

Polaris[®] Taq Polymerase 50 U/ μ L, IVD

REF MD06691, 0,35 mL (5 000 R)
MD06692, 3,5 mL (50 000 R)

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro apenas para uso profissional



PT

Instruções de Utilização

MD0669_IM_pt

VERSÃO 2401, Maio 2024



NZYtech, Lda.

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



O que é a marca Polaris®?

A NZYtech, líder global no desenvolvimento de enzimas e kits para diagnóstico *in vitro* (IVD), apresenta a gama de produtos Polaris® - uma série inovadora de enzimas, misturas de enzimas, kits de extração de ácidos nucleicos e reagentes para diagnóstico molecular. Os produtos Polaris® destacam-se pela sua pureza, estabilidade, eficácia, fiabilidade e conformidade regulamentar. Estas características são incorporadas em embalagens funcionais, desenhadas para aplicações laboratoriais exigentes. A marca Polaris® destaca a liderança da NZYtech em inovação, dando assim resposta à elevada exigência do diagnóstico molecular, com um enfoque na qualidade, estabilidade e coerência científica dos seus produtos. Estes cumprem com os mais exigentes padrões internacionais de qualidade, incluindo as normas ISO 13485 e ISO 9001, assegurando assim a conformidade dos reagentes Polaris® para aplicações IVD. Os reagentes da gama Polaris® suplantam os requisitos do Regulamento Europeu sobre Dispositivos de Diagnóstico *in vitro* (IVDR), refletindo um compromisso com a gestão de qualidade e a excelência em todas as fases do seu desenvolvimento, incluindo produção, controlo e validação. Através dos mais rigorosos e modernos procedimentos de fabrico, medidas de controlo precisas e validações rigorosas, a marca Polaris® estabelece-se como o novo padrão para testes diagnósticos. As instalações pioneiras da NZYtech foram construídas para produzir estas ferramentas de diagnóstico de alta precisão, garantindo um desempenho de excelência. A equipa NZYtech está, igualmente, sempre disponível para fornecer apoio integral aos nossos clientes e parceiros, facilitando a conformidade com o IVDR e assegurando uma integração fluida da testagem molecular nas mais variadas aplicações, sempre que solicitado. A NZYtech compromete-se em promover o avanço do diagnóstico molecular, expandindo o acesso aos resultados clínicos, facilitando diagnósticos rápidos e precisos e impulsionando a investigação científica.

Índice

1. Introdução.....	3
2. Validação e aplicação	3
3. Utilização prevista.....	3
4. Princípio do ensaio.....	3
5. Composição do reagente	4
6. Armazenamento, conservação e manuseamento	4
7. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos.....	4
8. Colheita e preparação de amostra.....	5
9. Advertência e precauções.....	5
9.1. Informação de segurança.....	5
9.2. Manuseamento e Procedimentos adequados.....	5
10. Procedimentos de testagem	6
10.1. Preparação da reação qPCR.....	6
10.2. Preparação da reação RT-qPCR.....	7
11. Avaliação do desempenho do teste.....	7
11.1. Resultados esperados	8
11.2. Pureza	8
11.3. Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD).....	8
11.4. Substâncias Interferentes	9
11.5. Precisão.....	9
12. Avaliação clínica	9
13. Controlo de Qualidade e Estabilidade do Produto	10
14. Apoio Técnico.....	10
15. Marcas registadas e direitos de propriedade	10
16. Tabela de símbolos	11
17. Declaração de conformidade	11
18. Referências.....	12

1. Introdução

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, concebida para aplicações de diagnóstico *in vitro* (IVD), é uma ferramenta de diagnóstico otimizada e altamente robusta, desenvolvida para cumprir os requisitos rigorosos do diagnóstico médico atual. Este reagente tem uma elevada concentração de Taq Polymerase (50 U/μL), o que permite a produção de soluções concentradas de master mix para PCR em grandes quantidades. Apesar do alto teor em glicerol (50%), que melhora a estabilidade e protege contra condições de congelamento, a alta concentração de Taq Polymerase garante uma incorporação mínima de glicerol nas master mixes, mantendo a compatibilidade com os processos de liofilização. Deste processo resulta uma enzima versátil que mantém um desempenho reprodutível em aplicações de diagnóstico, mesmo quando usada em volumes reduzidos. Atendendo a um amplo espectro de requisitos de PCR, a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD é especialmente adequada para aplicações PCR multiplex e outros PCR exigentes que conduzem a uma amplificação rápida sem comprometer a especificidade ou sensibilidade do processo.

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é produzida de acordo com um sistema de gestão da qualidade rigoroso, seguindo os padrões globais para dispositivos médicos IVD, incluindo a garantia de qualidade, rastreabilidade completa desde a produção e fiabilidade nas suas aplicações de diagnóstico. A eficácia da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é especialmente relevante no campo do diagnóstico molecular, como demonstrado nesta IFU através da sua validação rigorosa em kits IVD na deteção de uma ampla gama de patógenos virais e bacterianos, incluindo SARS-CoV-2, Vírus Respiratório Sincicial (RSV, subtipos A e B), Influenza (tipos A e B), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e 14 tipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV) em amostras clínicas humanas. O processo de validação da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, em diversas matrizes clínicas, estabelece-a como um reagente IVD de Classe A validado para o diagnóstico molecular.

2. Validação e aplicação

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi submetida a estudos de validação extensos para garantir o seu desempenho e conformidade com os requisitos de IVD Classe A. As características mais importantes deste produto são:

- **Sensibilidade e Especificidade:** A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, demonstra uma sensibilidade e especificidade excecionais na deteção de ácidos nucleicos alvo. Foi validada para detetar níveis baixos de material genético, enquanto a especificidade da enzima garante uma diferenciação precisa entre sequências genéticas estreitamente relacionadas, minimizando o risco de reatividade cruzada e resultados falsos positivos.
- **Precisão e Reprodutibilidade:** A precisão é fundamental nos testes de diagnóstico, e a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, fornece resultados com elevada precisão. Estudos de validação confirmam a capacidade da enzima de produzir consistentemente resultados precisos e confiáveis com diferentes operadores, instrumentos e tipos de amostras. Testes de reprodutibilidade mostraram que a enzima atua de forma consistente em múltiplas corridas, garantindo a fiabilidade nos testes de diagnóstico. Para mais detalhes, consulte a **Secção 11**.
- **Estabilidade e Robustez:** Esta enzima exibe uma estabilidade excecional, mantendo as suas características de desempenho sob uma variedade de condições de armazenamento e de ciclos de uso. Esta estabilidade suporta o uso prolongado em ambientes laboratoriais sem comprometer o desempenho. Além disso, a sua formulação robusta é capaz de lidar com amplificações complexas e múltiplas, detetando eficazmente uma ampla gama de alvos genéticos, mesmo em matrizes de amostras desafiantes. Isto torna-a particularmente eficaz em aplicações que requerem a amplificação de múltiplos alvos a partir de material genético semi-puro.

O formato de alta concentração da enzima e a compatibilidade com processos de liofilização aumentam ainda mais a sua utilidade na criação de ensaios de diagnóstico robustos, sensíveis e específicos. Esta flexibilidade, quando combinada com a capacidade de personalizar ensaios com componentes separados adicionais, estabelece a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, como a enzima de eleição para laboratórios de diagnóstico molecular e fabricantes de kits de PCR compatível com o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico molecular. A validação extensiva e a versatilidade desta enzima sublinham a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, como um reagente de diagnóstico Classe A robusto, capaz de responder a variadas exigências do diagnóstico e de fornecer resultados confiáveis em diferentes matrizes biológicas e condições de teste.

3. Utilização prevista

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é um reagente IVD de Classe A validado, destinado ao uso profissional na deteção por PCR em tempo real de ácidos nucleicos virais, bacterianos e fúngicos em amostras de zaragatoa recolhidas de pacientes. Um resultado positivo indica a presença de ácidos nucleicos patogénicos, mas é necessário correlacionar clinicamente com a história do paciente e outras informações de diagnóstico para determinar o estado de infeção do mesmo. Resultados negativos não excluem a infeção patogénica e não devem ser usados como a única base para decisões clínicas. Assim, os resultados obtidos com esta enzima devem ser interpretados em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais. Este reagente IVD é destinado unicamente ao uso por profissionais de laboratório de diagnóstico *in vitro*. As características de desempenho deste produto foram estabelecidas com base na deteção dos vírus respiratórios SARS-CoV-2, Influenza A e B e RSV, e de outros dois patogénicos humanos altamente relevantes, MRSA e HPV. Os laboratórios devem validar o desempenho para outros alvos de acordo com as regulamentações e diretrizes locais.

4. Princípio do ensaio

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, utiliza os princípios estabelecidos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) combinada com a especificidade do sistema de deteção baseado em sondas TaqMan. O teste segue um fluxo de trabalho específico:

1. **Amplificação/Extensão:** A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, desempenha um papel crucial na extensão dos primers para sintetizar uma nova cadeia de DNA complementar ao molde de cDNA (ou DNA, em aplicações de qPCR).
2. **Cisão da Sonda TaqMan:** A enzima foi desenvolvida para permitir a degradação das sondas TaqMan. As sondas TaqMan são sequências de oligonucleotídeos marcadas com um corante repórter fluorescente numa extremidade e um corante quencher na extremidade oposta, projetadas para hibridizar especificamente com a sequência alvo entre os primers PCR forward e reverse. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade exonuclease 5' para 3' da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, cliva a sonda, separando os corantes

repórter e quencher. Esta separação resulta na geração de um sinal fluorescente pelo corante repórter, que é proporcional à quantidade de ácido nucleico alvo presente na amostra.

- Deteção em Tempo Real:** O ensaio deve ser realizado em equipamentos de PCR em tempo real capazes de detetar e medir a intensidade da fluorescência emitida à medida que as sondas são degradadas a cada ciclo. Esta fluorescência correlaciona-se diretamente com a quantidade de ácido nucleico alvo amplificado.

A integração da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, em fluxos de trabalho de qPCR e RT-qPCR oferece uma solução robusta e eficiente para a deteção de ácidos nucleicos numa ampla gama de aplicações de diagnóstico. A sua formulação, otimizada para um elevado desempenho e compatibilidade com o sistema baseado em sondas TaqMan, simplifica a configuração do ensaio, minimiza o risco de contaminação e garante resultados consistentes. Quando utilizada em conjunto com outros reagentes essenciais (consulte a **Secção 7** para detalhes sobre os materiais necessários e especificações do instrumento), a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, oferece uma grande flexibilidade e fiabilidade para o diagnóstico molecular, tornando-se uma ferramenta essencial para detetar vários patogénicos e marcadores genéticos em amostras clínicas.

5. Composição do reagente

A tabela abaixo detalha os componentes principais fornecidos com a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, em diferentes apresentações:

COMPONENTE		APRESENTAÇÃO	VOLUME	NÚMERO DE TUBOS/FRASCOS	NÚMERO DE REAÇÕES DE 20 μL
Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL	Taq 50 U/μL	MD06691	0.35 mL	1	5 000
		MD06692	3.5 mL	1	50 000

Embora a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, desempenhe um papel crucial no ensaio, outros componentes são vitais para a deteção otimizada das sequências de ácidos nucleicos alvo. É de notar que certos componentes necessários para uma reação completa não são fornecidos juntamente com a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD. Informações detalhadas sobre esses componentes adicionais são fornecidas na **Secção 7**.

6. Armazenamento, conservação e manuseamento

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é enviada em diferentes condições, incluindo temperatura ambiente, gelo ou gelo seco, garantindo a qualidade deste reagente durante o transporte. Após a receção, é necessário respeitar as seguintes condições de armazenamento e manuseamento para manter a integridade e o desempenho do reagente:

- Armazenamento Imediato: Após a chegada, transferir prontamente o reagente para um ambiente de armazenamento entre -85 °C e -15 °C. Esta faixa de temperatura é crucial para preservar a atividade e estabilidade do reagente.
- Minimização da Degradação: Para minimizar a degradação, garantir que imediatamente após o uso, o reagente seja repostado nas condições de armazenamento especificadas. Limitar a exposição à temperatura ambiente é essencial para manter a estabilidade do reagente.
- Ciclos de Congelamento-Descongelamento: O produto foi desenvolvido para suportar um mínimo de 10 ciclos de congelamento-descongelamento sem redução significativa do seu desempenho.
- Integridade da Embalagem: Inspeccionar a embalagem ao recebê-la. Se a embalagem estiver danificada, contactar imediatamente a NZYtech para assistência. A comunicação imediata de qualquer problema é essencial para garantir a receção de um produto nas melhores condições.
- Data de Validade: A utilização do produto de acordo com a data de validade indicada na embalagem é crucial. O não cumprimento desta indicação pode comprometer a fiabilidade dos resultados do teste. O descarte do produto deve ser feito de acordo com os procedimentos delineados na **Secção 9.2**.

O seguimento das instruções acima referidas ajudará a garantir que a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, permaneça eficaz para o uso pretendido, fornecendo resultados confiáveis e precisos nas suas aplicações de diagnóstico.

7. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos

Para utilizar eficazmente a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, os utilizadores devem obter certos materiais essenciais e reagentes que não estão incluídos no produto. Estes componentes adicionais são necessários para garantir o desempenho ótimo e a fiabilidade dos ensaios de diagnóstico. Os seguintes reagentes não fornecidos são necessários para implementar um teste de diagnóstico com a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD:

COMPONENTES/REAGENTES DE TESTE NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS	SKU
Polaris® Glycerol-free Taq Antibody 10 mg/mL, IVD	MD0673
Polaris® qPCR Buffer 2.5x, IVD	MD0686
Polaris® RT-qPCR Buffer 2.5x, IVD	MD0687
Polaris® dNTP mix 25 mM, IVD	MD0690
DEPC-treated water	--
Polaris® Reverse Transcriptase 285 U/μL, IVD	MD0777
Polaris® RNase Inhibitor 80 U/μL, IVD	MD0778
Primers e Probes de kits NZYtech Real-Time PCR CE-IVD*	**

* O catálogo NZYtech pode ser consultado em www.nzytech.com. Verifique as referências dos kits na **secção 18**.

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi validada para uso como primers e probes incluídos nos seguintes kits IVD da NZYtech: High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (número de catálogo da NZYtech: MD0492), MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (número de catálogo da NZYtech: MD0493), COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD (número de catálogo da NZYtech: MD0490) e SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD (número de catálogo da NZYtech: MD0491). Os utilizadores que pretendam empregar diferentes primers e sondas em conjunto com este produto Polaris® devem realizar um processo de validação rigoroso para assegurar a sua compatibilidade e eficácia. O uso de primers e sondas alternativos sem uma validação adequada pode afetar o desempenho e a fiabilidade do ensaio.

Outros materiais e equipamentos essenciais necessários, mas não fornecidos, incluem:

- Equipamento de PCR em Tempo Real: Certifique-se de que o equipamento pode detetar corantes fluorescentes FAM™, HEX™/VIC™/JOE™, Texas Red®/JUN™ e Cy5™ (com comprimentos de onda de emissão de 520, 556, 603 e 670 nm, respetivamente). Por favor, consulte a Secção 10 para uma lista de modelos de equipamentos validados.
- Equipamento de Extração de DNA/RNA: Aparelhos e consumíveis necessários para a extração de DNA/RNA patogénico de diferentes amostras.
- Plásticos de PCR livres de RNase e DNase: Incluindo tubos de PCR, tiras, tampas, placas de 96 poços e filmes adesivos.
- Pipetas e Pontas com Filtro: Certifique-se de que são livres de RNase e DNase.
- Luvas Descartáveis: Para prevenir contaminação e garantir a integridade das amostras.
- Vortex e Centrífuga: Essenciais para misturar e preparar as amostras.

Ao seguir estas recomendações e garantir o uso de materiais e reagentes validados, os utilizadores maximizam o potencial de diagnóstico da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD. O cumprimento de requisitos IVD garantidos pela utilização deste reagente é apenas assegurado com o seguimento das regras e diretrizes apresentadas nesta IFU.

8. Colheita e preparação de amostra

A otimização de resultados em testes de diagnóstico baseados em PCR depende da adesão rigorosa às melhores práticas na recolha, transporte, armazenamento e processamento de amostras biológicas. O manuseamento das amostras, desde a recolha até à análise, influencia diretamente a integridade do processo de teste e a precisão dos resultados. Siga estas diretrizes para garantir a mais alta qualidade das amostras para testes de PCR:

- Teste Imediato: É essencial processar e testar as amostras o mais rapidamente possível após a colheita. A precisão dos resultados do teste pode ser afetada significativamente pelo atraso na realização do teste em relação ao momento da colheita, uma vez que pode causar a degradação do DNA/RNA.
- Transporte e Armazenamento: As amostras devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas para preservar a integridade dos ácidos nucleicos. O cumprimento das regulamentações locais de biossegurança e transporte é obrigatório para garantir o manuseamento seguro de materiais potencialmente infecciosos.
- Extração de DNA, RNA ou Ácidos Nucleicos Totais: A extração de DNA, RNA ou de ácidos nucleicos totais deve ser realizada utilizando um dispositivo/kit com marcação CE-IVD. Isto garante que o processo de extração cumpre os rigorosos padrões de qualidade e desempenho necessários para a realização de testes de diagnóstico precisos.
- Avaliação da Qualidade da Amostra: Antes de prosseguir com o qPCR/RT-qPCR, verifique a adequação das amostras de DNA/RNA. Os fatores chave a avaliar incluem:
 - Pureza: Avalie a pureza dos ácidos nucleicos através da medição da absorvância a 260/280 e 260/230 nm. Valores entre 1,8 e 2,1 geralmente indicam um bom grau de pureza.
 - Concentração: Utilize a espectrofotometria ou um método equivalente para determinar a concentração dos ácidos nucleicos.
 - Integridade: Avalie a integridade dos ácidos nucleicos através de eletroforese em gel de agarose ou de métodos equivalentes. Amostras degradadas podem gerar resultados pouco confiáveis.

O seguimento metódico destas indicações de colheita e preparação de amostras, pode aumentar significativamente a fiabilidade e precisão do ensaio. O manuseamento adequado desde a colheita até à análise é crítico para alcançar os melhores resultados possíveis em diagnóstico molecular.

9. Advertência e precauções

A conformidade com boas práticas laboratoriais e seguimento rigoroso dos procedimentos e indicações fornecidos são imperativos para o desempenho preciso do teste. Qualquer desvio dos mesmos pode levar à falha do ensaio ou a resultados erróneos.

9.1. Informação de segurança

Por favor, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível no site da NZYtech (www.nzytech.com) antes de utilizar este reagente. Apenas pessoal qualificado com conhecimento em procedimentos técnicos e de segurança relevantes deve realizar testes de diagnóstico molecular através de PCR, e estes devem ser conduzidos em laboratórios adequadamente equipados. Siga todas as indicações de biossegurança laboratorial internacionais e nacionais aplicáveis.

9.2. Manuseamento e Procedimentos adequados

- Uso profissional: Este reagente é destinado ao uso por profissionais para diagnóstico *in vitro*.
- Data de validade: Não utilize este reagente após a data de validade e certifique-se de que o selo do produto está intacto antes de usar.
- Requisitos para procedimentos livres de DNase & RNase: Utilize plásticos descartáveis e pipetas livres de DNase & RNase, utilizando pontas com filtro para prevenir contaminação.
- Áreas de trabalho: Mantenha áreas de trabalho separadas para a preparação de amostras, set-up da reação e amplificação para prevenir contaminação.

- Limpeza Pós-Teste: Após a amplificação, limpe as superfícies e equipamentos usando um removedor de DNA/RNA (por exemplo, DNA & RNA Cleaner, NZYtech, número de catálogo: MB462), e manuseie as placas com cuidado, descartando-as em recipientes para material biológico perigoso imediatamente após o uso.
- Manuseamento de Amostras Biológicas: Trate todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas e siga as precauções de biossegurança.
- Gestão de Resíduos: Cumpra com as regulamentações nacionais e regionais para o descarte de resíduos e misturas de químicos, geralmente considerados como resíduos perigosos.
- Interpretação dos Resultados: Um profissional de saúde deve interpretar todos os resultados considerando o histórico médico e os sintomas clínicos do paciente.
- Práticas Laboratoriais: Garanta a conformidade com boas práticas laboratoriais. Use sempre vestuário de proteção adequado, luvas descartáveis sem pó, óculos de proteção e máscara. Não coma, beba ou fume na área de trabalho.

10. Procedimentos de testagem

Para garantir a execução bem-sucedida de um ensaio de PCR usando a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, siga rigorosamente o protocolo de qPCR (**Secção 10.1**) ou de RT-qPCR (**Secção 10.2**) descritos abaixo. Familiarize-se com os reagentes adicionais necessários, conforme listados na **Secção 7**. A estrita conformidade com o protocolo e o manuseamento preciso de todos os componentes são essenciais para manter a integridade do reagente e evitar artefactos de PCR que possam afetar a sensibilidade de detecção.

- Antes de iniciar o ensaio, agite suavemente os tubos para garantir a homogeneização da solução. Mantenha os tubos em gelo durante toda a fase de preparação para preservar a estabilidade do reagente.
- Prepare todos os componentes da reação em gelo ou equivalente para minimizar flutuações de temperatura que possam impactar a eficácia do reagente.
- Proceda imediatamente à etapa de qPCR após a preparação da placa, para prevenir artefactos de PCR e garantir uma maior sensibilidade. Estes podem ser causados por atrasos neste processo ou exposição da mistura de reação à temperatura ambiente.
- Utilize técnicas rigorosas de pipetagem para prevenir contaminação cruzada. Ao preparar a placa, é particularmente importante adicionar o Controlo Positivo por último para evitar contaminação de outras amostras.

10.1. Preparação da reação qPCR

1. Prepare a mistura qPCR juntando a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, com os restantes reagentes necessários para um diagnóstico. Calcule o volume necessário de mistura de enzima para o teste. Use a tabela seguinte, onde *n* indica o número total de reações:

COMPONENTE	VOLUME 1 TESTE (μL)	VOLUME <i>n</i> TESTES * (μL)
Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD	0,07	<i>n</i> x 0,07
Polaris® Glycerol-free Taq Antibody 10 mg/mL, IVD	0,1	<i>n</i> x 0,1
Polaris® qPCR Buffer 2.5x, IVD	8	<i>n</i> x 8
Polaris® dNTP mix 25 mM, IVD	0,24	<i>n</i> x 0,24
DEPC-treated water	1,59	<i>n</i> x 1,59
Primer & Probe Mix 10x de um Kit CE-IVD NZYtech**	2	<i>n</i> x 2
VOLUME FINAL	12	<i>n</i> x 12

*Garanta que inclui duas reações extra para o Controlo Negativo (NTC) e o Controlo Positivo no total de reações. Para compensar variações na pipetagem, recomendamos incluir um extra de 5% nos seus cálculos de volume.

** Use primers e probes de kits especificados na **Secção 7**.

2. Misture e centrifugue.

3. Pipete 12 μL da mistura de qPCR preparada anteriormente em poços individuais, de acordo com a configuração da sua placa de PCR em tempo real.

4. Para o **Controlo Negativo**, adicione 8 μL do NTC, em vez de amostra de DNA, no poço do controlo negativo. O volume final deve ser de 20 μL.

5. Para as **Amostras Clínicas**, adicione 8 μL de cada amostra de DNA nos poços de amostra, de acordo com a configuração da sua placa experimental. O volume final em cada poço deve ser de 20 μL.

6. Para o **Controlo Positivo**, adicione 8 μL do Controlo POS de um dos kits CE-IVD da NZYtech referidos na **Secção 7**, em vez de amostra de DNA, nos poços de controlo positivo. O volume final deve ser de 20 μL.

7. Sele a placa firmemente com tampas apropriadas ou filme adesivo ótico para prevenir evaporação e contaminação.

8. Coloque a placa de reação selada no equipamento de PCR em tempo real e prossiga com a execução de qPCR de acordo com as instruções específicas:

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	ETAPA
1	95 °C	3 min	Ativação da Polimerase
40	95 °C	5 s	Desnaturação
	60 °C	30 s	Emparelhamento/Extensão*

*Os dados fluorogénicos devem ser recolhidos durante esta etapa através dos canais descritos no kit de PCR em Tempo Real CE-IVD selecionado.

Este protocolo foi utilizado para validar ensaios de diagnóstico em vários equipamentos de PCR em Tempo Real, incluindo Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q e Bio-Rad® CFX96™. No entanto, estas condições podem ser adaptadas e validadas para adequar-se a protocolos específicos de diferentes equipamentos.

10.2. Preparação da reação RT-qPCR

1. Prepare a mistura de RT-qPCR combinando a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, com os restantes reagentes necessários para um diagnóstico. Calcule o volume necessário de mistura de enzima para o teste. Use a tabela seguinte, onde *n* indica o número total de reações:

COMPONENTE	VOLUME 1 TESTE (μL)	VOLUME <i>n</i> TESTES (μL) *
Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD	0,07	<i>n</i> x 0,07
Polaris® Glycerol-free Taq Antibody 10 mg/mL, IVD	0,1	<i>n</i> x 0,1
Polaris® RT-qPCR Buffer 2.5x, IVD	8	<i>n</i> x 8
Polaris® dNTP mix 25 mM, IVD	0,24	<i>n</i> x 0,24
Polaris® Reverse Transcriptase 285 U/μL, IVD	0,22	<i>n</i> x 0,22
Polaris® RNase Inhibitor 80 U/μL, IVD	0,50	<i>n</i> x 0,50
DEPC-treated water	0,87	<i>n</i> x 0,87
Primer & Probe Mix 10x de um Kit de um passo CE-IVD NZYtech**	2	<i>n</i> x 2
VOLUME FINAL	12	<i>n</i> x 12

*Garanta que inclui duas reações extra para o Controlo Negativo (NTC) e o Controlo Positivo no total de reações. Para compensar variações na pipetagem, recomendamos incluir um extra de 5% nos seus cálculos de volume.

** Use primers e probes de kits especificados na **Secção 7**.

2. Misture e centrifugue.

3. Pipete 12 μL da mistura de one-step RT-qPCR preparada anteriormente em poços individuais, de acordo com a configuração da sua placa de PCR em tempo real.

4. Para o **Controlo Negativo**, adicione 8 μL do NTC do Kit PCR em tempo real para SARS-CoV-2 num passo, genes alvo RdRp e N, IVD (NZYtech, número de catálogo: MD0483), em vez de amostra de RNA, no poço do controlo negativo. O volume final deve ser de 20 μL.

5. Para as **Amostras Clínicas**, adicione 8 μL de cada amostra de RNA nos poços de amostra, de acordo com a configuração da sua placa experimental. O volume final em cada poço deve ser de 20 μL.

6. Para o **Controlo Positivo**, adicione 8 μL do Controlo POS de um dos kits de qPCR CE-IVD da NZYtech referidos na Secção 7, em vez da amostra de RNA, nos poços do controlo positivo. O volume final deverá ser de 20 μL.

7. Sele a placa firmemente com tampas apropriadas ou filme adesivo ótico para prevenir evaporação e contaminação.

8. Coloque a placa de reação selada no instrumento de PCR em tempo real e prossiga com a execução de RT-qPCR de acordo com as instruções específicas:

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	ETAPA
1	50 °C	10 min	<i>Transcrição Reversa</i>
1	95 °C	2 min	<i>Ativação da Polimerase</i>
40	95 °C	5 s	<i>Desnaturação</i>
	60 °C	30 s	<i>Emparelhamento/Extensão*</i>

*Os dados fluorogénicos devem ser recolhidos durante esta etapa através dos canais descritos no kit de PCR em Tempo Real CE-IVD selecionado.

Este protocolo foi utilizado para validar ensaios diagnósticos em vários equipamentos de PCR em tempo real, incluindo Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q e Bio-Rad® CFX96™. No entanto, estas condições podem ser adaptadas e validadas para se adequar a protocolos específicos de diferentes equipamentos.

11. Avaliação do desempenho do teste

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, passou por um rigoroso processo de validação seguindo as diretrizes regulamentares IVD para estabelecer o seu desempenho como um produto IVD Classe A. Esta secção detalha os ensaios realizados e os dados obtidos durante a avaliação de desempenho, destacando a eficácia, fiabilidade e conformidade do produto. Esta avaliação utilizou a mistura de primer/sonda juntamente com os controlos positivos e negativos dos seguintes quatro kits CE-IVD: High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (MD0492), MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (MD0493), COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD (MD0490) e SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD (MD0491).

11.1. Resultados esperados

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi utilizada para testar amostras clínicas usando o kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD (MD0490). A Figura 1 apresenta gráficos típicos de amplificação para várias amostras clínicas testadas com a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD: amostras clínicas negativas (Figura 1A), amostras de pacientes infetados com SARS-CoV-2 (Figura 1B), amostras de pacientes co-infetados com SARS-CoV-2 e Influenza A/B (Figura 1C), e amostras de pacientes co-infetados com SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV (Figura 1D).

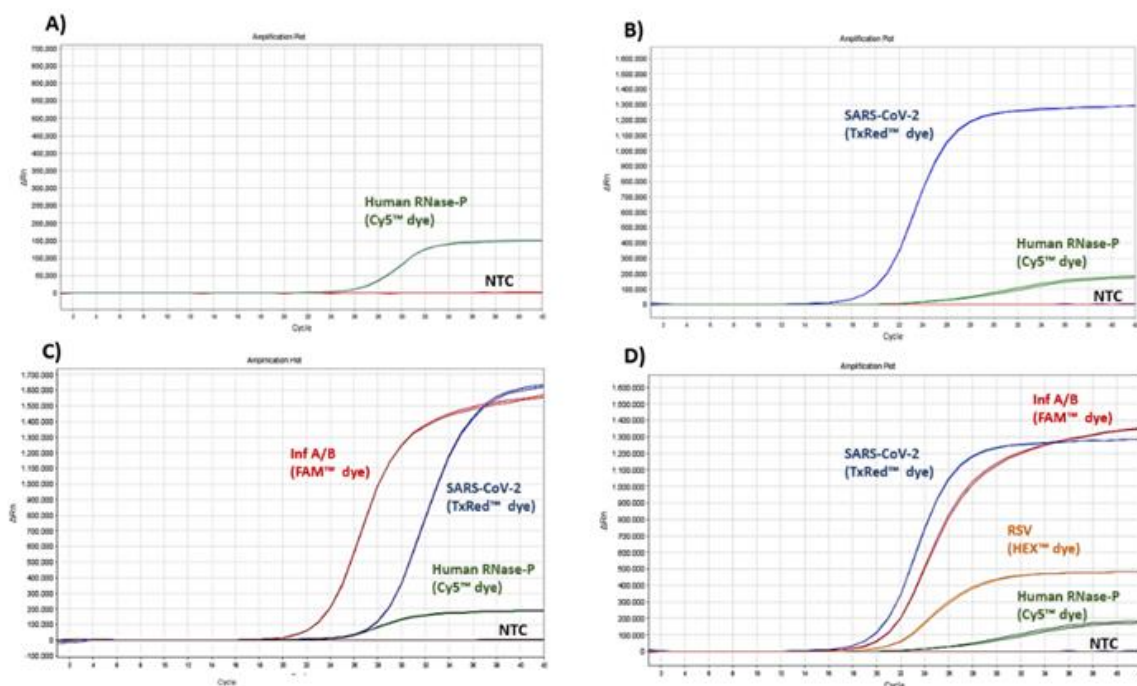


Figura 1. Utilizando a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, para detetar alvos de SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV e RNase-P humano a partir de amostras clínicas negativas (A), amostras clínicas infetadas com SARS-CoV-2 (B), co-infecção com SARS-CoV-2 e Influenza A/B (C) e co-infecção com SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV (D). Curva azul, deteção dos alvos de RNA viral do SARS-CoV-2 através do canal Texas Red/JUN. Curva vermelha, deteção dos alvos de Influenza A e/ou Influenza B através do canal FAM. Curva laranja, deteção do gene L do RSV através do canal VIC/HEX. Curva verde, deteção do gene RNase P humano através do canal Cy5.

11.2. Pureza

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é submetida a rigorosas avaliações de pureza para garantir um desempenho confiável em aplicações avançadas de diagnóstico molecular. Para manter os mais altos padrões de qualidade e desempenho, os principais contaminantes são rigorosamente testados em todos os lotes de produção. A tabela seguinte apresenta os resultados que demonstram a conformidade da enzima com critérios rigorosos de pureza:

ENSAIO DE PUREZA	RESULTADOS
SDS-PAGE (Pureza/integridade da proteína)	>95% Puro
DNases	Não detetado
RNases	Não detetado
DNA de <i>E. coli</i>	≤1 Cópias de Genoma/Reação
DNA Bacteriano 16S	≤1 Cópias de Genoma/Reação
DNA Humano 18S	≤0.1 Cópias de Genoma/Reação

Estas avaliações de pureza validam a adequação da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, para aplicações de diagnóstico críticas, uma vez que garantem o cumprimento dos requisitos rigorosos para o diagnóstico molecular preciso e eficiente. Ao testar rigorosamente a presença de contaminantes como DNases, RNases e DNA genómico indesejado, a NZYtech oferece um produto com um desempenho confiável e especificidade na síntese e amplificação de ácidos nucleicos.

11.3. Sensibilidade Analítica – Limite de Detecção (LoD)

A sensibilidade analítica, ou a menor concentração de analito detetável com 95% de confiança pela Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi avaliada em várias condições. O estabelecimento dos limites de detecção (LoDs) envolveu uma análise detalhada, incluindo a adição de quantidades conhecidas de ácidos nucleicos microbianos a matrizes clínicas negativas. Estes LoDs foram refinados através de múltiplas rondas de testes, garantindo precisão e repetibilidade. Ensaios iniciais realizados durante um mínimo de três dias usando pelo menos dois lotes diferentes da enzima em condições típicas de teste levaram à determinação provisória dos LoDs. Estes achados preliminares, baseados em dados obtidos de amostras contendo diferentes cópias do genoma para cada microrganismo, estabeleceram a base para verificações adicionais. Testes de confirmação, realizados por dois operadores independentes usando pelo menos três lotes da enzima em 48 réplicas, confirmaram os LoDs preliminares. Os LoDs gerais para diferentes cenários de teste foram estabelecidos da seguinte forma:

- Detecção de HPV de Alto Risco: Usando o kit da NZYtech High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (MD04921), a enzima demonstrou a sua capacidade de detetar diferentes tipos de HPV numa gama de 375 cópias/mL (HPV39) a 2500 cópias/mL (HPV33), entre 14 diferentes genótipos de HPV de alto risco.
- Detecção de MRSA: Em conjunto com o kit da NZYtech MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (MD04931), a enzima demonstrou a capacidade de detetar 150 cópias/mL de alvos de MRSA.
- Detecção de Vírus Respiratórios: A validação usando o Kit da NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD (MD04901), confirmou a capacidade da enzima de detetar SARS-CoV-2, RSV e Influenza A/B com LoDs variando entre 250 e 375 cópias/mL.
- Detecção Abrangente de SARS-CoV-2: A enzima foi validada com o kit da NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD (MD04911), para detetar especificamente RNA viral de SARS-CoV-2 com um LoD de 250 cópias/mL.

Adicionalmente, a sensibilidade analítica num contexto de co-infecção foi testada adicionando exatamente 10^3 cópias de cada vírus respiratório às curvas padrão dos restantes, usando amostras simulando co-infecção. Este ensaio foi conduzido com amostras em quadruplicado em três lotes da enzima usando o kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD (MD04901). Os resultados demonstraram que, enquanto o LoD para SARS-CoV-2 permaneceu estável, o LoD para RSV aumentou para 0,75 cópias/μL (750 cópias/mL) e para Influenza B para 1,25 cópias/μL (1250 cópias/mL). Para Influenza A, o LoD subiu para 2,5 cópias/μL (2500 cópias/mL) em condições de co-infecção.

11.4. Substâncias Interferentes

O impacto de substâncias biológicas e químicas potencialmente interferentes no desempenho da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi avaliado em testes que consistiam em amostras negativas adicionadas com diferentes agentes patogénicos a aproximadamente 3x LoD. Estas substâncias, que podem estar presentes em amostras clínicas, incluem sangue humano total, vários antimicrobianos, cremes antifúngicos, produtos de lavagem e hidratantes, entre outros. As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras descritas, com concentrações que representam os níveis mais altos esperados em amostras de pacientes respiratórios humanos, baseados em dados da literatura. Todos os testes foram realizados pelo menos em triplicado e os resultados foram comparados com dados obtidos com um teste de controlo que não continha interferentes. Nas concentrações testadas, os resultados revelaram que nenhuma das substâncias sob teste afetou a sensibilidade da detecção. No entanto, quando testada para HPV, a solução vaginal BETADINE® pode causar interferência em concentrações superiores a 0,04% v/v. Estes dados confirmam a robustez da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, quando utilizada no contexto de diferentes cenários de testes moleculares, demonstrando resistência a uma ampla gama de potenciais interferentes. Isso garante a fiabilidade e precisão dos resultados de diagnóstico mesmo na presença de substâncias que possam ser encontradas em amostras clínicas. Todos os ensaios foram realizados no equipamento Applied Biosystems™ 7500 FAST Real-time PCR (usado com o software 7500 v2.3).

11.5. Precisão

Os estudos de precisão para a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foram realizados de forma abrangente em vários ensaios de diagnóstico para avaliar a fiabilidade e reprodutibilidade da enzima na detecção de diferentes patogénios. Estes estudos, cruciais para garantir o desempenho consistente da enzima, foram realizados utilizando os seguintes kits da NZYtech: High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD; MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD; COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD; e SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD. Os ensaios tinham como foco diferentes patogénios com níveis de carga microbiana que variavam entre 3x e 30x o limite de detecção (LoD), usando DNA ou RNA extraído de amostras clínicas negativas e aos quais foram adicionadas quantidades conhecidas dos patogénios alvo. Em todos os ensaios, várias métricas foram usadas para avaliar a precisão, incluindo repetibilidade (variação dentro do mesmo teste), reprodutibilidade diária (variação entre dias diferentes), reprodutibilidade de lote para lote (variação entre diferentes lotes de kits), reprodutibilidade entre operadores (variação entre diferentes operadores) e reprodutibilidade entre instrumentos (variação entre diferentes instrumentos de qPCR). Amostras positivas foram incluídas nos ensaios e testadas sob condições de reação padrão, com a detecção de cada patogénio analisada separadamente.

Para quase todos os patogénios e condições de teste foi obtida uma detecção de 100% (todas as réplicas), não se observando variação significativa passível de impactar o resultado do diagnóstico. O coeficiente de variação (Cv) entre as diferentes métricas permaneceu baixo (<5%), sublinhando o desempenho confiável da enzima no contexto dos diferentes testes. Notavelmente, mesmo em níveis variados de carga microbiana, a capacidade da enzima de detetar os patogénios com precisão não foi comprometida, com médias de Cv permanecendo dentro dos intervalos esperados. No entanto, foram observadas variações menores em algumas métricas, como o coeficiente de variação na reprodutibilidade entre instrumentos, que variou ligeiramente entre diferentes plataformas de qPCR. Apesar dessas variações, a capacidade geral de detecção da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, permaneceu inalterada, com uma taxa de detecção consistente de 100% para a maioria das condições testadas. No geral, estes estudos de precisão destacam a excepcional fiabilidade da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, numa variedade de contextos de diagnóstico, confirmando a sua adequação para o diagnóstico molecular. Mantendo altos padrões de repetibilidade e reprodutibilidade, a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, garante a detecção precisa de patogénios, essencial para a gestão e controlo eficazes da doença.

12. Avaliação clínica

O desempenho clínico dos testes que incorporam a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi cuidadosamente avaliado através de estudos de validação em quatro ensaios de diagnóstico, incorporando uma diversa gama de amostras clínicas. Estes estudos visaram validar a eficácia da enzima na deteção de vários patogénios. No geral, os dados podem ser resumidos como:

- Deteção de HPV de Alto Risco: A avaliação envolveu 359 amostras de zangaratoas cervicais analisadas através de técnicas de PCR isotérmico e qPCR em tempo real. O estudo obteve 100% de sensibilidade clínica para HPV16 e HPV18, com taxas de especificidade de 95% e 99% respetivamente. Para outros tipos de HPV de alto risco, obtiveram-se valores de 94% de sensibilidade e 100% de especificidade. Uma comparação adicional com kits de PCR em tempo real comerciais em 220 amostras confirmou estes elevados níveis de sensibilidade e especificidade, sublinhando a fiabilidade da enzima na deteção de HPV.
- Deteção de MRSA: Na validação foram analisadas 157 amostras de zangaratoas nasais caracterizadas por cultura microbiológica de rotina. O kit MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, apresentou uma sensibilidade clínica de 98,28% e uma especificidade de 74,75%. Testes adicionais com um comparador de PCR em tempo real e métodos alternativos de extração de ácidos nucleicos confirmaram a alta sensibilidade e especificidade da enzima, com resultados indicando um impacto mínimo de diferentes técnicas de processamento de amostras.
- Deteção de Vírus Respiratórios: Num estudo abrangente envolvendo 1516 amostras de zangaratoas oro-nasofaríngeas testadas para SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV, obteve-se uma concordância de 99% em todas as amostras testadas. Análises comparativas validaram ainda mais a elevada sensibilidade clínica e especificidade da enzima, tendo-se obtido um valor de 100% em ambas as métricas.
- Deteção de SARS-CoV-2: O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD foi avaliado com 651 amostras de zangaratoas nasofaríngeas por um laboratório externo, demonstrando uma sensibilidade clínica de 97,4% e uma especificidade de 100%, confirmando assim a precisão da enzima na deteção de SARS-CoV-2.

Coletivamente, estas avaliações demonstram o desempenho excecional da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, numa gama de diagnósticos clínicos, confirmando sua adequação para detetar importantes patogénios com alta precisão. Os estudos de validação destacam a robusta utilidade clínica da enzima, oferecendo resultados fiáveis em diferentes matrizes biológicas e condições de teste. Esta avaliação clínica sublinha o papel integral da enzima no diagnóstico molecular, fornecendo uma base sólida para a sua aplicação generalizada em contextos clínicos.

13. Controlo de Qualidade e Estabilidade do Produto

A Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é metulosamente produzida através de rigorosos processos de controlo de qualidade (QC), todos conduzidos sob as diretrizes da ISO 13485:2016, para garantir um desempenho consistente e fiável, especificamente de acordo com as estipulações inerentes aos reagentes IVD de Classe A. O produto final foi submetido a uma série de validações garantindo o seu alto desempenho, nomeadamente quanto à pureza, ao desempenho funcional e à ausência de contaminantes cruciais. A estabilidade da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, foi verificada sob um espectro de condições de armazenamento, garantindo que a enzima mantenha a sua eficácia dentro do prazo de validade declarado. Esta garantia estende-se tanto às condições ótimas quanto às de stress de armazenamento, incluindo cenários de uso do produto e de transporte. Os testes funcionais, que fundamentam a verificação do desempenho do produto, são executados através de um protocolo de teste padronizado. Isto garante que a enzima opere de forma otimizada sob condições práticas de aplicação e consistentemente produza resultados reprodutíveis entre diferentes lotes. A consistência de lote para lote é metulosamente quantificada para garantir uma variabilidade mínima entre diferentes lotes de produção. A monitorização do desempenho da Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, é ainda substanciada por verificações periódicas e feedback dos utilizadores, facilitando assim um processo contínuo e dinâmico de garantia de qualidade. Como um testemunho do compromisso da NZYtech com a qualidade e responsabilidade, a Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD, mantém rastreabilidade completa durante todo o ciclo de vida do produto.






14. Apoio Técnico

Para apoio técnico, por favor contacte a nossa equipa dedicada de suporte técnico por telefone: +351 (0) 21 364 35 14 ou por e-mail: info@nzytech.com.

15. Marcas registadas e direitos de propriedade

Polaris® é uma marca registada da NZYtech, Lda. Todas as outras marcas, marcas de serviço e logótipos que aparecem neste manual são propriedade dos respetivos proprietários.

16. 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

17. Declaração de conformidade

Nome do produto: Polaris® Taq Polymerase 50 U/μL, IVD

Número de catálogo: MD06691 e MD06692

Utilização: destinado à utilização por profissionais para a deteção por PCR em tempo real de ácidos nucleicos virais, bacterianos e fúngicos em amostras de zaragatoa recolhidas de pacientes

Classificação: Classe A

Fabricante: NZYtech, Lda.

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038 Lisboa
Portugal

Nós, NZYtech, Lda., declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão e outras normativas da ISO 9001:2015 e da ISO 13485:2016, seguindo as disposições 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

Pessoa responsável pela observância da regulamentação

18. Referências

- Development of a robust TaqMan probe-based one-step multiplex RT-qPCR for simultaneous detection of SARS-CoV-2 and Influenza A/B viruses. In *BMC Microbiology* 21, Article number: 120 (2021). Available online at <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02100-4>.
- Diagnostics Editorial Office (2022): COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. In *Diagnostics* 12(6), pp. 1503. Available online at <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061503>.
- Knight, G. M.; Budd, E. L.; Whitney, L.; Thornley, S.; Al-Ghusein, H.; Planche, T. et al. (2020): Rapid MRSA detection in respiratory samples from ventilated patients with pneumonia: a prospective multicenter study. In *Clinical Infectious Diseases* 71(5), pp. 1109-1117. Available online at <https://doi.org/10.1093/cid/ciz999>.
- Martin, J.; Pham, T. D.; Bremner, P.; Fuchsberger, M.; Giuliani, F.; Winkler, M. (2021): Rapid and sensitive diagnostic detection of human respiratory syncytial virus (RSV) by RT-qPCR: a key tool for management and control of outbreaks. In *BMC Infectious Diseases* 21, Article 271. Available online at <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05935-6>.
- Reijns, M. A. M.; Thompson, L.; Acosta, J. C.; Black, H. A.; Sanchez-Luque, F. J.; Diamond, A.; Parry, D. A.; Daniels, A.; O'Shea, M.; Uggenti, C. et al. (2020): A sensitive and affordable multiplex RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 detection. In *PLOS Biology* 18(12), e3001030. Available online at <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001030>.
- Zhang, Y.; Ren, J.; Luo, M.; Li, A.; Chen, T.; Zhao, L. et al. (2021): Development of a multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of HPV, EBV, and CMV in cervical samples. In *Journal of Clinical Microbiology* 59(3), e02518-20. Available online at <https://doi.org/10.1128/JCM.02518-20>.
- 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. Available online at <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD (NZYtech catalogue number: MD0490). NZYtech, Lda. Instruction for Use available online at <https://www.nzytech.com/en/covid-19-flu-a-b-rsv-multiplex-one-step-rt-qpcr-kit-ivd/>.
- High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (NZYtech catalogue number: MD0492). NZYtech, Lda. Instruction for Use available online at <https://www.nzytech.com/en/high-risk-hpv-multiplex-real-time-pcr-kit-ivd/>.
- MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD (NZYtech catalogue number: MD0493). NZYtech, Lda. Instruction for Use available online at <https://www.nzytech.com/en/mrsa-multiplex-real-time-pcr-kit-ivd/>.
- SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD (NZYtech catalogue number: MD0491). NZYtech, Lda. Instruction for Use available online at <https://www.nzytech.com/en/sars-cov-2-one-step-rt-qpcr-kit-iii-5-targets-ivd/>.