Central for Disease Control (CDC) para detecção precoce do vírus antes da formação de anticorpos imuno-específicos. O Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804 possui sondas para três diferentes genes, o de RNA polimerase dependente de RNA, de envelope e de proteína do nucleocapsídeo que asseguram a acurácia na detecção do agente patogênico.

Metodologia . PCR em tempo real.

Reagentes

1. Mix de reação - Armazenar em temperatura inferior à -20 °C.

Contém tampão Tris-HCl 1M, transcriptase reversa <10 U/μL, Taq polimerase <10 U/μL, dNTP 0,1 a 1,4 M, cloreto de magnésio 0,01 a 0,5 M, DTT (ditiotreitól) 1 M e glicerol ≤5%.

2. Mix de Sonda - Armazenar em temperatura inferior à -20 °C.

Contém iniciadores para os genes RdRp, E e N de SARS-CoV-2 e sondas específicas que conjugam-se aos ácidos nucleicos amplificados e iniciadores e sonda para Controle Interno.

3. Controle Positivo - Armazenar em temperatura inferior à -20 °C.

Contém tampão Tris-EDTA, fragmentos para os genes RdRp, E e N de SARS-CoV-2 e de Controle Interno.

4. Controle Negativo - Armazenar em temperatura inferior à -20 °C.

Contém material ausente de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Os componentes do Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804, após abertos, são estáveis por 6 meses. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Leia as instruções de uso cuidadosamente antes de processar as amostras.

Use hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) ou outro desinfetante para limpar e desinfetar a área ao redor da manipulação da amostra.

Todos os componentes do produto devem ser armazenados em temperatura inferior à -20 °C.

Mix de Sonda deve ser armazenada em temperatura inferior à -20 °C e protegido de luz.

O produto expira 6 meses após aberto. Não usar após a data de vencimento.

Não misture reagentes de diferentes lotes do produto.

Evite contaminação microbiana e por nucleases (DNase/RNase) dos componentes do produto.

Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do produto.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras biológicas não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, devem-se seguir as normas de biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção.

Recomenda-se que todo material que vier a ter contato com amostra biológica seja autoclavado por uma hora a 120 °C antes do descarte.

Resultados inexatos podem ser obtidos se o produto for armazenado em temperatura ambiente por um longo período de tempo.

Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento desnecessários podem levar a resultados imprecisos.

Material necessário e não fornecido

1. Micropipetas.
2. Ponteiras descartáveis com filtro barreira.
3. Luvas sem pó.
4. Microtubos de 1,5 mL.
5. Microtubos ou placa de 96 poços para PCR.
6. Centrifuga de bancada.
7. Produto para isolamento de RNA.
8. Termociclador de RT-PCR.

Amostra

RNA extraído de amostras biológicas de vias aéreas respiratórias, preferencialmente de lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo e escarro humano.

O RNA extraído é o material biológico para uso do produto Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804. Os erros na fase pré-analítica são responsáveis por aproximadamente 70% dos resultados de exames incoerentes. Portanto, a qualidade do RNA extraído tem impacto no resultado. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico seja compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Para sugestões de fornecedores consultar nosso Serviço de Apoio ao Cliente (SAC).

A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o produto Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804 deve ser validada pelo usuário.

O RNA extraído deve ser armazenado em temperatura igual ou inferior a -80 °C. Este analito é particularmente sensível a nucleases abundantes e ubíquas. A manutenção da integridade do RNA é possível por manuseio em ambiente livre de ribonucleases (RNases). Quanto antes as amostras de lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo e escarro humano são processadas, melhor a qualidade dos RNAs extraídos. Adicionalmente, deve-se ter cuidado quanto ao recipiente primário para a coleta das amostras e os subsequentes ao processo de extração, pois podem afetar diretamente a qualidade do material extraído. É recomendável o uso de recipientes livres de RNases para todos os passos de manuseio de amostras de RNA.¹²

Assegurar que as amostras estejam descongeladas e homogeneizadas antes da sua utilização.

As amostras não devem ser inativadas pelo calor, pois podem produzir resultados incorretos.

Não usar amostras com sinais de contaminação ou amostras congeladas e descongeladas repetidas vezes.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Interferências

Não foi observada reatividade cruzada com os seguintes agentes etiológicos: vírus influenza A (H1N1/09, H3N2 e H5N1), vírus influenza B, rinovírus, vírus sincicial respiratório (A/B), vírus da parainfluenza 1, vírus da parainfluenza 2, vírus da parainfluenza 3, vírus da parainfluenza 4, adenovírus, bocavírus humano, sarampo e *Mycoplasma* spp.

Nenhuma interferência foi observada para amostras de swab contendo mucina até 10%, NaCl até 5%, sangue até 20%, vírus respiratório sincicial A até 2.000 cópias/μL e PBS. Adicionalmente, nenhuma interferência foi observada para amostras de RNA extraído contendo mucina até 1%, vírus respiratório sincicial A até 2.000 cópias/μL e PBS.

Procedimento

1. Preparação da amostra

O produto Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Ref. 804 deve ser usado com RNA lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo e escarro humano.

2. Extração de RNA

O produto deve ser usado com um produto de extração disponível comercialmente. Realize a extração de RNA de acordo com as instruções do fabricante. Para sugestões de fornecedores consultar nosso Serviço de Apoio ao Cliente (SAC).

3. Preparação de reagentes

Descongele completamente todos os componentes do produto à temperatura ambiente antes de usá-los. Misture delicadamente, homogeneizando o conteúdo por 5 segundos. Utilizá-lo imediatamente.

3.1. Para um teste, misture 10 μL de Mix de Reação, 5 μL de Mix de Sonda para preparar o Master Mix do RT-PCR. Para um número maior de testes, preparar o Master Mix do RT-PCR conforme descrito na Tabela 1. Prepare volume suficiente de Master Mix para todas as reações com quantidade extra para contornar possíveis falhas de pipetagem.

Nota: Número total de Master Mix = n amostras + 1 controle positivo + 1 controle negativo + 1 extra

Tabela 1 - Modo de preparo de Master Mix

	1 Teste	3 Testes	5 Testes	Volume total de Master Mix
Mix de Reação	10 μL	30 μL	50 μL	10x(n+3)
Mix de Sonda	5 μL	15 μL	25 μL	5x(n+3)
Total (Master Mix)	15 μL	45 μL	75 μL	15x(n+3)

Importante . Controles adequados devem ser usados em cada execução para garantir resultados confiáveis.

3.2. Coloque 15 µL da Master Mix de RT-PCR em cada tubo ou placa de 96 poços apropriados para PCR.

Nota: Não agite fortemente os tubos nesta etapa de modo a evitar formação bolhas.

3.3. Adicione 5 µL de RNA da amostra ao tubo ou poço da placa de PCR correspondente para amplificação e misture-os por meio de suave pipetagem.

3.4. Coloque 5 µL de Controle Positivo e Controle Negativo em cada tubo ou poço da placa de PCR.

Nota: O volume total da reação é de 20 µL por teste.

Nota: Homogeneização insuficiente do Master Mix pode levar a resultados inexatos.

3.5. Transfira o tubo ou placa de PCR para o termociclador de RT-PCR e inicie o ciclo térmico para a amplificação.

Antes da amplificação, opere o instrumento de RT-PCR de acordo com o manual do fabricante.

Condições da PCR em tempo real

	Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	Transcrição reversa	50 °C	20 minutos	1 ciclo
2	Pré-denaturação	95 °C	5 minutos	1 ciclo
3	Denaturação	95 °C	15 segundos	45 ciclos
	Pareamento*	58 °C	60 segundos	

* Coleta de dados

Configuração de fluorescência

Alvo	Fluorescência
Gene RdRp	FAM
Gene E	Texas Red
Gene N	JOE (ABI)/ VIC (CFX96)
Controle Interno	Cy5

Análise de dados

1. Selecione o gráfico de amplificação no modo de análise.
2. Selecione configurações de análise.
3. Defina os critérios de *Threshold* e *Baseline* conforme tabela abaixo:

Alvo	Threshold		Baseline	
	ABI 7500/ ABI 7500 Fast	CFX96	Inicial	Final
RdRp	30.000	300	3	15
Gene E	30.000	300	3	15
Gene N	30.000	300	3	15
Controle interno	10.000	100	3	15

Interpretação dos resultados

Usar os dados da tabela abaixo para interpretação dos resultados:

#	Intervalo de Ct				Resultado
	RdRp	N	E	C.I.	
1	≤40	≤40	≤40	≤35*	COVID-19 positivo
2	≤40	≤40	U.D	≤35	
3	≤40	U.D	≤40	≤35	
4	≤40	U.D	U.D	≤35	
5	U.D	≤40	≤40	≤35	
6	U.D	≤40	U.D	≤35	
7	U.D	U.D	≤40	≤35	Betacoronavírus
8	U.D	U.D	U.D	≤35	Negativo
9	U.D	U.D	U.D	U.D	Inválido (re-testar)

* Quando o RNA alvo é detectado em uma reação de amplificação da amostra, o Controle Interno (C.I.) pode gerar o resultado como Ct Indeterminado (U.D). De fato, a reação de amplificação de baixa eficiência para o C.I. pode ser deslocada pela competição da reação de amplificação de alta eficiência para o gene alvo. Nesse caso, deve ser determinado como positivo.

• É recomendável ensaiar novamente se o resultado do teste não for válido da seguinte forma:

1. No caso de o valor Ct do Controle Interno ser Indeterminado (U.D).

2. No caso de resultado inválido.

Controle interno da qualidade¹⁰. O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, os objetivos, procedimentos, critérios para especificações de qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro de atividades.

Intervalo de Ct dos Controles Positivo e Negativo devem ser os seguintes:

#	FAM	JOE/VIC	Texas Red	Cy5
Controle Positivo	≤22	≤22	≤22	≤21
Controle Negativo	U.D	U.D	U.D	U.D

É recomendável validar todo o procedimento de análise (de cada etapa de extração e amplificação, processando uma amostra negativa e uma amostra positiva ou um material de referência).

Características de desempenho¹¹

Estudos de comparação. Os estudos de comparação foram realizados testando-se RNA extraídos de 120 amostras sendo 60 amostras positivas e 60 amostras negativas para genoma viral da COVID-19, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas a seguir:

Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR) - Labtest

Método comparativo	Positivos	Negativos
Positivos	60	0
Negativos	0	60

Sensibilidade relativa: 100%

Especificidade relativa: 100%

Eficiência: 100%

Repetibilidade - Imprecisão intraensaio

A imprecisão intraensaio foi verificada pela avaliação de três replicatas de três amostras positivas e controles negativo e positivo. A variabilidade dos resultados obtidos com três repetições de cada amostra por ensaio e avaliadas duas vezes por dia (dois ensaios por dia) durante 12 dias. Os resultados negativos e positivos encontrados demonstraram 100% de concordância com os resultados esperados.

Reprodutibilidade - Imprecisão interensaio

A imprecisão total foi verificada pela avaliação entre lotes, operadores e locais de ensaio do produto usando três amostras positivas e controles negativo e positivo. Os resultados negativos e positivos encontrados demonstraram 100% de concordância com os resultados esperados.

Significado clínico . O novo coronavírus, formalmente nomeado de Coronavírus da síndrome respiratória aguda severa (SARS-CoV-2) e causando a doença coronavírus 2019 (COVID-19), surgiu na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China central, em dezembro de 2019.¹ Embora estudos iniciais tenham relatado uma ligação entre um único mercado local de peixes e animais selvagens e a maioria dos casos de infecção, que indicavam possível transmissão de animal para humano², o modo mais provável de transmissão do COVID-19 entre seres humanos é a inalação de aerossóis infecciosos e o período de incubação é de aproximadamente 3-14 dias.³ As primeiras publicações que relatam as manifestações clínicas dos pacientes incluíram febre, tosse improdutiva, dispnéia, mialgia, fadiga, contagem normal ou reduzida de leucócitos e evidência radiográfica de pneumonia. A disfunção orgânica (por exemplo, choque, síndrome do desconforto respiratório agudo [SDRA], lesão cardíaca aguda e lesão renal aguda) e a morte podem ocorrer em casos graves. Posteriormente, foram relatados 99 casos e os resultados sugeriram que a infecção por COVID-19 em grupos de humanos em contato próximo, tinha maior probabilidade de afetar indivíduos mais velhos com comorbidades e poderia resultar em SDRA.⁴ Estudos anteriores indicaram que o RNA viral pode ser detectado no plasma ou soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2 durante diferentes períodos após o início dos sintomas⁵ embora as amostras mais frequentemente usadas para detecção do RNA viral são lavado bronco alveolar, swab nasofaríngeo, swab de orofaringe e escarro.⁶ As ferramentas e kits de detecção atualmente disponíveis para COVID-19, que é um vírus RNA, são baseados na detecção indireta do RNA viral por PCR em Tempo Real (RT-PCR) nos quais tem se mostrado essenciais para rastrear o vírus, entender a epidemiologia, informar o manejo de casos e reduzir a transmissão.⁷ Como o RT-PCR foi frequentemente um dos métodos de diagnóstico laboratorial mais rapidamente estabelecidos em pandemias virais, assim como este COVID-19, serviu eficientemente para confirmar uma infecção viral dentro de poucas horas, tanto em casos sintomáticos quanto assintomáticos.^{8,9}

Referências

- Cheng AC, Williamson DA. An outbreak of COVID-19 caused by a new coronavirus: what we know so far. *Med J Aust* 2020; 9 March.
- Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Feb 17:105924.
- Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) - recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Feb;24(4):2006-2011.
- Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Feb 7.
- Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfus Med Rev*. 2020 Feb 21. pii: S0887-7963(20)30014-6.
- Won J, Lee S, Park M, Kim TY, et al. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*. 2020 Mar 11.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan;25(3).
- Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*. 2020 Mar 7;505:172-175.
- Bwire GM, Paulo LS. Coronavirus disease-2019: is fever an adequate screening for the returning travelers? *Trop Med Health*. 2020 Mar 9;48:14.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. *Clin Chem* 1981;27:493-501.
- Labtest: Dados de Arquivo.
- Lipay, MVN. *Biologia molecular: Amostragem de material biológico*. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Detect SARS-CoV-2 (RT-PCR)	804-100	Mix de Reação 1 x 1,050 mL
		Mix de Sonda 1 x 0,550 mL
		Controle Positivo 1 x 0,050 mL
		Controle Negativo 1 x 0,050 mL

Informações ao consumidor

[Termos e condições de garantia]

A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos das embalagens desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nesta instrução de uso sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000

Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Abril, 2020

Revisão: Agosto, 2020

Ref.: 250820

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.

Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Período após abertura Período post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |