

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.

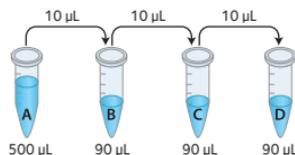
A Preparo dos reagentes

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 600µL 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 D						
B	Padrão A	Padrão D						
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- 2×10^5 cópias / µL **B-** 2×10^4 cópias / µL **C-** 2×10^3 cópias / µL **D-** 2×10^2 cópias / µL

Detectores (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/ 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 (E e RdRp)	VIC Controle 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: Setembro/2021