

Teste para a detecção 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 (R1)** e **Controle Positivo (R4)** antes da abertura dos microtubos.
2. Ressuspender o reagente **Mix Taq (R2)** com 1,1 mL do reagente **Tampão Mix (R3)**.
3. Ressuspender o reagente **Solução PCR (R1)** com 110µL do reagente **Água (R6)**.
4. Ressuspender o reagente **Controle Positivo (R4)** com 500µL do **Diluyente (R5)**.

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 e Controles).

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	CP	5						
B	CP	6						
C	1	CN						
D	2	CN						
E	3							
F	4							

Preparo da PCR

REAGENTE	1 REAÇÃO	25 REAÇÕES	50 REAÇÕES	100 REAÇÕES
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL

3. Pipetar 11 µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
4. Adicionar 9µL do RNA extraído das amostras ou 9µL dos Controles nos microtubos/poços previamente determinadas.
5. Transportar os microtubos/placa para o equipamento de PCR em Tempo Real.

PROGRAMAÇÃO DA PCR

TESTE QUALITATIVO

Detetores (sondas)

Alvo	Detector	Quencher
E	FAM	NFQ-MGB
RdRp	ROX	
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

Controles

Controles	Faixa permitida CT	Amplificação /Deteção
Positivos (FAM e ROX)	$16 \leq CT \leq 21$	Válida
Negativo	Indeterminado	Válida
Controle Endógeno (VIC)	$CT \leq 35$	Válida

Amostra

COVID-19		Resultado	Deteção
FAM (E e RdRp)	VIC Controle Endógeno		
Presença de amplificação	$CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT > 35$	Positivo	Inválido*
Ausência de amplificação	$CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT > 35$	Negativo	Inválido*

*Vide Instruções de Uso, item **E. Validação do Resultado** e subitem **2-Amostras**.

Revisão: Dezembro/2022