SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Kit de RT-PCR para a SARS-CoV-2 num passo, IVD

Gene viral da ARN polimerase dependente de ARN (RdRp)

REF MD03201, 96 reações

***Dispositivo médico para diagnóstico* in vitro**

IVD

PT

Instruções de utilização

MD0320_IM_pt

VERSÃO 2401, janeiro 2024

NZYtech - genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar, Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Índice

1. Introdução ... 3
2. Utilização prevista ... 3
3. Princípio do ensaio ... 3
4. Composição e reagentes do kit ... 3
5. Armazenamento, conservação e manuseamento ... 4
6. Materiais e instrumentos necessários, mas não fornecidos ... 4
7. Recolha e preparação da amostra ... 4
8. Advertências e precauções ... 4
8.1. Informação de segurança ... 4
8.2. Manuseamento e procedimentos adequados ... 4
9. Procedimentos de testagem ... 5
9.1. Preparação da reação ... 5
9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real ... 5
10. Análise de dados ... 6
10.1. Critérios de validação ... 6
10.2. Interpretação dos resultados do teste ... 6
11. Avaliação do desempenho do teste ... 7
11.1. Resultados esperados ... 7
11.2. Sensibilidade analítica ... 7
11.3. Reatividade analítica (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analítica ... 7
11.4. Precisão ... 7
11.4.1. Repetibilidade ... 8
11.4.2. Reprodutibilidade diária ... 8
11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes ... 8
11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores ... 8
11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos ... 8
11.5. Avaliação clínica ... 8
12. Controlo de qualidade ... 8
13. Apoio técnico ... 8
14. Marcas registadas e direitos de propriedade ... 8
15. Tabela de símbolos ... 9
16. Declaração de conformidade ... 10
17. Referências ... 11

1. Introdução

No final de 2019, uma nova doença respiratória aguda, designada de doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), foi identificada na China e rapidamente se disseminou pelo mundo inteiro. O agente causador foi identificado como SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2). Tal como o Coronavírus da SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), este vírus (anteriormente conhecido como 2019-nCov), pertence ao género *Betacoronavirus*. Os coronavírus são vírus de ARN de cadeia simples longa, encapsulados e com capacidade de infetar humanos, assim como um largo espetro de outras espécies animais. Pensa-se que o SARS-CoV-2 tenha origem zoonótica, tendo-se provavelmente disseminado a partir de grandes mercados de comércio de animais, através do contacto entre humanos e esses animais, na cidade chinesa de Wuhan. O novo coronavírus é altamente contagioso e é primariamente transmitido através de gotículas provenientes das vias respiratórias (tosse e espirros). A deteção precoce do SARS-CoV-2 é vital para permitir o tratamento rápido de pessoas infetadas e assim reduzir o contágio e a disseminação do vírus. Os sintomas mais comuns da COVID-19 são a fadiga, febre e problemas nas vias respiratórias inferiores, tais como tosse seca e dispneia. Para além destes sintomas, pode também existir perda do olfato e do paladar. Em casos mais graves, a infeção progride para pneumonia aguda, levando à síndrome respiratória aguda e perda de função dos órgãos vitais, ameaçando a vida do paciente. De acordo com o conhecimento atual, cerca de 80% das infeções são assintomáticas ou com sintomas ligeiros. Alguns grupos da população são mais vulneráveis às manifestações mais severas da doença, nomeadamente os indivíduos adultos com mais de cinquenta anos, fumadores e pessoas com doenças crónicas, tais como doença pulmonar ou coronária, cancro, diabetes e imunodeprimidos.

2. Utilização prevista

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech é um teste molecular destinado à rápida deteção qualitativa dos ácidos nucleicos do vírus SARS-CoV-2, recolhidos, por zaragatoa, na nasofaringe ou na orofaringe, ou em amostras de expetoração de pacientes. Um resultado positivo indica a presença do ARN do SARS-CoV-2, resultante da infeção pelo novo coronavírus. A testagem deve ser executada por técnicos de laboratório com formação, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e experiência em diagnóstico *in vitro*.

3. Princípio do ensaio

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech fornece o conjunto de reagentes e sondas para a deteção qualitativa do genoma do SARS-CoV-2, através de PCR em tempo real (ver requisitos das especificações do equipamento na **Secção 6**). O kit deteta, especificamente, a presença de uma sequência do gene viral da ARN polimerase dependente de ARN (RdRp). O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar se a extração dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas humanas foi eficiente, assim como permite detetar a presença de inibidores de PCR que possam influenciar a reação de amplificação, entre outros. Adicionalmente, o kit inclui dois controlos externos (controlo positivo fornecido em baixa concentração e controlo negativo), tal como descrito adiante. Os *primers* e a sonda fornecidos têm 100% de homologia com cerca de 95% dos mais de 2500 genomas disponíveis na base de dados GISAID (dados de 29 de março de 2020). Por outro lado, o conjunto de primers e sonda desenhados para a deteção do genoma do SARS-CoV-2 não têm homologia significativa com outros genomas não relacionados, o que traduz a elevada especificidade do teste, já que evita a deteção cruzada de outras sequências de coronavírus. A seleção natural a que o SARS-CoV-2 está sujeito implica que novas sequências do seu genoma viral possam vir a ser disponibilizadas após a criação deste kit, o que reflete as estratégias de adaptação adquiridas pelo SARS-CoV-2. Desta forma, a NZYtech revisita periodicamente os genes alvo do SARS-CoV-2 e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit.

A determinação qualitativa de um determinado ARN específico é baseada na técnica de RT-PCR em tempo real num único passo, a qual constitui um método rápido e fidedigno para detetar com exatidão o vírus SARS-CoV-2. O princípio do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech, consiste na utilização do ARN viral isolado e purificado através de um sistema de extração (IVD), sendo o mesmo retro transcrito (RT) em ADNc e posteriormente amplificado por PCR, numa única reação, através de dois conjuntos de *primers*/sonda altamente específicos e baseados no princípio TaqMan®. Na presença de ARN, extraído de amostras das vias respiratórias de um paciente infetado, a sonda TaqMan® liga-se especificamente a uma região conservada do gene RdRp do SARS-CoV-2, que se encontra flanqueada por um par de *primers* igualmente específicos. Um outro conjunto de *primers*/sonda funciona como controlo interno, detetando uma sequência de ácidos nucleicos do gene humano RNAse P (RP), o que permite, deste modo, confirmar a eficácia do processo de extração do material biológico recolhido do paciente. Adicionalmente, o controlo interno permite demonstrar que não ocorreu inibição da reação pela presença de inibidores de PCR nas amostras clínicas. As duas sondas são marcadas com os fluoróforos FAM™ e JOE™, de forma a permitir identificar a amplificação individual dos genes-alvo humano e viral numa única reação, respetivamente. Além disso, estes conjuntos de *primers*/sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que a amplificação do ARNm humano, mesmo quando presente em concentrações extremamente altas, não limita a eficiência dos primes/sonda específicos para o ARN viral SARS-CoV-2. O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech contém ainda um controlo positivo que permite controlar o desempenho da reação de RT-PCR. Este controlo corresponde a uma molécula sintética de ácido nucleico contendo sequências homólogas às sequências alvo do SARS-CoV-2 e do gene RP incluídas neste ensaio de deteção. O controlo positivo deve ser usado diretamente com a mistura de *primers*/sondas SARS-CoV-2/RP (SARS-CoV-2 PPMix) cada vez que uma matriz de amostras é testada. Um resultado positivo indica que os conjuntos de *primers*/sondas para detetar o gene alvo do SARS-CoV-2 e o gene RP funcionaram juntamente com a mistura enzimática naquele cenário experimental particular. No caso de se obter um resultado negativo, os resultados do teste são inválidos e o teste deve ser repetido.

4. Composição e reagentes do kit

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech fornece o conjunto de reagentes suficientes para realizar 96 reações de RT-PCR num único passo.

COMPOSIÇÃO DO KIT		Nº. DE TUBOS	VOLUME (POR TUBO)
SARS-CoV-2 MMix	Mistura enzimática NZYSpeedy One-step RT-qPCR Master Mix	1	1050 µL
SARS-CoV-2 PPMix	SARS-CoV-2/RP Mistura *primers*/sonda	1	205 µL
SARS-CoV-2 Pos	Control positive SARS-CoV-2/RP (1 x 10^4 copies/µL)	1	105 µL
SARS-CoV-2 Neg	Água livre de RNase/DNase	1	105 µL

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

- O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados a -85 °C to -15 °C. Quando estão a ser utilizados, os componentes do kit devem ser colocados prontamente no congelador depois da sua utilização, de forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente.
- É aconselhável reduzir o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas com soluções de trabalho. Se apropriado, os componentes do kit podem ser aliquotados em volumes menores após descongelação.
- O componente SARS-CoV-2/RP mistura primers/sonda (SARS-CoV-2 PPMix) deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente NZYSpeedy One-step RT-qPCR Master Mix (SARS-CoV-2 MMix) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente SARS-CoV-2/RP mistura primers/sonda (SARS-CoV-2 PPMix).
- Contactar imediatamente a NZYtech se, ao receber o kit, a embalagem estiver danificada.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYtech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários, mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que deteta os fluoróforos FAM™ e JOE™ (nos comprimentos de onda de emissão de 520 e 555 nm, respetivamente). Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Equipamento e consumíveis para isolar ARN viral das amostras clínicas.
- Consumíveis de plástico livres de RNase/DNase: tubos de PCR, tiras, tampas, placas de 96 poços e adesivos.
- Pipetas e pontas de filtro (livres de RNase/DNase).
- Luvas descartáveis.
- Agitador do tipo Vortex e centrífuga.

7. Recolha e preparação da amostra

Diferentes fatores, como o protocolo para a colheita de amostras das vias respiratórias (zaragatoas nasofaríngeas ou orofaríngeas, ou expetoração), transporte da amostra, armazenamento e duração do tempo de processamento, são críticos para atingir os resultados ótimos. As amostras de expetoração (escarro) devem ser provenientes das vias respiratórias inferiores. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. Além disso, devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas em concordância com os regulamentos de biossegurança. O ARN ou ácidos nucleicos totais, extraídos segundo um protocolo CE IVD, constituem o material inicial para o ensaio usando o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech. Por favor, assegure-se de que as amostras de ARN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Um valor de ~2 para a razão entre a absorvência a 260 e a 280 nm ($A_{260/280}$) é geralmente indicativo de ARN puro. Uma vez que o etanol é um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYtech contem um controlo interno que tem como alvo o ARN humano co-purificado com o ARN viral. O ARN humano é amplificado com o conjunto de *primers*/sonda do gene RNase P (RP). A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração e isolamento do ARN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores durante o processamento da amostra.

8. Advertências e precauções

Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é feito corretamente. Qualquer alteração dos mesmos pode resultar na falha do ensaio ou causar resultados erróneos. Devido à elevada sensibilidade do kit, deve ser dada especial atenção aos reagentes e às misturas de amplificação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

8.1. Informação de segurança

Antes de usar o kit, por favor consulte a ficha de dados de segurança (SDS) que está disponível no *website* da NZYtech (www.nzytech.com). A deteção do vírus SARS-CoV-2 deve ser realizada somente por profissionais com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2. Manuseamento e procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes deste kit.
- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de -ADNase/ARNase em todos os procedimentos.

- As diferentes etapas relativas à preparação das amostras, preparação da reação e amplificação devem ser realizadas em diferentes zonas de trabalho.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias; deve ser aberto e processado longe das amostras e dos componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre a água fornecida no kit (SARS-CoV-2 Neg – água livre de RNase/DNase).
- No final de cada testagem, limpar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de ADN/ARN.
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem; as placas devem ser sempre descartadas no contentor de riscos biológicos.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. O descarte deste tipo de resíduos está regulado por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que todos os passos de pipetagem e preparação da placa devem ser feitos em gelo. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de RT-PCR em tempo real. Durante a preparação das misturas de reação, a exposição prolongada à temperatura ambiente pode levar a artefactos que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos, centrifugar por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo e colocar em gelo. **Pipete sempre o controlo positivo SARS-CoV-2/RP (SARS-CoV-2 Pos) em último lugar de forma a evitar eventuais contaminações.**

9.1. Preparação da reação

1. Prepare uma mistura de reação RT-PCR com o volume suficiente para o número de testes SARS-CoV-2/RNase P a realizar; adicione 5% de volume extra para compensar perdas durante a pipetagem. Proceda de acordo com a tabela seguinte, onde estão especificados os volumes para 1 ou *n* testes (em que *n* corresponde ao número total de reações):

COMPONENTE	VOLUME 1 TESTE (µL)	VOLUME *n* TESTES (*) + 5% (µL)
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix	2	*n* x 2,1
VOLUME FINAL	**12**	***n* x 12,6**

(*) Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais duas para os controlos negativo e positivo, respetivamente).

2. Pipete 12 µL da mistura reação RT-PCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de RT-PCR.
3. Para o controlo negativo, adicione 8 µL de SARS-CoV-2 Neg no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
4. Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ARN nos poços relativos ao ensaio SARS-CoV-2/RNase P, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.
5. Para o controlo positivo, adicione 8 µL de SARS-CoV-2 Pos no poço relativo ao controlo positivo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
6. Sele a placa contendo todas a reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de RT-PCR em tempo real para deteção das sequências.
7. Coloque a placa no equipamento de PCR em tempo real e inicie o protocolo de RT-PCR de acordo com a secção seguinte.

9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte mostra o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. Estas condições podem, contudo, ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

Definições sugeridas para o protocolo RT-PCR

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	ETAPA
1	50 °C	20 min	Transcrição Reversa
1	95 °C	2 min	Ativação da Polimerase
40	95 °C	5 s	Desnaturação
	60 °C	30 s	Emparelhamento/Extensão

Fluoróforos/Marcações

ALVOS	SONDAS	CANAL DE DETEÇÃO
Sequências SARS-CoV-2 & RNase P	FAM™ & JOE™	FAM
Controlos positivo/negativo	FAM™ & JOE™	JOE, VIC ou HEX

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo real: Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus e Bio-Rad® CFX96™. Se pretender usar outro equipamento, o kit dever ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

10. Análise de dados

10.1. Critérios de validação

Antes de analisar os resultados das amostras, recomendamos que verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivo e negativo estão em acordo com os seguintes critérios:

Controlo positivo: as curvas de amplificação para FAM™ (SARS-CoV-2) e JOE™ (RP) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct<28, para ambos canais, FAM e JOE. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

Controlo negativo (reação sem ARN): nenhuma amplificação é detetada. Se o controlo negativo origina uma ou duas curvas de amplificação (FAM™ e/ou JOE™) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.

Se os controlos estão de acordo com o esperado, o teste é considerado **válido**. Por favor, proceda com a interpretação dos resultados das amostras testadas.

Se em algum dos controlos não foi obtido o resultado esperado, o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.

Por favor, repita o teste. Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2. Interpretação dos resultados do teste

SARS-CoV-2 é detetado se a curva de amplificação do FAM™ é sigmoide com Ct<36, independentemente do resultado obtido para o gene RP (JOE™).

SARS-CoV-2 não é detetado se a curva do FAM™ não for positiva (Ct≥36), enquanto o gene RP (JOE™) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct<40.

O **teste é inválido** se as curvas de amplificação do SARS-CoV-2 e RP forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova purificação dos ácidos nucleicos a partir da amostra.

A tabela seguinte resume a interpretação dos resultados principais (deve avaliar a forma das curvas de amplificação; **apenas curvas de amplificação sigmoides são indicativas de uma amplificação real).**

RESULTADO SARS-CoV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	**RESULTADO RP** RP, CT (JOE™)	**INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**
+ (Ct<36)	**+** (Ct<40)	SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO
+ (Ct<36)	**-** (Ct>40)	SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO
- (Ct≥36)	**+** (Ct<40)	SARS-CoV-2 não detetado → NEGATIVO
- (Ct≥36)	**-** (Ct>40)	Teste inválido, repetir extração de ARN e teste

Nota: *A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.*

- Resultados falsos negativos podem ser causados por:
  - Recolha, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
  - Recolha da amostra fora da fase virémica/sintomática.
  - Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.
  - Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em real time não validadas.

- Resultados falsos positivos, podem ser causados por:
  - Manuseamento desadequado de amostras contendo elevadas concentrações de ARN viral SARS-CoV-2 ou contaminação cruzada com o controlo positivo.
  - Manuseamento incorreto do tubo SARS-CoV-2 Pos.
  - Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

11. Avaliação do desempenho do teste

O desempenho do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 e Bio-Rad® CFX96™ Real, tendo sido adicionalmente testado no equipamento Applied Biosystems® StepOnePlus. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

11.1. Resultados esperados

Um gráfico de amplificação típico para uma amostra clínica contendo ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 pode ser observado de seguida.

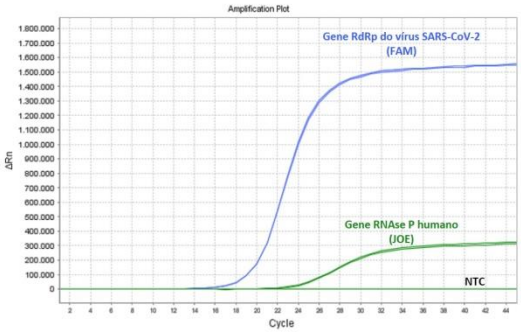

Figura 1. Deteção em simultâneo das sequências alvo SARS-CoV-2 e do gene humano da RNase-P a partir de uma amostra clínica positiva (paciente infetado com SARS-CoV-2). Curva azul: deteção do alvo de ARN viral SARS-CoV-2 (gene RdRp) através do canal FAM; Curva verde: deteção do gene humano RNase P através do canal JOE. NTC (controlo negativo).

11.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 (5 x 10^4 a 2,5 cópias por reação) individualmente ou misturadas com ARN extraído de amostras negativas da orofaringe, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação recomendadas. Os testes foram repetidos duas vezes por dia, durante 5 dias, produzindo 60 réplicas para cada concentração de SARS-CoV-2 testada. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta 0,25 cópias/µL de ARN viral SARS-CoV-2 com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Deteção (LoD), é de 0,25 cópias/µL ou de 250 cópias/mL. O LoD do kit foi reavaliado por dois operadores diferentes usando 3 lotes de kit num ensaio de 48 testes, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem. A capacidade do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech para detetar diferentes cargas virais (de 5 x 10^7 até 5 cópias por reação) é apresentada na figura apresentada na página seguinte.

11.3. Reatividade analítica (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analítica

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos do SARS-CoV-2 e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. Através da análise *in silico*, conclui-se que o ensaio permitiu detetar todas as estirpes do vírus SARS-CoV-2. Por outro lado, não foi demonstrada reatividade com espécies não relacionadas ao SARS-CoV-2. Para além da análise *in silico,* foi realizado o teste RT-PCR para SARS-CoV-2 usando ácidos nucleicos de micróbios comuns do trato oral e respiratório, incluindo *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Nenhum dos patógenos testados pelo ensaio de RT-PCR originou uma amplificação de sinal detetável.

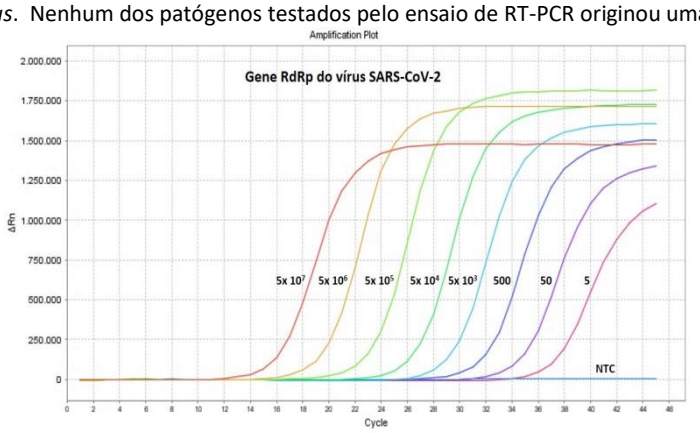

Figura 2. Sensibilidade do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD. Curvas de amplificação (número de ciclos *versus* fluorescência - ΔRN) de diluições seriadas de 1:10 de ARN viral SARS-CoV-2, desde 5 x 10^7 cópias até 5 cópias por reação através do canal FAM. NTC controlo negativo.

11.4. Precisão

A precisão do ensaio do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos SARS-CoV-2 representativos de duas cargas virais, 5 (LoD) e 150 cópias por reação (0,25 e 7,5 cópias/µL), individualmente ou misturadas com ARN extraído de amostras negativas da orofaringe, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação típicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de deteção dos replicados, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados são resumidos na tabela apresentada na página seguinte.

11.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada pela análise de 48 réplicas para cada amostra (5 e 150 cópias por reação), contabilizando um total de 96 testes executados.

11.4.2. Reprodutibilidade diária

A reprodutibilidade diária foi avaliada pela análise de 120 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação), durante 5 dias com 24 réplicas por cada concentração por dia (num total de 240 ensaios).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada pela análise de 270 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação) usando 3 lotes diferentes do kit com 90 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 96 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação), por quatro operadores, num total de 48 testes por operador (96 réplicas realizadas por amostra).

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada pela testagem de 36 réplicas por cada amostra (5 e 150 cópias por reação), em dois equipamentos de PCR em tempo real diferentes (Applied Biosystems® 7500 e Applied Biosystems® StepOnePlus), num total de 72 testes por equipamento e reação.

11.5. Avaliação clínica

A avaliação do desempenho do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech ao utilizar amostras recolhidas das vias respiratórias foi levada a cabo em dois laboratórios distintos. No total, 100 amostras clínicas negativas e 100 amostras clínicas positivas foram testadas. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as 200 amostras analisadas.

Precisão do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech

VARIÁVEL TESTADA		SARS-CoV-2 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		5	150
REPETIBILIDADE	n	48	48
	Média Cq	34,61	30,82
	Coeficiente de Variação (%)	2,99	1,80
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	120	120
	Média Cq	33,02	30,49
	Coeficiente de Variação (%)	4,21	4,95
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	270	270
	Média Cq	33,41	30,15
	Coeficiente de Variação (%)	4,35	4,33
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	96	96
	Média Cq	33,40	30,13
	Coeficiente de Variação (%)	4,76	3,73
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	72	72
	Média Cq	33,44	29,98
	Coeficiente de Variação (%)	5,24	3,72
	% Réplicas detetadas	100	100

12. Controlo de qualidade

Todos os componentes do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD da NZYtech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema duplex de RT-PCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ARN viral SARS-CoV-2 (gene RdRp) e do ARNm humano (gene RNase P, RP). Amplificações positivas foram observadas para os genes alvo, controlo positivo e controlos internos através dos canais FAM e JOE, de acordo com os conjuntos de *primers*/sonda.

13. Apoio técnico

Para apoio técnico, por favor contactar por telefone a nossa equipa dedicada de apoio técnico: +351 213643514 ou através do correio eletrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

Todas as marcas registadas que surgem neste manual são propriedade dos seus respetivos representantes.

15. Tabela de símbolos

IVD	Dispositivo de diagnóstico médico *in vitro*		Consultar instruções para utilização
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura	Σ	Suficiente para
CONTROL +	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (mistura primer/sonda)
CONTROL –	Controlo negativo		

16. Declaração de conformidade

Nome do produto: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD03201

Utilização: Deteção qualitativa de SARS-CoV-2

Classificação: Outros (não abrangidos pelo Anexo II ou não destinados ao auto-diagnóstico) segundo a Diretiva 98/79/CE

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar, Edifício E, R/C

1649-038, Lisboa

Portugal

Nós, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC e do regulamento (EU) 2017/746 aplicado aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Diretora Técnica

17. Referências

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 march 2020. Available online at https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf.

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17 March 2020. Available online at https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza.

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In Nature 579 (7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics. Chem. Biol. 7(1) 63-72.

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14). bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862.