

Teste para a detecção quantitativa ou qualitativa do RNA de **SARS-CoV-2 (COVID-19)** através da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

**ATENÇÃO:** Antes de iniciar o teste, observar o item “CUIDADOS ESPECIAIS” na Instrução de Uso do produto.

## PREPARO DAS AMOSTRAS

Os ácidos nucleicos (RNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido.

## PREPARO DOS REAGENTES\*

\*Após a ressuspensão dos reagentes o produto é estável por 6 meses.

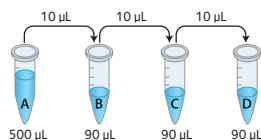
### A Preparo dos reagentes

1. Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: Solução PCR E (R1), Solução PCR RdRp (R2), Padrão A (R5) e Solução PCR Endógeno (R9) antes da abertura dos microtubos.
2. Ressuspender cada frasco de Mix Taq (R3) com 1,1mL do reagente Tampão Mix (R4).
3. Ressuspender os reagentes, Solução PCR E (R1), Solução PCR RdRp (R2) e Solução PCR Endógeno (R9) com o reagente Água (R7) de acordo com a tabela abaixo:

| REAGENTE                  | APRESENTAÇÃO |
|---------------------------|--------------|
|                           | 100 Testes   |
| Solução PCR E (R1)        | 110 µL       |
| Solução PCR RdRp (R2)     | 110 µL       |
| Solução PCR Endógeno (R9) | 110 µL       |

### B Diluição do Padrão Quantitativo

1. Ressuspender o Padrão A (R5) com 500µL do Diluente (R6).
2. Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do Padrão A (R5) já ressuspendido.
3. Pipetar 90µL do Diluente (R6) em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
4. Em seguida, pipetar 10µL do Padrão A (R5) no microtubo B e homogeneizar.
5. Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
6. Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.



## PREPARO DA REAÇÃO DA PCR

1. Determinar o mapa das amostras, separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados de acordo com o número de reações.

2. Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações necessárias (incluindo amostras, Controle e Padrões Quantitativos).

|   | 1        | 2        | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|----------|----------|---|---|---|---|---|---|
| A | Padrão A | Padrão A |   |   |   |   |   |   |
| B | Padrão A | Padrão A |   |   |   |   |   |   |
| C | Padrão B | CN       |   |   |   |   |   |   |
| D | Padrão B | CN       |   |   |   |   |   |   |
| E | Padrão C | 1        |   |   |   |   |   |   |
| F | Padrão C | 2        |   |   |   |   |   |   |

## Preparo da PCR para o gene E e para o Controle Endógeno

| REAGENTE                  | 1 REAÇÃO | 25 REAÇÕES | 50 REAÇÕES | 100 REAÇÕES |
|---------------------------|----------|------------|------------|-------------|
| Mix Taq (R3)              | 10 µL    | 250 µL     | 500 µL     | 1mL         |
| Solução PCR E (R1)        | 1 µL     | 25 µL      | 50 µL      | 100 µL      |
| Solução PCR Endógeno (R9) | 1 µL     | 25 µL      | 50 µL      | 100 µL      |
| Água (R7)                 | 3 µL     | 75 µL      | 150 µL     | 300 µL      |

## Preparo da PCR para o gene RdRp sem o Controle Endógeno

| REAGENTE              | 1 REAÇÃO | 25 REAÇÕES | 50 REAÇÕES | 100 REAÇÕES |
|-----------------------|----------|------------|------------|-------------|
| Mix Taq (R3)          | 10 µL    | 250 µL     | 500 µL     | 1mL         |
| Solução PCR RdRp (R2) | 1 µL     | 25 µL      | 50 µL      | 100 µL      |
| Água (R7)             | 4 µL     | 100 µL     | 200 µL     | 400 µL      |

- Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
- Adicionar 5µL do RNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL do Controle Negativo (R8) nos microtubos/poços previamente determinadas.
- Transportar os microtubos/placa para o equipamento de PCR em Tempo Real.

## PROGRAMAÇÃO DA PCR

### TESTE QUANTITATIVO - Padrões Quantitativos

**A-**  $2 \times 10^5$  cópias / µL    **B-**  $2 \times 10^4$  cópias / µL    **C-**  $2 \times 10^3$  cópias / µL    **D-**  $2 \times 10^2$  cópias / µL

### Detetores (sondas)

| Alvo              | Detector | Quencher |
|-------------------|----------|----------|
| E                 | FAM      | NFQ-MGB  |
| RdRp              | FAM      |          |
| Controle Endógeno | VIC      |          |

### Ciclos de Temperatura

|   | TEMPERATURA | TEMPO       | CICLOS |
|---|-------------|-------------|--------|
| 1 | 55°C        | 10 Minutos  | 1      |
| 2 | 95°C        | 3 Minutos   | 1      |
| 3 | 95°C        | 15 Segundos | 50     |
|   | 60°C        | 60 Segundos |        |

**Referência Passiva:** Equipamento que utiliza o ROX deve ser programado com a opção **"NONE"**.

## VALIDAÇÃO

### Curva Padrão

Coefficiente de correlação ( $R^2$ ):  $0,95 \leq R^2 \leq 1,00$

### Controles

| Controle | CT                       |                          | Resultado | Amplificação/<br>Detecção |
|----------|--------------------------|--------------------------|-----------|---------------------------|
|          | FAM                      | VIC                      |           |                           |
| Negativo | Ausência de amplificação | Ausência de amplificação | Negativo  | Válida                    |
| Positivo | Presença de amplificação | Ausência de amplificação | Positivo  | Válida                    |

\* Controle Positivo (R5, Padrão A) utilizado no teste qualitativo.

### Amostra

| COVID-19                                               |                             | Resultado | Detecção  |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|
| FAM<br>(E e RdRp)                                      | VIC<br>Controle<br>Endógeno |           |           |
| Concentração determinada ou presença de amplificação   | CT ≤ 35                     | Positivo  | Válida    |
|                                                        | CT > 35                     | Positivo  | Inválido* |
| Concentração indeterminada ou ausência de amplificação | CT ≤ 35                     | Negativo  | Válida    |
|                                                        | CT > 35                     | Negativo  | Inválido* |

\*Vide Instruções de Uso, item **F. Validação do Resultado** e subitem **3. Amostras**.

Revisão: Julho/2022