

# COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Kit de RT-PCR para COVID-19 & Gripe A/B num passo, IVD

**REF** MD04851, 96 reações

*Dispositivo médico para diagnóstico in vitro*



**PT**

Instruções de utilização

MD0485\_IM\_pt

VERSÃO 2401, janeiro 2024



## Índice

1. Introdução.....	3
2. Utilização prevista.....	3
3. Princípio do ensaio.....	3
4. Descrição do produto.....	4
5. Armazenamento, conservação e manuseamento .....	4
6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos.....	4
7. Colheita e preparação da amostra.....	4
8. Advertências e precauções .....	5
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-qPCR .....	5
9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real .....	6
10. Análise de dados .....	6
10.1 Critérios de validação da corrida .....	6
10.2 Interpretação dos resultados.....	7
11. Avaliação de desempenho do teste.....	8
11.1 Resultados esperados .....	8
11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Detecção (LoD).....	8
11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas .....	9
11.4 Precisão.....	9
11.4.1 Repetibilidade .....	10
11.4.2 Repetibilidade diária .....	10
11.4.3 Reprodutibilidade entre lotes.....	10
11.4.4 Reprodutibilidade entre operadores .....	10
11.4.5 Reprodutibilidade entre equipamentos.....	10
11.5 Avaliação Clínica.....	11
12. Controlo de Qualidade.....	11
13. Apoio Técnico.....	11
14. Marcas registadas e direitos de propriedade .....	11
15. Tabela de símbolos .....	12
16. Declaração de Conformidade .....	13
17. Referências.....	14

## 1. Introdução

Face à situação pandémica da COVID-19, doença provocada pelo novo *Betacoronavírus*, SARS-CoV-2 que foi detetado em dezembro de 2019 na China e que significa “Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus 2”, verificou-se a nível mundial um excesso de casos de morbilidade e mortalidade sem precedentes, o que levou a uma crise de saúde pública global assim como a um colapso dos recursos de saúde. A gripe (Influenza) sazonal é uma doença infecciosa respiratória aguda, contagiosa, mas na maioria dos casos benigna, causada por vírus ARN da Família Orthomyxoviridae (vírus Influenza/gripal). A gripe, apresenta-se na maior parte das vezes, sob a forma epidémica afetando milhões de pessoas por ano, das quais cerca de 0.1% desenvolvem pneumonias que levam à hospitalização e/ou morte, sendo um sério problema de saúde pública. Contudo, o rácio de fatalidades da gripe é menor do que a de COVID-19. Existem três tipos de vírus Influenza: o A, o B e o C; embora apenas os dois primeiros apresentam relevância clínica na saúde humana, pois são os principais causadores das epidemias atuais. Os vírus Influenza A são os mais frequentes, são essencialmente um vírus das aves que se adapta ocasionalmente aos mamíferos, incluindo suínos, equinos e aos humanos podendo causar pandemias (isto é, epidemias que se propagam ao mundo todo). Os vírus B e C infetam apenas humanos. A influenza B é responsável por surtos localizados em pequenas comunidades.

O SARS-COV-2 e o vírus gripal são agentes infecciosos diferentes, contudo ambos originam infeções respiratórias deveras contagiosas cuja principal via de transmissão é o contacto direto com gotículas respiratórias (falar, tosse e espirrar). Este contacto pode dar-se de forma direta, através da interação com um sujeito infetado, ou de forma indireta, através do contacto com superfícies ou objetos contaminados e posterior toque nos olhos, no nariz ou na boca.

A COVID-19 pode provocar uma infeção respiratória grave, como é o caso da pneumonia, e é consideravelmente mais contagiosa do que a gripe. A possibilidade da coexistência da pandemia de COVID-19 com uma epidemia simultâneas de gripe e de co-circulação de outros vírus sazonais representa um desafio adicional para os cuidados de saúde, com perigo de colapsar com consequências catastróficas para a saúde das populações. A deteção precoce do SARS-CoV-2 e do vírus da Influenza é importantíssima quer para providenciar o tratamento mais rápido aos pacientes infetados com estas doenças respiratórias, mas principalmente para minimizar a transmissão do SARS-Cov-2 e do vírus influenza.

## 2. Utilização prevista

O kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech é um teste molecular multiplexado baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção qualitativa dos ácidos nucleicos específicos dos vírus responsáveis quer pela COVID-19 (SARS-CoV-2) quer pela Influenza (vírus das gripes A e da B), em amostras biológicas humanas. Contudo, este kit não permite a distinguir o vírus da Influenza A e o da B, uma vez que ambos geram sinal de fluorescência no canal de deteção FAM. Além disso, outros *Betacoronavírus* e o vírus da Influenza C não são detetados através deste kit. Este teste serve como complemento ao diagnóstico que deve ser combinado com os sinais clínicos e sintomas de infeção viral respiratória.

Um resultado positivo indica a presença de ARN viral de SARS-CoV-2 e/ou Influenza A e B, 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 preclui 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 realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e experiência em diagnóstico *in vitro*.

As amostras clínicas adequadas incluem zaragatoa ou aspirado nasofaríngeo ou orofaríngeo, expetoração, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, zaragatoa conjuntival

## 3. Princípio do ensaio

O kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa dos genomas do SARS-CoV-2, do Influenza A e do Influenza B, através da técnica 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. No caso dos vírus de Influenza, a escolha dos *primers*/sonda foi verificada por análise de comparação de sequências altamente conservadas com sequências disponíveis publicamente, para garantir que os genes alvos: proteína de matriz (M1) e o proteína não estrutural (NS2), sejam detetados nos genomas virais da Influenza A e da Influenza B, respetivamente. O kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi constituído para ter um amplo perfil de deteção possível, mas permanecendo específico para os genomas do SARS-CoV-2 (incluindo as variantes Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529), e Influenza tipo A e B. Os *primers* e sondas do kit SARS-CoV-2 têm 100% de homologia com >95% das >10.000 sequências do genoma disponíveis no banco de dados GISAID (novembro, 2022) e não detetam outros coronavírus comuns. Por outro lado, o conjunto de oligonucleótidos foi desenhado especificamente para deteção dos três genomas virais já mencionados, 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. A capacidade de mutação das maquinarias genéticas de sobrevivência destes vírus é praticamente ilimitada, o que implica que novas sequências dos seus genomas virais venham a ser disponibilizadas após a criação deste kit. Desta forma, a NZYtech revisita periodicamente as sequências dos genes alvo do SARS-CoV-2 e dos vírus gripais A e B, e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit. Adicionalmente, o kit inclui três controlos externos (dois controlos positivos fornecidos em baixa concentração e o controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo 1 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as seguintes três sequências alvo detetadas pelo kit (gene RdRp SARS-CoV-2, gene NS2 Influenza B e gene RP humano). O controlo positivo 2 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as seguintes três sequências alvo detetadas pelo kit (genes N SARS-CoV-2, gene M1 Influenza A e gene RP humano).

Neste kit, a determinação qualitativa de ARN viral é baseada na técnica de RT-PCR em tempo real, metodologia de referência no diagnóstico laboratorial. É uma metodologia de elevada sensibilidade e especificidade para detetar com exatidão o SARS-CoV-2 e os vírus da gripe A e da gripe B. O princípio do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR 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 cinco conjuntos de *primers*/sonda altamente específicos e baseados no princípio TaqMan®. Na presença de ARN viral extraído de amostras de um paciente infetado, as sondas TaqMan® ligam-se especificamente a regiões conservadas dos genes RdRp e N do

SARS-CoV-2, a regiões conservadas dos genes M1 e NS2 do vírus das gripes A e B respetivamente, e que se encontram flanqueadas por dois pares de *primers* igualmente específicos. Um quinto conjunto de oligonucleótidos (*primers* e 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/ausência de inibidores de PCR nas amostras clínicas. Para permitir a identificação da amplificação dos cinco alvos específicos em uma única reação, as sondas específicas para SARS-CoV-2 e RNase P humana são marcadas com fluoróforos emissores diferentes, TexasRed®, FAM™ e JOE™, respetivamente. Assim, este kit consiste num ensaio pentaplex em que no canal ótico TexasRed são detetados dois alvos do SARS-CoV-2, no canal ótico FAM são detetados dois alvos referentes quer ao vírus da gripe A quer ao vírus da gripe B. O facto de dois alvos do SARS-CoV-2 emitirem ao mesmo fluorescência no mesmo canal, amplifica a robustez e sensibilidade de deteção do SARS-CoV-2., contudo impede que no caso dos vírus da Influenza estes sejam distinguidos em A ou B. Igualmente, 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 COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech providencia o conjunto de reagentes necessários e suficientes para realizar 96 reações de RT-qPCR num único passo.

KIT COMPONENT		NUMBER OF VIALS	VOLUME (PER VIAL)
COVID-19/Flu MMix	Mistura enzimática NZYMultiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1	1050 µL
COVID-19/Flu Primer Mix	Mistura de primers COVID-19 & Flu A/B (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Probe Mix	Mistura de sonda COVID-19 & Flu A/B (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Pos 1	Controlo positivo 1 COVID-19 & Flu A/B (SARS-CoV-2 RdRp, Influenza B NS2 e gene RP humano)	1	105 µL
COVID-19/Flu Pos 2	Controlo positivo 2 COVID-19 & Flu A/B (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 e gene RP humano)	1	105 µL
NTC	Controlo negativo	1	105 µL

#### 5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD é enviado em gelo seco. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados a -85 °C to -15 °C.

De forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente que pode degradar os componentes do kit, estes deverão ser colocados imediatamente no congelador após a sua utilização.

- É recomendável reduzir ao mínimo o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas com soluções de trabalho. Se conveniente, após descongelação preparar alíquotas de volumes menores dos componentes do kit.
- O componente mistura sonda COVID-19 & Flu A/B (20x) deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, todo o ensaio deve ser protegido de luz direta.
- Contactar imediatamente a NZYtech caso, ao receber o kit, a embalagem esteja 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 com deteção para os fluoróforos Texas Red®, FAM™ e JOE™ (canais de comprimento de onda de 615, 520 e 556 nm, respetivamente); e acessórios fornecidos pelo fabricante Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Consumíveis, reagentes e equipamento para extração de ARN viral de amostras biológicas/clínicas do trato respiratório.
- Consumíveis de plástico para qPCR, isentos de nucleases: tubos de PCR de 1,5 ou 2 mL, tubos e tampas de tiras de 0.1 ml, placas de 96 poços, películas adesivas; blocos de gelo refrigerados;
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases, resistentes a aerossóis.
- Luvas descartáveis.
- Agitador de vórtex e centrífuga de bancada.

#### 7. Colheita e preparação da amostra

Diferentes fatores, tais como, o procedimento de colheita de amostras biológicas das vias respiratórias (zaragatoas ou aspirados nasofaríngeos ou orofaríngeos, expetoração, aspirado traqueal; lavado bronco-alveolar; zaragatoa conjuntival), o transporte, o armazenamento e a duração do tempo de processamento da amostra, são críticos para assegurar a integridade da amostra e atingir os resultados ótimos. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita inadequada, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Além disso, devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas em concordância com os regulamentos de biossegurança. Consulte as directrizes da OMS: *WHO Laboratory Biosafety Guidance Related to the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)). O ARN ou ácidos nucleicos totais, extraídos segundo um protocolo CE IVD, constituem o material inicial para o ensaio usando o kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR 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 absorvância 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 oligonucleotídeos (*primers* e 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

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade; totalidade e tipo de componentes do kit; etiquetagem correta e se congelado aquando entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. 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 da reação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

### 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](http://www.nzytech.com)). A deteção dos vírus respiratórios SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, 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/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.
- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem DNase/RNase) em todos os procedimentos.
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para: a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possível mude de bata.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infecciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias; deve ser guardado e manuseado longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre a água fornecida no kit (COVID/Flu Neg - RNase/DNase free water), água livre de nucleases).
- 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. Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos.
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada 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. **Recomenda-se vivamente pipetar sempre em último lugar os controlos positivos 1 e 2 do kit, COVID-19/Flu Pos1 e COVID-19/FLU Pos 2, de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

### 9.1 Preparação das reações de RT-qPCR

1. Preparar uma mistura de reação RT-qPCR 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	VOLUME1 REAÇÃO (µL)	VOLUME n REAÇÕES (*) + 5% (µL)
COVID-19/Flu MMix (2x)(**)	10	$n \times 10.5$
COVID-19/Flu Primer Mix (20x)	1	$n \times 1.05$
COVID-19/Flu Probe Mix (20x)	1	$n \times 1.05$
<b>VOLUME FINAL</b>	<b>12</b>	<b><math>n \times 12.6</math></b>

(\*) 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).

(\*\*) Um ligeiro precipitado pode surgir no tubo, em particular após vários ciclos de congelação/ descongelação. Para garantir o desempenho ideal, proceda a uma agitação vigorosa da mistura de enzimas antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de enzimas antes de pipetar.

- Pipete 12 µL da mistura reação RT-PCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de RT-qPCR.
- Para o controlo negativo, adicionar 8 µL de controlo negativo (NTC) no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
- Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ARN nos poços relativos ao ensaio COVID-19/Flu, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.
- Para os dois controlos positivos, adicionar 8 µL de COVID-19/Flu Pos 1 (que deteta os genes SARS-CoV-2 RdRp, Influenza B NS2 e RP humano) e 8 µL de COVID-19/Flu Pos 2 (que deteta os genes SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 e RP humano) em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
- Selar a placa contendo todas as reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de RT-qPCR em tempo real para deteção das sequências.
- Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de RT-qPCR 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 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 recomendadas para o protocolo

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	50 °C	20 min	Transcrição Reversa
1	95 °C	3 min	Ativação da polimerase
40	95 °C	5 s	Desnaturação
	60 °C	1 min	Emparelhamento/Extensão*

\* Dependendo do equipamento utilizado, selecione o canal de deteção adequado.

### Fluoróforos/Marcações

GENES ALVO /DETECTOR	CORANTES FLUORESCENTES	CANAL DE DETEÇÃO
RdRp e N genes-alvo (SARS-CoV-2)	Texas Red®	Texas Red
Flu A M1 gene-alvo (Influenza A)	FAM™	FAM
Flu B NS2 gene-alvo (Influenza B)	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	Joe ou HEX/VIC
COVID-19/Flu Pos 1	Texas Red® & FAM™ & JOE™	Texas Red & FAM & JOE/HEX/VIC
COVID-19/Flu Pos 2	Texas Red® & FAM™ & JOE™	Texas Red & FAM & JOE/HEX/VIC

O kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em Tempo Real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 e Bio-Rad® CFX96™. Se pretender usar outro equipamento, o kit deve ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

## 10. Análise de dados

### 10.1 Critérios de validação da corrida

Previamente à análise dos resultados, recomendamos que consulte o manual do utilizador do respetivo aparelho. De seguida verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivos e negativo estão em acordo com os seguintes critérios:

**Controlos positivos:** as curvas de amplificação para Texas Red (SARS-CoV-2), FAM (Influenza A e Influenza B) e JOE (RP) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com  $Ct < 32$ , para qualquer um dos canais FAM, Texas Red e HEX/VIC. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

**Controlo negativo (reação sem ARN):** nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (FAM, Texas Red 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, significa que 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 Texas Red é sigmoide com  $Ct \leq 35$ , independentemente do resultado obtido para o gene RP (JOE).

**Influenzas A e/ou B é/são detetado(s)** se a curva de amplificação do FAM é sigmoide com  $Ct \leq 35$ , independentemente do resultado obtido para o gene RP (JOE).

**SARS-CoV-2 e Influenzas A e/ou B não são detetados** se a curva do Texas Red não for positiva ( $Ct > 35$ ), enquanto o gene RP (JOE) apresenta uma curva positiva sigmoide com  $Ct \leq 40$ .

O teste é **inválido** se as curvas de amplificação do SARS-CoV-2, Influenza A/B e RP forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova extração de 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 sigmoide são indicativas de uma amplificação real**).

SARS-CoV-2 (TEXAS RED)	INFLUENZA A/B (FAM)	RP (JOE)	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
+ ( $Ct \leq 35$ )	- ( $Ct > 35$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	SARS-CoV-2 detetado → <b>POSITIVO</b>
+ ( $Ct \leq 35$ )	- ( $Ct > 35$ )	- ( $Ct > 40$ )	SARS-CoV-2 detetado → <b>POSITIVO</b>
- ( $Ct > 35$ )	+ ( $Ct \leq 35$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	Influenza A/B detetado → <b>POSITIVO</b>
- ( $Ct > 35$ )	+ ( $Ct \leq 35$ )	- ( $Ct > 40$ )	Influenza A/B detetado → <b>POSITIVO</b>
+ ( $Ct \leq 35$ )	+ ( $Ct \leq 35$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	SARS-CoV-2 e Influenza A/B detetados → <b>POSITIVO</b>
+ ( $Ct \leq 35$ )	+ ( $Ct \leq 35$ )	- ( $Ct > 40$ )	SARS-CoV-2 e Influenza A/B detetados → <b>POSITIVO</b>
- ( $Ct > 35$ )	- ( $Ct > 35$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	SARS-CoV-2 e Influenza A/B não detetados → <b>NEGATIVO</b>
- ( $Ct > 35$ )	- ( $Ct > 35$ )	- ( $Ct > 40$ )	Teste inválido, repetir extração de ARN e novo teste

\* Não é necessária a deteção do Controlo interno no canal de deteção HEX/VIC para resultados positivos no canal de deteção FAM nem no canal de deteção Texas Red. Uma carga viral elevada de ARN alvo na amostra pode originar a redução ou ausência do sinal de Controlo Interno.

**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 transporte, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
  - Recolha da amostra fora da fase virémica/sintomática.
  - Degradação da amostra.
  - Presença de inibidores de RT-qPCR.
  - Mutações no genoma dos vírus.
  - Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.
  - Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em tempo real não validadas.
- Resultados falsos positivos, podem ser causados por:
  - Contaminação cruzada de amostras contendo elevadas concentrações de ARN virais de SARS-CoV-2 e/ou Influenza A/B ou contaminação cruzada com algum dos controlos positivos devido a incorreto manuseamento ou preparação das amostras.
  - Manuseamento incorreto dos controlos positivos.
  - Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

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

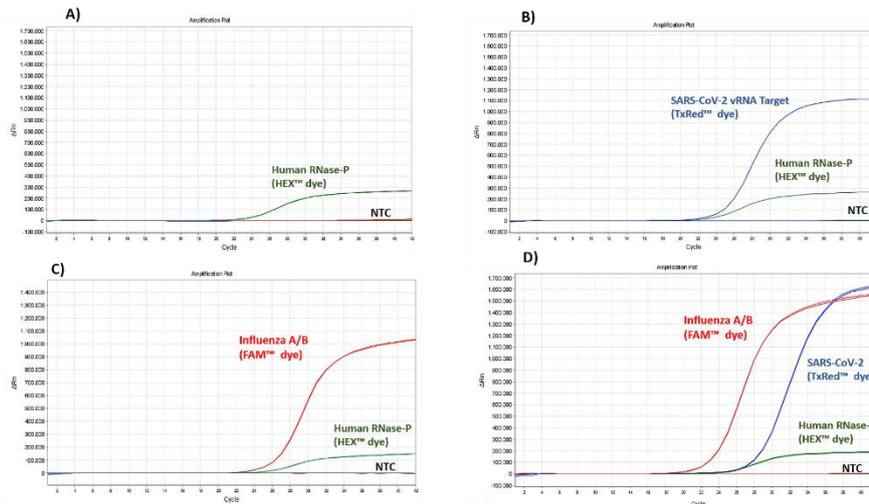
## 11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, e Bio-Rad® CFX96™. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

### 11.1 Resultados esperados

Gráficos típicos de amplificação referentes a amostras clínicas contendo ácidos nucleicos virais SARS-CoV-2 e/ou Influenza A/B encontram-se apresentados na Figura 1. Na figura 1A encontra-se representado uma amostra clínica negativa. Na figura 1B amostra clínica apresentando carga viral média a alta do SARS-CoV-2 onde se verifica o aumento do fluoróforo Texas Red®. Na Figura 1C a presença de material genético de Influenza A/B é indicada pelo aumento do fluoróforo FAM™. Na figura 1D a amostra clínica apresenta uma coinfeção onde a presença de vRNA de SARS-CoV-2 e Influenza A/B são detetados.

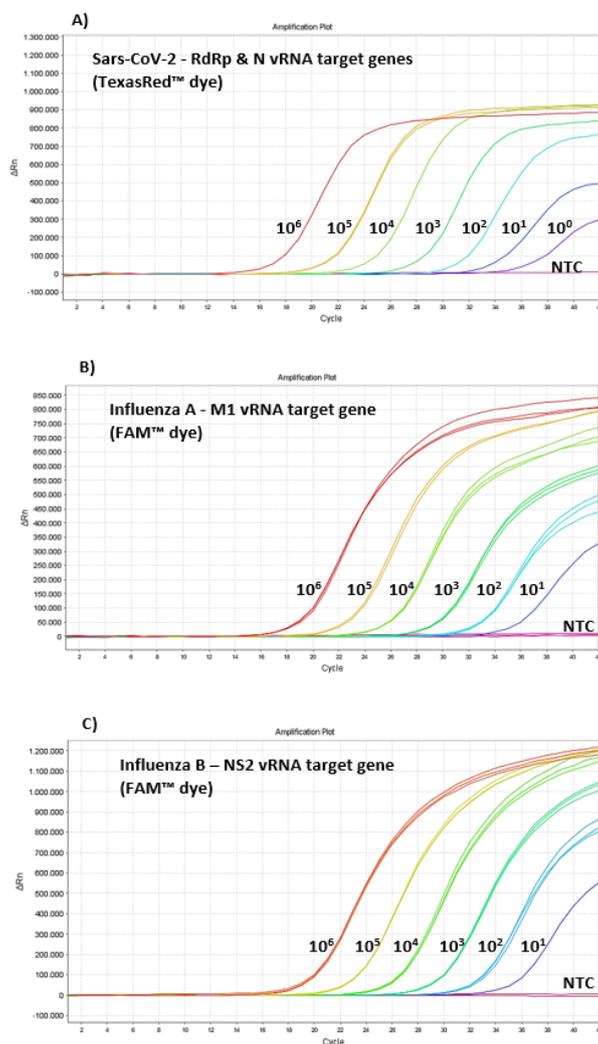
**Nota:** Em casos de cargas virais muito altas a curva do canal HEX/VIC, correspondente ao gene humano RNase P, pode estar ausente ou exibir uma forma atípica.



**Figura 1. Detecção das seqüências dos genes alvo do SARS-CoV-2, Influenza A/B e RNase P humano numa amostra clínica negativa (A) ou a partir de amostras clínicas positivas infetadas com SARS-CoV-2 (B), Influenza A e/ou Influenza B (C), ou em coinfeção de SARS-CoV-2 e Influenza A/B (D).** Curva verde: Detecção de gene humano RNase P através do canal JOE. Curva azul: detecção das seqüências alvo de ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp e N) através do canal Texas Red. Curva vermelha: detecção das seqüências alvo de ARN viral Influenza A (gene M1) e Influenza B (gene NS2) através do canal FAM. NTC controlo negativo

### 11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Detecção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração limitante do vírus respiratório que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias (mas todas diluições limitantes) dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, 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, Influenza A e Influenza B testadas. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta 0,25 cópias/μL de ARN viral SARS-CoV-2, 0,75 cópias/μL de Influenza A e 1,25 cópias/μL de Influenza B, com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Detecção (LoD), é de 0,25 cópias/μL ou de 250 cópias/mL para o SARS-CoV-2, 0,75 cópias/μL ou 750 cópias/mL para o vírus de Influenza A e 1,25 cópias/μL ou 1250 cópias/mL para o vírus de Influenza B. O LoD do kit foi reavaliado por dois operadores usando os 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 COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech para detetar diferentes cargas virais é apresentada na Figura 2.



**Figura 2. Sensibilidade do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech.** Curvas de amplificação (número de ciclos versus fluorescência -  $\Delta Rn$ ) de diluições seriadas de 1:10 de ácidos nucleicos (ARN) virais de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B através dos canais Texas Red e FAM, respetivamente. NTC controlo negativo

A sensibilidade analítica do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech num contexto de coinfeção foi avaliada através da realização de uma série de ensaios em que se utilizou espécimes a simular coinfeção para cada um dos dois alvos virais, ou seja através de uma matriz de fundo simulada. Para o ensaio de simulação de coinfeção foram utilizadas exatamente  $10^4$  cópias de ácidos nucleicos de Influenza A e  $10^4$  cópias de ácidos nucleicos de Influenza B que foram adicionados à curva padrão do SARS-CoV-2. Por sua vez,  $10^4$  cópias de SARS-CoV-2 foram adicionadas às curvas padrão da Influenza A e da Influenza B. Para a determinação de sensibilidade do kit quando estamos na presença de vários vírus alvo presentes numa amostra, elaborou-se um ensaio em que todas as amostras foram analisadas em quadruplicado usando 3 lotes de kit diferentes (o que perfaz um total de 12 replicados por diluição) e seguindo as condições de reação recomendadas no kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Os resultados da interferência competitiva mostram que o LoD para o SARS-CoV-2 e opera a Influenza A não se alterou na presença de coinfeção. No entanto o LoD da Influenza B na presença de coinfeção é de 1,75 cópias/ $\mu$ L ou 1750 cópias/mL.

### 11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos quer do SARS-CoV-2 quer dos vírus da Influenza A e Influenza B, e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. A análise *in silico* (simulação computacional) indica que amplificação significativa de sequências não-alvo que resultam em reatividade cruzada ou que podem interferir potencialmente na deteção de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, não é provável. Através da análise *in silico*, concluiu-se que o ensaio permitiu detetar todas as estirpes dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, e que não existe reatividade com espécies não relacionadas. Para além da análise *in silico*, foi realizado o teste com kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD usando 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*. Nenhum dos patógenos testados pelo ensaio de RT-qPCR originou uma amplificação de sinal detetável, apresentando uma especificidade analítica de 100%.

### 11.4 Precisão

A precisão do ensaio do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos individuais dos vírus SARS-CoV-2, da gripe A e da gripe B representativos de duas cargas virais, 200 (baixa carga viral) e 2000 (média carga viral) cópias por reação, combinadas com ARN extraído de amostras biológicas negativas da orofaringe, utilizando-se 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação específicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da

percentagem (%) de detecção 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 por um operador através da análise de 12 réplicas para cada amostra (200 e 2000 cópias por reação), contabilizando um total de 24 testes executados por de SARS-CoV-2, do vírus da gripe A e da gripe B.

#### 11.4.2 Repetibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 48 réplicas para cada amostra (200 e 2000 cópias por reação), durante 4 dias, com 12 réplicas por cada concentração por dia (num total de 96 reações).

#### 11.4.3 Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 60 réplicas para cada amostra (200 e 2000 cópias por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 20 réplicas por cada lote.

#### 11.4.4 Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 24 réplicas de cada amostra ((200 e 2000 cópias por reação), por quatro operadores, com 6 réplicas por operador e por carga viral, num total de 36 testes por operador.

#### 11.4.5 Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada pela testagem de 36 réplicas por cada amostra (200 e 2000 cópias por reação), em dois equipamentos de PCR em tempo real diferentes (Applied Biosystems® 7500 FAST e Applied Biosystems® QuantStudio 5), num total de 72 testes por equipamento e reação.

#### Precisão do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech, para a detecção do vírus SARS-CoV-2.

VARIÁVEL TESTADA		SARS-CoV-2 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		200	2000
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	28,87	26,35
	Coefficiente de Variação (%)	0,95	1,92
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	12	12
	Média Cq	28,87	26,35
	Coefficiente de Variação (%)	0,95	1,92
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	60	60
	Média Cq	28,86	25,97
	Coefficiente de Variação (%)	1,97	2,71
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	24	24
	Média Cq	28,87	25,68
	Coefficiente de Variação (%)	2,54	2,20
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	24	24
	Média Cq	29,83	26,89
	Coefficiente de Variação (%)	3,29	2,46
	% Réplicas detetadas	100	100

#### Precisão do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech, para a detecção do vírus Influenza A.

VARIÁVEL TESTADA		INFLUENZA A (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		200	2000
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	30,47	26,46
	Coefficiente de Variação (%)	0,82	0,53
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	30,75	26,51
	Coefficiente de Variação (%)	1,39	1,13
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	60	60
	Média Cq	30,69	26,61
	Coefficiente de Variação (%)	1,35	1,13
	% Réplicas detetadas	100	100

<b>REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES</b>	n	24	24
	Média Cq	30,79	26,61
	Coeficiente de Variação (%)	1,55	1,06
	% Réplicas detetadas	100	100
<b>REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS</b>	n	24	24
	Média Cq	30,00	26,07
	Coeficiente de Variação (%)	1,76	1,63
	% Réplicas detetadas	100	100

**Precisão do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech, para a deteção do vírus Influenza B.**

VARIÁVEL TESTADA		INFLUENZA B (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		200	2000
<b>REPETIBILIDADE</b>	n	12	12
	Média Cq	30,72	26,82
	Coeficiente de Variação (%)	0,81	1,08
	% Réplicas detetadas	100	100
<b>REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA</b>	n	48	48
	Média Cq	30,78	26,82
	Coeficiente de Variação (%)	1,14	3,05
	% Réplicas detetadas	100	100
<b>REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES</b>	n	60	60
	Média Cq	30,76	26,82
	Coeficiente de Variação (%)	1,08	2,77
	% Réplicas detetadas	100	100
<b>REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES</b>	n	24	24
	Média Cq	30,87	26,71
	Coeficiente de Variação (%)	1,11	0,73
	% Réplicas detetadas	100	100
<b>REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS</b>	n	24	24
	Média Cq	30,15	26,34
	Coeficiente de Variação (%)	2,01	2,04
	% Réplicas detetadas	100	100

### 11.5 Avaliação Clínica

A avaliação do desempenho do Kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, da NZYtech ao utilizar amostras recolhidas das vias respiratórias foi levada a cabo em um laboratório de testagem externo. No total, 250 amostras clínicas, das quais: 36 amostras positivas para o vírus da influenza AH1; 36 amostras positivas para o vírus da influenza AH3; 58 amostras positivas para o vírus da influenza B; 60 amostras positivas para o SARS-CoV-2 e 60 amostras negativas para qualquer um dos vírus respiratórios em análise. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as amostras positivas e negativas analisadas.

## 12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema pentaplex de RT-qPCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp e N), ARN virais do Influenza A e/ou B (genes M1 e NS2, respetivamente) e do ARN humano (gene RNase P, RP). Amplificações positivas foram observadas para os genes alvo, controlos positivos e controlos internos através dos canais Texas Red, FAM e JOE de acordo com os conjuntos de oligonucleótidos (*primers* e 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

	Dispositivo de diagnóstico médico <i>in vitro</i>		Consultar instruções para utilização
	Número de catálogo		Fabricante
	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura		Suficiente para
	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (mistura primer/sonda)
	Controlo negativo		

## 16. Declaração de Conformidade

**Nome do produto:** COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

**Número de catálogo:** MD04851

**Utilização:** Detecção qualitativa de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B

**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>

