SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Kit II de RT-qPCR SARS-CoV-2 num passo, genes RdRp e N, IVD

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

REF

MD04871, 96 reações
MD04872, 4 x 96 reações

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

CE IVD

PT

Instruções de utilização

IM-004pt

VERSÃO 15/2022, dezembro 2022

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

Índice

1. Introdução 3
2. Utilização prevista 3
3. Princípio do ensaio 3
4. Descrição do produto 4
5. Armazenamento, conservação e manuseamento 4
6. Materiais e instrumentos necessários não fornecidos 5
7. Colheita e preparação da amostra 5
8. Advertências e precauções 6
   8.1 Informação de segurança 6
   8.2 Manuseamento e procedimentos adequados 6
9. Procedimentos de testagem 7
   9.1 Preparação das reações de RT-PCR 7
   9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real 8
10. Análise de dados 9
   10.1 Critérios de validação 9
   10.2 Interpretação dos resultados 9
11. Avaliação de desempenho do teste 10
   11.1 Resultados esperados 11
   11.2 Sensibilidade analítica 11
   11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas 11
   11.4 Precisão 13
   11.5 Avaliação clínica 15
12. Controlo de qualidade 15
13. Apoio técnico 15
14. Marcas registadas e direitos de propriedade 15
15. Tabela de símbolos 16
16. Declaração de conformidade 17
17. Referências 18

1. Introdução

O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), anteriormente denominado 2019-nCoV, é o agente causador da doença Coronavírus 2019 (COVID-19) e, como os coronavírus SARS pertence ao gênero Betacoronavírus dentro da família dos coronavírus. Os coronavírus são grandes vírus de ARN de cadeia longa, positivos e encapsulados que infetam humanos, assim como um largo espetro de outras espécies animais. Pensa-se que o SARS-CoV-2 tenha origem zoótica. É altamente contagioso e transmitido principalmente por gotículas respiratórias (tosse e espirros). A deteção precoce do SARS-CoV-2 é vital para permitir o tratamento rápido de pessoas infetadas e assim reduzir o contágio e a disseminação do vírus. A sintomatologia mais frequente da COVID-19 compreende a fadiga, febre e problemas nas vias respiratórias inferiores, tais como tosse seca e dispneia. Em casos mais graves, a infeção progride para pneumonia aguda, levando ao síndrome respiratório agudo e perda de função dos órgãos vitais, ameaçando a vida do paciente. De acordo com o conhecimento atual, uma proporção significativa das infeções são assintomáticas, ou conduzem a sintomas ligeiros. A da população mais vulnerável à forma grave da doença são os adultos mais velhos (60 anos ou mais), fumadores e pessoas com doenças crônicas, como doenças cardíacas ou pulmonares, cancro, diabetes e pacientes com sistema imunológico enfraquecido. Embora atualmente as vacinas já estejam disponíveis para controlar a COVID-19, elas não previnem a infeção em populações vacinadas.

2. Utilização prevista

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD da NZYTech é um teste molecular destinado à rápida deteção qualitativa dos ácidos nucleicos do vírus SARS-CoV-2, recolhidos, por zaragatoa, na nasofaringe ou na orofaringe. Um resultado positivo indica a presença de ARN de SARS-CoV-2, mas a correlação clínica da anamnese e outras informações de diagnóstico são necessárias para determinar o estado de infeção do paciente. Um resultado negativo não impede a existência de infeção por SARS-CoV-2 e não deve ser adotado como único instrumento para a decisão de tratamento do paciente. A testagem deve ser executada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e experiência em diagnóstico *in vitro*.

3. Princípio do ensaio

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD da NZYTech fornece o conjunto de reagentes, oligonucleótidos e sondas para a deteção qualitativa do genoma do SARS-CoV-2, através de PCR em tempo real. Este kit tem como alvo, regiões específicas nos genes da ARN polimerase dependente de RNA (RdRp) e da fosfoproteína de nucleocápside (N) do genoma SARS-CoV-2 devidamente selecionadas para possibilitar uma alta sensibilidade de deteção. Os *primers* e sondas do kit SARS-CoV-2 têm 100% de homologia com >95% das >5M sequências do genoma disponíveis no banco de dados GISAID (novembro, 2021), incluindo identidade completa para as variantes Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529). Além disso, os primers e as sondas direcionadas ao SARS-CoV-2 não apresentam homologia significativa com genomas não relacionados. O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar se a extração dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas humanas foi eficiente, assim como permite detetar a presença de inibidores de PCR que possam influenciar a reação de amplificação, entre outros. Adicionalmente, o kit inclui dois controlos externos (controlo positivo fornecido em baixa

concentração e controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as três sequências alvo detetadas pelo kit (genes SARS-CoV-2 RdRp e N e gene RP humano). A seleção natural a que o SARS-CoV-2 está sujeito implica que novas sequências do seu genoma viral possam vir a ser disponibilizadas após a criação deste kit, o que reflete as estratégias de adaptação adquiridas pelo SARS-CoV-2. Desta forma, a NZYTech revisita periodicamente as sequências dos genes alvo do SARS-CoV-2 e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit.
O RT-qPCR permanece como o método mais fiável e sensível para realizar uma deteção precisa do ARN do SARS-CoV-2. O RNA viral isolado e purificado de amostras infetadas é retro-transcrito para cDNA e posteriormente amplificado numa única reação usando dois conjuntos de primers/ sondas altamente específicos que exploram o denominado princípio TaqMan®. Durante este processo, as sondas hibridizam especificamente para duas regiões do genoma SARS-CoV-2, a saber, RdRp (dentro do gene da poliproteína Orf1ab) e genes N. Um conjunto de primers/sonda adicional atua como um controle interno endógeno para detetar ácidos nucleicos do gene RP humano. Para permitir a identificação da amplificação dos três alvos específicos em uma única reação, os genes SARS-CoV-2 RdRp e N e as sondas específicas de RP humanas são marcados de forma diferente, com os repórteres HEX ™, FAM ™ e Cy5 ™, respetivamente. Assim, este painel contém um ensaio duplex para o ARN viral detetado em dois canais ópticos distintos, HEX (alternativamente VIC™ ou JOE™) e FAM™. Além disso, os primers e as sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que a amplificação do mRNA humano, mesmo quando presente em concentrações muito altas, não limite a eficiência dos conjuntos de primers/sondas SARS-CoV-2.

4. Descrição do produto

O kit NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD, fornece o conjunto de reagentes e controlos para a deteção qualitativa de SARS-CoV-2 num único passo.

Composição do kit		**Volume (por tubo)**	**Número de tubos**	
			MD04871	**MD04872**
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix, ROX	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	SARS-CoV-2/RP primers/probe Mix II (HEX™, FAM™ and Cy5™ labelled)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp & N)	SARS-CoV-2(RdRp & N genes)/RP Positive Control (1 x 10^4 copies/µL)	105 µL	1	4
NTC	No-Template Control	105 µL	1	4

**Apesar da maioria dos instrumentos de PCR em tempo real que leem o corante ROX permitir que os utilizadores procedam ao ensaio e analisem dados sem ROX, a inclusão desta referência interno passiva evita a interpretação incorreta dos dados e permite detetar e diagnosticar erros.*

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD, é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados a -85°C to -15°C. Quando estão a ser utilizados, os componentes do kit devem ser colocados prontamente no congelador depois da sua utilização, de forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente. Atender ainda a:

- É aconselhável reduzir o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas com soluções de trabalho. Se apropriado, os componentes do kit podem ser aliquotados em volumes menores após descongelação.
- O componente SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N) deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N).
- Contactar imediatamente a NZYTech se, ao receber o kit, a embalagem estiver danificada.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYTech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real com deteção para os fluoróforos FAM™, HEX™/JOE™/VIC© e Cy5™ (nos comprimentos de onda de emissão de 520, 556/555/554 e 670 nm, respetivamente). Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Equipamento e consumíveis para isolar ARN viral das amostras clínicas.
- Consumíveis de plástico livres de RNase/DNase: tubos de PCR, tiras, tampas, placas de 96 poços e adesivos.
- Pipetas e pontas de filtro (livres de RNase/DNase).
- Luvas descartáveis.
- Agitador do tipo Vortex e centrífuga.

7. Colheita e preparação da amostra

Diferentes fatores, tais como, o protocolo para a colheita de amostras biológicas das vias respiratórias (zaragatoas nasofaríngeas ou orofaríngeas, ou expetoração), transporte da amostra, armazenamento e duração do tempo de processamento, são críticos para atingir os resultados ótimos. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. Além disso, devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas em concordância com os regulamentos de biossegurança. O ARN ou ácidos nucleicos totais, extraídos segundo um protocolo IVD, constituem o material inicial para o ensaio usando o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech. Por favor, assegure-se de que as amostras de ARN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Um valor de ~2 para a razão entre a absorvência a 260 e a 280 nm ($A_{260/280}$) é geralmente indicativo de ARN puro. Uma vez que o etanol é um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYTech contém um controlo interno que tem como alvo o ARN humano co purificado com o ARN viral.

8. Advertências e precauções

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

8.1 Informação de segurança

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

8.2 Manuseamento e procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes deste kit.
- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de -ADNase/ARNase em todos os procedimentos.
- As diferentes etapas relativas à preparação das amostras, preparação da reação e amplificação devem ser realizadas em diferentes zonas de trabalho.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias; deve ser aberto e processado longe das amostras e dos componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre o tubo NTC para o controlo sem ácido nucleico modelo.
- No final de cada testagem, limpar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de ADN/ARN.
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem; as placas devem ser sempre descartadas no contentor de riscos biológicos.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. O descarte deste tipo de resíduos está regulado por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, usar roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

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

9.1 Preparação das reações de RT-PCR

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

Componente	**Volume 1 teste (µL)**	**Volume de *n* testes(*) + 5% (µL)**
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)(**)	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	2	*n* x 2,1
Volume final	**12**	***n* x 12,6**

(*) Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais duas para os controlos negativo e positivo, respetivamente.
(**) Atenção, pode ser observado um precipitado no fundo do tubo da SARS-CoV-2 MMix II. Depois de descongelar, ressuspenda a mistura de reação antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de reação RT-PCR antes de pipetar.

2. Pipete 12 µL da mistura reação RT-PCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de RT-PCR.

3. Para o controlo NTC, adicione 8 µL de NTC no poço relativo ao controlo NTC, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

4. Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ARN nos poços relativos ao ensaio SARS-CoV-2(RdRp &N)/RNase P, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.

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

6. Selar a placa contendo todas a reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de RT-PCR em tempo real para deteção das sequências.

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

9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

As tabelas seguintes descrevem dois protocolos de tempo real optimizados (padrão e rápido) para a realização de testes SARS-CoV-2/RNAse P, usando o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech, nos equipamentos mencionados em baixo.

- Protocolo Padrão

Ciclos	*Temperatura*	*Tempo*	*Etapa*
1	*50 °C*	*20 min*	*Transcrição Reversa*
1	*95 °C*	*2 min*	*Ativação da Polimerase*
40	*95 °C*	*5 s*	*Desnaturação*
	60 °C	*30 s*	*Emparelhamento/Extensão**

**Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais (FAM, HEX/JOE/VIC and Cy5).*

O **protocolo padrão** do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo real: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro e Bio-Rad® CFX96™. Se pretender usar outro equipamento, o kit deve ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

- Protocolo Rápido

Ciclos	*Temperatura*	*Tempo*	*Etapa*
1	*50 °C*	*10 min*	*Transcrição Reversa*
1	*95 °C*	*1 min*	*Ativação da Polimerase*
40	*95 °C*	*5 s*	*Desnaturação*
	60 °C	*20 s*	*Emparelhamento/Extensão**

**Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais (FAM, HEX/JOE/VIC and Cy5).*

O **protocolo rápido** do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo real: Applied Biosystem® 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).

Os corantes fluorescentes usados neste kit e respetivos canais de deteção são:

Genes alvo	**Corantes Fluorescentes****	**Canal de deteção**
SARS-CoV-2, gene RdRp	HEX™	JOE, VIC ou HEX
SARS-CoV-2, gene N	FAM™	FAM
RNase P	Cy5™	Cy5

***A abertura do canal ROX permitirá o uso deste corante de referência passivo interno para evitar a interpretação incorreta dos dados e erros subsequentes*

10. Análise de dados

10.1 Critérios de validação

A deteção do RNA do SARS-CoV-2 é pesquisada pela amplificação de duas regiões do genoma viral, que são detetadas em diferentes canais de fluorescência (FAM™ e HEX™), e o controle do RP humano num terceiro canal (Cy5™). A análise dos dados deverá ser efetuada pelo software do instrumento. Considerando as diferenças de desempenho dos diferentes equipamentos de PCR em tempo real, os limites para os três sinais de fluorescência (FAM™, HEX™ e Cy5™) são determinados automaticamente pelo software com ajustes manuais, caso seja necessário. Antes de analisar os resultados das amostras, recomendamos que verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados dos controles Positivo e Negativo tiveram o desempenho esperado, de acordo com os seguintes critérios:

- **Controlo positivo**: as curvas de amplificação para HEX™ (do gene RdRp do SARS-CoV-2), FAM™ (do gene N do SARS-CoV-2) and Cy5™ (do gene RdRp do RP humano) são todas positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct<30, para os canais, FAM, HEX/JOE/VIC e Cy5. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

- **Controlo negativo (reação sem ARN):** nenhuma amplificação é detetada. Se o controlo negativo origina uma, duas ou três curvas de amplificação (HEX™, FAM™ e/ou Cy5™) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.

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

Se em algum dos controlos não foi obtido o resultado esperado, o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.
Por favor, repita o teste. Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2 Interpretação dos resultados

- **O SARS-CoV-2 é detetado** se as curvas de amplificação do HEX™ e FAM™ são sigmoides com Ct≤36, independentemente do resultado obtido para o gene RP (Cy5™).
- **O SARS-CoV-2 não é detetado** se as curvas HEX™ e FAM™ não forem positivas (Ct>36), enquanto o gene RP (Cy5™) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct<40.
- **O teste é inconclusivo para SARS-CoV-2** se as curvas de amplificação HEX™ ou FAM™ não exibirem uma forma sigmoide com um Ct≤36 enquanto o outro alvo SARS-CoV-2 for positivo, independentemente do resultado obtido para o RP (Cy5 ™) ensaio. O teste deve ser repetido com ácido nucleicos repurificados a partir da amostra.

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

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

Resultado gene RdRp SARS-CoV-2, Ct (HEX™)	**Resultado gene N SARS-CoV-2,** Ct (FAM™)	**Resultado RP** RP, Ct (Cy5™)	**Interpretação dos resultados**
+ (Ct≤36)	**+** (Ct≤36)	**+/-**	**SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO**
+ (Ct≤36)	**-** (Ct>36)	**+/-**	**SARS-CoV-2 detetado só num canal → INCONCLUSIVO**
- (Ct>36)	**+** (Ct≤36)	**+/-**	**SARS-CoV-2 detetado só num canal → INCONCLUSIVO**
- (Ct>36)	**-** (Ct36)	**+** (Ct<40)	**SARS-CoV-2 não detetado → NEGATIVE**
- (Ct>36)	**-** (Ct>36)	**-** (Ct>40)	**Teste inválido, repetir extração de ARN e teste**

Nota 1: A NZYTech recomenda repetir a análise para todas as amostras que apresentem uma curva ambígua ou atípica que não permite uma interpretação clara.
Nota 2: A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.

• Embora falsos negativos sejam mitigados pela deteção dos alvos virais em dois canais, resultados falsos negativos podem ser causados por:

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

• Resultados falsos positivos, podem ser causados por:

- Manuseamento desadequado de amostras contendo elevadas concentrações de ARN viral SARS-CoV-2 ou contaminação cruzada com o controlo positivo.
- Manuseamento incorreto do tubo SARS-CoV-2 Pos.
- Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

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

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied

Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro e Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Systems, para o protocolo padrão descrito em cima. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

11.1 Resultados esperados

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

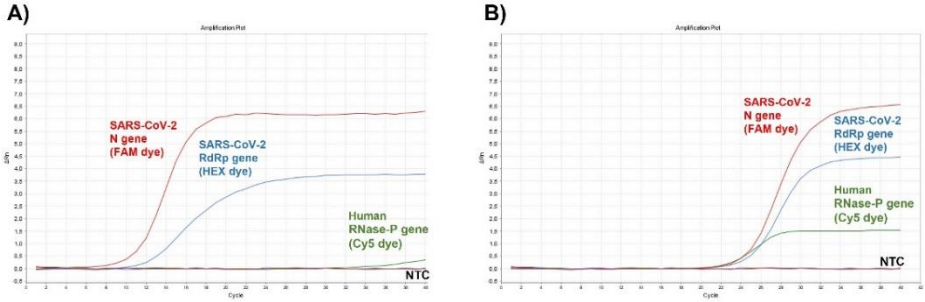

Figura 1. Deteção em simultâneo das sequências alvo SARS-CoV-2 (RdRp and N genes) e do gene humano da RNase-P a partir de amostras clínicas muito positiva (A) e positiva (B). Curva vermelha: deteção do alvo SARS-CoV-2 vRNA (gene N) através do canal FAM; **Curva azul**: deteção do alvo SARS-CoV-2 vRNA (gene RdRp) através do canal HEX (alternativas VIC / JOE); **Curva verde**: deteção do gene humano RNase P através do canal Cy5.

11.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 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 durante 3 dias, produzindo 96 réplicas para cada concentração de SARS-CoV-2 testada. A análise conjunta dos dados obtidos quando foi usado o protocolo padrão revelou que o kit deteta 0,25 cópias/µL de ARN viral SARS-CoV-2 com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Deteção (LoD), é de 0,25 cópias/µL ou de 250 cópias/mL. O LoD do kit foi reavaliado por dois operadores diferentes usando 3 lotes de kit num ensaio de 48 testes, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem. Confirmou-se o mesmo LoD para o protocolo rápido.

11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas

A inclusividade e a reatividade cruzada do SARS-CoV-2 One-step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD, foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos do SARS-CoV-2 e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes,

respetivamente. Através desta análise, concluiu-se que o ensaio permitiu detetar correspondências perfeitas com todas as estirpes do vírus SARS-CoV-2. Por outro lado, não foi demonstrada reatividade com espécies não relacionadas ao SARS-CoV-2.

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

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

Potencial Interferente	Substância ativa	Concentração final na amostra	Interferência Sim (S) ou Não (N)
Água do Mar Isotónica (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Spray para a garganta, anestésico e analgésico oral (Strepfen)	Flurbiprofeno	5% v/v	N
Solução de lavagem nasal (spray para alergias-Vibrocil)	Propionato de Fluticasona	5% v/v	N
Corticosteroides Nasais em spray (Nasomet)	Furoato de Mometasona	5% v/v	N
Corticosteroides Nasais em spray (Pulmicort)	Budesonida	5% v/v	N
Antimicrobial, sistémico (Trobex)	Trobamicina	10 µg/mL	N
Mouth analgeic, anti-inflamatory and antiseptic (Pyralvex)	Extracto de Ruibardo e Ácido Salicílico	5% v/v	N
Tópico orofaríngeo, Antifúngico e Antimicrobiano (Daktarin)	Nitrato de Miconazol	5 mg/mL	N
Elixir Bucal Antisséptico (Eludril Gé)	Gluconato de Clrohexidina, Chlorobutanol hemihidratado	5% v/v	N
Xarope Antitussico (Codipront)	Codeina, Citrato de feniltoloxamina	5% v/v	N
Sangue (humano)	-	4% v/v	N
Antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolítico (Mucolsovan)	Cloridrato de ambroxol	5% v/v	N
Solução gotas nasais (Nasarox)	Cloridrato de Oxymetazolina	10% v/v	N
Antibiótico, pomade nasal (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Saliva (human)	-	25% v/v	N
Etanol absoluto	Álcool	5% v/v	N

11.4 Precisão

A precisão do ensaio do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos SARS-CoV-2 representativos de duas cargas virais, 15 (3x LoD) e 150 (30x LoD) cópias por reação (0,75 e 7,5 cópias/µL), misturadas com ARN extraído de amostras negativas da orofaringe, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação típicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de deteção dos replicados, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados são resumidos na tabela apresentada na página seguinte.

11.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada pela análise de 12 réplicas para cada amostra (15 e 150 cópias por reação), contabilizando um total de 24 testes executados.

11.4.2. Reprodutibilidade diária

A reprodutibilidade diária foi avaliada pela análise de 48 réplicas de cada amostra (15 e 150 cópias por reação), durante 4 dias com 12 réplicas por cada concentração por dia (num total de 120 ensaios).

Precisão of kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD.

Variável testada		Gene RdRp (Cópias/Reação)		Gene N (Cópias/Reação)	
		15	**150**	**15**	**150**
Repeatabilidade					
	n	12	12	12	12
	Média Cq	31,67	28,46	31,59	28,36
	Coeficiente de Variação(%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100
Reprodutibilidade Diária	n	48	48	48	48
	Média Cq	32,26	28,89	32,30	28,89
	Coeficiente de Variação(%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% Réplicas detetadas	98	100	98	100
Reprodutibilidade Entre lotes	n	60	60	60	60
	Média Cq	32,14	28,81	32,16	28,78
	Coeficiente de Variação(%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% Réplicas detetadas	98	100	98	100
Reprodutibilidade Entre operadores	n	36	36	36	36
	Média Cq	31,59	28,37	31,71	28,47
	Coeficiente de Variação(%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100
Reprodutibilidade Instrumento	n	36	36	36	36
	Média Cq	31,74	28,53	32,31	29,21
	Coeficiente de Variação(%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada pela análise de 60 réplicas de cada amostra (15 e 150 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 36 réplicas de cada amostra (15 e 150 cópias por reação), por três operadores, num total de 12 testes por operador.

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada pela testagem de 36 réplicas por cada amostra (15 e 150 cópias por reação), em três equipamentos de PCR em tempo real diferentes (Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5and Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Systems), num total de 72 testes por equipamento e reação.

11.5 Avaliação clínica

A avaliação do desempenho do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD da NZYTech foi realizada a partir de amostras de esfregaço nasofaríngeo, utilizando o protocolo padrão, e foi levada a cabo em dois laboratórios de testagem externos. No total, 240 amostras clínicas negativas e 130 amostras clínicas positivas foram testadas. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as amostras positivas e negativas analisadas. O protocolo rápido descrito em cima foi também validado a partir de amostras positivas e negativas de esfregaço nasofaríngeo. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para todas as amostras clínicas analisadas.

12. Controlo de qualidade

Todos os componentes do Kit SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR II, genes RdRp e N, IVD, da NZYTech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema triplex de RT-PCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ARN viral SARS-CoV-2 (gene RdRp) e do ARNm humano (gene RNase P, RP). Amplificações positivas foram observadas para os genes alvo, controlo positivo e controlos internos através dos canais FAM, HEX/JOE/VIC e Cy5, de acordo com os conjuntos de oligonucleótidos/sonda.

13. Apoio técnico

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

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

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

15. Tabela de símbolos

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

16. Declaração de conformidade

Nome do produto: SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, genes RdRp e N, IVD
Número de catálogo: MD04871 e MD04872
Utilização: Deteção qualitativa de SARS-CoV-2
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.