SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Kit PCR em tempo real para SARS-CoV-2 num passo, genes alvo RdRp e N, IVD

Genes virais da ARN polimerase dependente de ARN (RdRp) e da fosfoproteína nucleocápside (N)

REF MD04831, 96 reações
MD04832, 4 x 96 reações

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

CE IVD

PT

Instruções de utilização

MD0483_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. Descrição do produto ... 3
5. Armazenamento, conservação e manuseamento ... 4
6. Materiais e instrumentos necessários não fornecidos ... 4
7. Colheita e preparação da amostra ... 4
8. Advertências e precauções ... 4
8.1. Informação de segurança ... 5
8.2. Manuseamento e procedimentos adequados ... 5
9. Procedimentos de testagem ... 5
9.1. Preparação das reações de RT-PCR ... 5
9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real ... 6
10. Análise de dados ... 6
10.1. Critérios de validação ... 6
10.2. Interpretação dos resultados ... 6
11. Avaliação de desempenho do teste ... 7
11.1. Resultados esperados ... 7
11.2. Sensibilidade analítica ... 7
11.3. Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes ... 8
11.4. Precisão ... 9
11.4.1. Repetibilidade ... 9
11.4.2. Reprodutibilidade diária ... 9
11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes ... 9
11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores ... 9
11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos ... 9
11.5. Avaliação clínica ... 10
12. Controlo de qualidade ... 10
13. Apoio técnico ... 10
14. Marcas registadas e direitos de propriedade ... 10
15. Tabela de símbolos ... 10
16. Declaração de conformidade ... 11
17. Referências ... 12

1. Introdução

Em dezembro de 2019, uma nova doença respiratória aguda, designada de doença por Coronavírus 2019 (COVID-19), foi identificada na China e rapidamente se disseminou pelo mundo inteiro. O agente causador foi identificado como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2, pelo seu acrónimo em inglês). Tal como o Coronavírus da SARS (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. 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. A sintomatologia mais frequente da COVID-19 compreende a fadiga, febre e problemas nas vias respiratórias inferiores, tais como tosse seca e dispneia. Em casos mais graves, a infeção progride para pneumonia aguda, levando ao síndrome respiratório agudo e perda de função dos órgãos vitais, ameaçando a vida do paciente. De acordo com o conhecimento atual, uma proporção significativa das infeções é assintomática ou com sintomas ligeiros.

2. Utilização prevista

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, 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. Um resultado positivo indica a presença de ARN de SARS-CoV-2, mas a correlação clínica da anamnese e outras informações de diagnóstico são necessárias para determinar o estado de infeção do paciente. Um resultado negativo não impede a existência de infeção por SARS-CoV-2 e não deve ser adotado como único instrumento para a decisão de tratamento do paciente. A testagem deve ser executada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, 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, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech fornece o conjunto de reagentes, *primers* 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**.). Os genes da ARN polimerase dependente de RNA (RdRp) e da fosfoproteína de nucleocápside (N) foram previamente identificados como marcadores altamente específicos para o SARS-CoV-2. Os *primers* e sondas do kit SARS-CoV-2 têm 100% de homologia com >95% das >5M sequências do genoma disponíveis no banco de dados GISAID (novembro, 2021), incluindo identidade completa para as variantes Delta (B.1.617.2) e Ómicron (B.1.1.529). Por outro lado, o conjunto de *primers* e sonda foram desenhados especificamente para regiões genómicas dos genes RdRp e N de SARS-CoV-2 não apresentando homologia significativa com outros genomas não relacionados, o que traduz a elevada especificidade e sensibilidade de deteção do teste, já que evita a deteção cruzada de outros organismos causadores de doenças respiratórias. 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. O controlo positivo consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as três sequências alvo detetadas pelo kit (genes SARS-CoV-2 RdRp e N e gene RP humano). 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 as sequências dos genes alvo do SARS-CoV-2 e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit.

Neste kit, a determinação qualitativa de ARN viral é baseada na técnica de RT-PCR em tempo real, a qual constitui um método sensível e fidedigno para detetar com exatidão o SARS-CoV-2. O princípio do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, 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 três conjuntos de *primers* /sonda altamente específicos e baseados no princípio TaqMan®. Em alternativa, as amostras quando recolhidas num meio de transporte específico (ver colheita e preparação da amostra na **Secção 7.**) podem ser usadas diretamente na reação de RT-PCR após tratamento térmico. Na presença de ARN viral, as sondas TaqMan® ligam-se especificamente a regiões conservadas dos genes RdRp e N do SARS-CoV-2, que se encontram flanqueadas por dois pares de *primers* igualmente específicos. Um terceiro 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 se ocorreu ou não inibição da reação pela presença de inibidores de PCR nas amostras clínicas. Para permitir a identificação da amplificação dos três alvos específicos em uma única reação, as sondas específicas para SARS-CoV-2 e RNase P humana são marcadas com fluoróforos emissores diferentes, FAM™ e JOE™, respetivamente. Assim, este kit consiste num ensaio triplex em que no mesmo canal ótico FAM são detetados dois alvos do SARS-CoV-2, possibilitando-se potenciar a robustez e sensibilidade de deteção do SARS-CoV-2. 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 *primers* /sonda específicos para o ARN viral SARS-CoV-2.

4. Descrição do produto

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

COMPOSIÇÃO DO KIT		VOLUME (POR TUBO)	NÚMERO DE TUBOS	
			MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp & N)	Mistura enzimática NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (genes RdRp & N)/ mistura de *primers* /sondas RP	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (genes RdRp & N)/ Controlo positivo RP	105 µL	1	4
NTC	Controlo negativo	105 µL	1	4

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados de -85 °C a -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. Atender ainda a:

- 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 (RdRp & N genes)/RP mistura primers/sonda (SARS-CoV-2 PPMix, RdRp & N) deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix (SARS-CoV-2 MMix, RdRp & N) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente SARS-CoV-2 (RdRp & N genes)/RP mistura primers /sonda (SARS-CoV-2 PPMix, RdRp & N).
- 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 não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real com deteção para 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 de baixa retenção (livres de RNase/Dnase).
- Luvas descartáveis.
- Agitador do tipo Vortex e centrífuga.
- Água DEPC (por favor contacte a NZYtech para adquirir o produto DEPC-treated water, referência MB43701).

7. Colheita e preparação da amostra

Diferentes fatores, tais como, o protocolo para a colheita de amostras biológicas 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 recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. As amostras que não forem testadas num período de 24 horas devem ser armazenadas de -85 °C a -15 °C. Além disso, devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas em concordância com os regulamentos de biossegurança.

- **Amostras biológicas sujeitas a extração de ácidos nucleicos**: o ARN ou ácidos nucleicos totais, extraídos segundo um protocolo IVD, constituem o material inicial para o ensaio usando o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, 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 contém 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.
- **Amostras biológicas usadas diretamente no protocolo de RT-PCR**: as amostras nasofaríngeas devem ser recolhidas usando zaragatoas Greiner Bio-One (referência CM-FS913) e colocadas diretamente no meio de transporte e armazenamento VACUETTE®, Tubo de estabilização de vírus Greiner Bio-One (referência 456161). Pipetar alíquotas de 50 µL de cada amostra, transferir para placas de PCR de 96 poços que devem ser seladas e realizar imediatamente um passo de tratamento térmico a 95 ˚C, durante 5 minutos, usando um termociclador com tampa aquecida. Alternativamente, pipetar alíquotas de 200 µL e proceder à sua inativação em tubos *eppendorf* de 1,5 mL usando um bloco de calor.

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.

O protocolo de RT-PCR direto foi validado exclusivamente para amostras nasofaríngeas transportadas e armazenadas no meio VACUETTE®, Tubo de estabilização de vírus (Greiner Bio-One, referência 456161). Assim, o protocolo de RT-PCR direto do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit,

RdRp and N target genes, IVD não foi validado em amostras transportadas e armazenadas em meios de colheita do tipo "VTM/UTM" (que incluem tiocianato de guanidina como agente inativante), pelo que recomendamos que utilize exclusivamente apenas o meio de transporte e armazenamento referido acima. O uso de outros meios de transporte pode traduzir-se em resultados falso-negativos. Se outro meio de colheita for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

8.1. Informação de segurança

Antes de utilizar 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 especializados 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 o NTC fornecido no kit.
- Em caso de utilização do protocolo direto, recomenda-se que seja realizado um segundo controlo negativo utilizando a água DEPC (NZYtech, referência MB43701) que será adicionada às amostras a testar por RT-PCR direto.
- 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. **Pipetar sempre o controlo positivo SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) em último lugar de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

9.1. Preparação das reações de RT-PCR

1. Preparar uma mistura de reação RT-PCR com o volume suficiente para o número de testes SARS-CoV-2/Rnase P a realizar; adicionar 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 NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL. Caso seja utilizado o protocolo de RT-PCR direto, deverá ser incluído um segundo controlo negativo, adicionando 8 µL de água DEPC (NZYtech, referência MB43701) em substituição da amostra biológica não extraída.
4. a. Para as **amostras biológicas extraídas**, adicione 8 µL de cada amostra de ARN nos poços relativos ao ensaio SARS-CoV-2 (RdRp & N)/Rnase P, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.

b. Para as **amostras biológicas não extraídas**, após tratamento térmico a 95 °C durante 5 minutos, adicione 4 µL de cada amostra nos poços relativos ao ensaio SARS-CoV-2 (RdRp &N)/Rnase P, de acordo com a configuração de testagem da placa. A cada amostra adicione 4 µL de água DEPC (NZYtech, referência MB43701) para perfazer o volume final que deve ser de 20 µL. Não exceder o volume de 4 µL de amostra.

5. Para o controlo positivo, adicione 8 µL de SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) no poço relativo ao controlo positivo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

6. Selar 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. Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de RT-PCR de acordo com a secção seguinte.

9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado para um 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(*)

(*) Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados.

Corantes Fluorescentes dos genes alvo e Canais de Deteção

GENES ALVO	CORANTES FLUORESCENTES	CANAL DE DETEÇÃO
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
Rnase P	JOE™	JOE ou VIC ou HEX

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche LightCycler® 480 Instrument II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q 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 (nos canais FAM e/ou JOE), poderá ter ocorrido contaminação. Recomendamos que descontamine o laboratório, materiais e equipamento e que repita o procedimento seguindo boas práticas de PCR em tempo real, utilizando um kit selado.

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

SARS-CoV-2 é detetado se a curva de amplificação do FAM™ é sigmoide com Ct≤35, independentemente do resultado obtido para o gene RP (JOE™).

SARS-CoV-2 não é detetado se a curva do FAM™ não for positiva (Ct>35), 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 sigmóides são indicativas de uma amplificação real).**

RESULTADO SARS-COV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	RESULTADO RP RP, CT (JOE™)	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
+ (Ct≤35)	+ (Ct≤40)	SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO
+ (Ct≤35)	- (Ct>40)	SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO
- (Ct>35)	+ (Ct≤40)	SARS-CoV-2 não detetado → NEGATIVO
- (Ct>35)	- (Ct>40)	Teste inválido, repetir extração de ARN e teste

Nota 1: *A NZYtech recomenda repetir a análise para todas as amostras que apresentem uma curva ambígua ou atípica que não permita uma interpretação clara dos resultados.*

Nota 2: *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).

Um resultado negativo não impede a infeção por SARS-CoV-2 e não deve ser usado como único indicador para o tratamento ou outras decisões relativas ao paciente. Além disso, este teste não pode descartar doenças causadas por outros patogénicos bacterianos ou virais.

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Roche LightCycler® 480 Instrument II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q 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

Gráficos de amplificação típicos referentes a amostras clínicas contendo ácidos nucleicos SARS-CoV-2 encontram-se apresentados na Figura 1. Os dois casos representam exemplos de amostras clínicas apresentando cargas virais médias (A) e altas (B) do SARS-CoV-2. Em casos de cargas virais muito altas de SARS-CoV-2 (ver Figura 1B), a curva do canal JOE, correspondente ao gene humano RNase P, pode estar ausente ou exibir uma forma atípica.

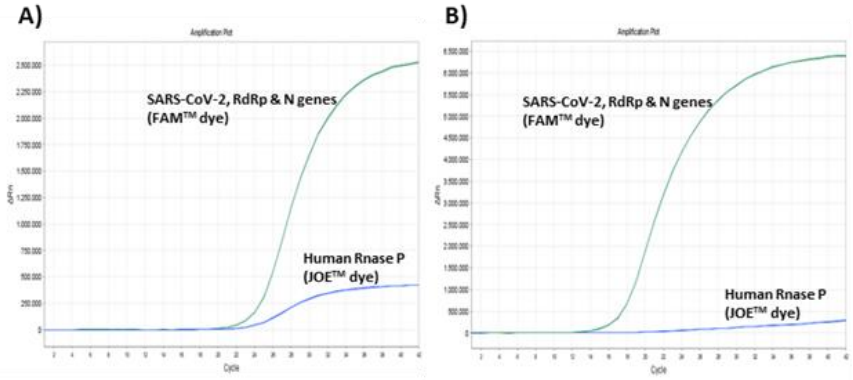

Figura 1. Deteção em simultâneo das sequências alvo SARS-CoV-2 (RdRp and N genes) e do gene humano da RNase P a partir de amostras clínicas positiva (A) e muito positiva (B). Curva verde: deteção das sequências alvo de ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp e N) através do canal FAM; Curva azul: deteção do gene humano RNase P através do canal JOE.

11.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada com 95% de confiança. Para amostras isoladas e purificadas através de um sistema de extração, este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 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 4 dias, produzindo 48 réplicas para cada concentração de SARS-CoV-2 testada. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta 0,15 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 0,15 cópias/µL ou de 150 cópias/mL. O LoD do kit foi confirmado 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, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech para detetar diferentes cargas virais (de 5 x 10^6 até 5 cópias por reação) é apresentada na Figura 2

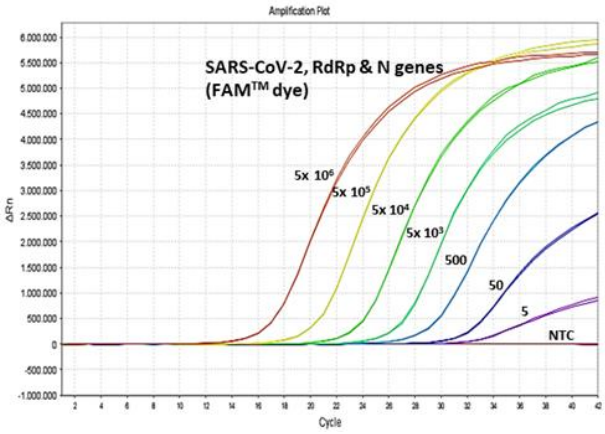

Figura 2. Sensibilidade do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Curvas de amplificação (número de ciclos *versus* fluorescência - ΔRN) de diluições seriadas de 1:10 de ARN viral SARS-CoV-2, desde 5 x 10^6 cópias até 5 cópias por reação através do canal FAM. NTC, controlo negativo.

Para as amostras não sujeitas a um protocolo prévio de extração de ácidos nucleicos e simplesmente recolhidas no meio de colheita acima referido, a sensibilidade analítica foi, numa primeira fase, avaliada comparando os valores de Ct de amostras clínicas sujeitas ou não ao processo de extração. Assim, o ARN de 50 amostras clínicas anteriormente confirmadas como positivas foi extraído e utilizado para deteção de SARS-CoV-2 por comparação com o teste efetuado diretamente com a amostra não extraída, somente no meio de cultura. Do total das 50 amostras clínicas positivas testadas (com o protocolo direto ou sujeitas a extração prévia) o Ct mínimo observado foi 16,1 e o Ct máximo foi 34,9. Os resultados indicaram que para a deteção de SARS-CoV-2 a diferença média de Cts entre os dois procedimentos foi de 0,1. Esta proximidade de valores sugere que o LoD não se altera quer a amostra seja ou não sujeita a um protocolo prévio de extração do ARN. Assim, o LoD do kit quando se procedeu à deteção sem extração prévia de ácidos nucleicos foi reavaliado e confirmado por dois operadores diferentes num ensaio de 48 testes. Os resultados confirmaram que o kit deteta 0,15 cópias/µL de ARN viral SARS-CoV-2 com uma confiança ≥95%, quando é utilizado no formato de testagem direta.

11.3. Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes

A inclusividade e a reatividade cruzada do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR kit, genes RdRp e N, IVD, 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.

Os ensaios *in vitro* para reatividade cruzada (exclusividade) foram realizados para confirmar que o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD não reage com outros microrganismos colonizadores e patogénicos comumente encontrados em amostras clínicas humanas. Este estudo foi realizado usando três painéis comerciais de patógenos respiratórios comercializados pela ZeptoMetrix, nomeadamente o RP Multimarker Controls (# MDZ001), NATtrol ™ Respiratory Pathogen Panel-1 (# NATRPP-1) e NATtrol ™ RP Controls (# NATRPC-NNS). Esses painéis incluem pesquisas de amostras representativas de verdadeiros espécimes clínicos humanos, incluindo Influenza A H3N2 (Brisbane / 10/07), Influenza A H1N1 (NY02 / 2009), Rinovírus Tipo 1A, Adenovírus Tipo 3; Parainfluenza Tipo 1, Parainfluenza Tipo 2, Parainfluenza Tipo 3, Parainfluenza Tipo 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Tipo A1), Influenza A H1N1 (A / New Cal / 20/99), Influenza A H1N1 (A / Singapore / 63/04), Influenza B (B / Florida / 02/06), Vírus Sincicial Respiratório A, Vírus Sincicial Respiratório B (CH93 (18) - 18), Coronavírus (HKU-1 recombinante), Coronavírus (OC43), Coronavírus (NL63), Coronavírus (229E), *Bordetella pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) e Human Bocavirus. Quer a extração de todas as amostras quer os ensaios foram feitos em triplicado. Adicionalmente à análise *in silico*, foi realizado o ensaio RT-PCR para o SARS-CoV-2 utilizando ácidos nucleicos de microrganismos 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*. Os resultados obtidos, utilizando-se três lotes de diferentes deste kit, confirmaram que nenhum dos microrganismos testados interferiu no desempenho do SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD ao originar uma amplificação de sinal detetável quer fosse resultado falso positivo ou um sinal inespecífico.

O impacto da potencial interferência de substâncias encontradas em amostras de exsudado nasofaríngeo na sensibilidade de deteção viral pelo kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD, foi avaliada num ensaio de substâncias interferentes (tabela em baixo). Neste estudo foram utilizadas amostras artificiais constituídas pelo vírus SARS-CoV-2 inativado numa matriz de exsudado nasofaríngeo negativo. As amostras artificiais foram preparadas adicionando o vírus na concentração 3x LoD a uma matriz clínica negativa tendo sido também preparada uma amostra controlo sem vírus. As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras artificiais em concentrações que representam os níveis mais elevados esperados em amostras respiratórias artificiais com base na revisão da literatura. Foi também incluído um controlo negativo utilizando-se água como substância adicionada. Estes ensaios demonstraram que todas estas substâncias não interferem na sensibilidade de deteção do vírus pelo SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech. Todas as experiências realizaram-se no instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST.

POTENCIAL INTERFERENTE	SUBSTÂNCIA ATIVA	CONCENTRAÇÃO FINAL NA AMOSTRA	INTERFERÊNCIA SIM (S) NÃO (N)
Água do Mar isotónica (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Spray para a garganta, anestésico e analgésico oral (Strepfen)	Flurbiprofeno	5% v/v	N
Solução de lavagem nasal (Spray para alergias – Vibrocil)	Propionato de Fluticasona	5% v/v	N
Corticosteroides em spray nasal (Nasomet)	Furoato de Mometasona	5% v/v	N
Corticosteroides em spray nasal (Pulmicort)	Budesonida	5% v/v	N
Antimicrobiano, Sistémico (Trobex)	Trobacina	10 µg/mL	N
Solução bucal anti-inflamatória, analgésica e anti-séptica (Pyralvex)	Extrato de Ruibardo e Ácido salicílico	5% v/v	N
Tópico orofaríngeo, antifúngico e Antimicrobiano (Daktarin)	Nitrato de Miconazol	5 mg/mL	N
Elixir Bucal Antisséptico (Eludril Gé)	Gluconato de Clorhexidina, Clorbutanol hemihidratado	5% v/v	N
Xarope Antitússico (Codipront)	Codeína, Citrato de feniltoloxamina	5% v/v	N
Sangue (humano)	-	4% v/v	N
Antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolítico (Mucosolvan)	Cloridrato de ambroxol	5% v/v	N
Solução gotas nasais (Nasarox)	Cloridrato de Oximetazolina	10% v/v	N
Antibiótico, pomada nasal (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Saliva (humana)	-	25% v/v	N
Etanol absoluto	Álcool	5% v/v	N

11.4. Precisão

A precisão do ensaio do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos SARS-CoV-2 representativos de duas cargas virais, 5 (1,67x LoD) e 150 (50x LoD) 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 36 réplicas para cada amostra (5 e 150 cópias por reação), contabilizando um total de 72 testes executados.

11.4.2. Reprodutibilidade diária

A reprodutibilidade diária foi avaliada pela análise de 72 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação), durante 4 dias com 18 réplicas por cada concentração por dia (num total de 144 ensaios).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada pela análise de 144 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação) usando 3 lotes diferentes do kit com 48 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 72 réplicas de cada amostra (5 e 150 cópias por reação), por quatro operadores, num total de 36 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.

Precisão of kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech

VARIÁVEL TESTADA		SARS-CoV-2 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		5	150
REPETIBILIDADE	n	36	36
	Média Cq	31,72	26,30
	Coeficiente de Variação (%)	1,94	1,60
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	72	72
	Média Cq	31,42	26,13
	Coeficiente de Variação (%)	1,50	1,55
	% Réplicas detetadas	100	100

REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	144	144
	Média Cq	31,49	26,24
	Coeficiente de Variação (%)	1,61	1,46
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	72	72
	Média Cq	31,45	26,21
	Coeficiente de Variação (%)	1,41	1,61
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	72	72
	Média Cq	31,81	26,46
	Coeficiente de Variação (%)	1,61	1,35
	% Réplicas detetadas	100	100

11.5. Avaliação clínica

A avaliação do desempenho do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech foi realizada a partir de amostras de esfregaço nasofaríngeo extraídas e foi levada a cabo em três laboratórios de testagem externos. No total, 340 amostras clínicas negativas e 386 amostras clínicas positivas foram testadas. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as amostras positivas e negativas analisadas. A avaliação do desempenho do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD, foi também realizada a partir de amostras de esfregaço nasofaríngeo não sujeitas a um protocolo prévio de extração de ácidos nucleicos. No total, 104 amostras clínicas negativas e 51 amostras clínicas positivas foram testadas. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as amostras positivas e negativas analisadas.

12. Controlo de qualidade

Todos os componentes do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD da NZYtech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema triplex 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, RdRp and N target genes, IVD

Número de catálogo: MD04831/MD04832

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.

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