SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD

REF

MD04911, 96 reações
MD04912, 4 x 96 reações

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

IVD

PT

Instruções de utilização

IM-007pt

VERSÃO 03/2022, setembro 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..... 5

6. Materiais e instrumentos necessários não fornecidos..... 5

7. Colheita e preparação da amostra..... 6

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 RT-qPCR..... 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 10

11. Avaliação de desempenho do teste..... 12

11.1 Resultados esperados..... 12

11.2 Sensibilidade analítica..... 12

11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas..... 13

11.4 Precisão..... 14

11.5 Avaliação clínica..... 16

12. Controlo de qualidade..... 16

13. Apoio técnico..... 16

14. Marcas registadas e direitos de propriedade..... 16

15. Tabela de símbolos..... 17

16. Declaração de conformidade..... 18

17. Referências..... 19

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 género 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, sendo altamente contagioso e transmitido principalmente por gotículas respiratórias (tosse e espirros). A Organização Mundial de Saúde (WHO) designou a pandemia em curso do COVID-19 como uma Emergência em Saúde Pública de Interesse Internacional. A deteção precoce do SARS-CoV-2 é vital para permitir o isolamento e 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 porção significativa das infeções são assintomáticas, ou conduzem a sintomas ligeiros. A população mais vulnerável à forma grave da doença são os adultos com mais de 60 anos, fumadores e pessoas com doenças crónicas, como doenças cardíacas ou pulmonares, cancro, diabetes e pacientes com sistema imunológico enfraquecido. Embora atualmente já estejam disponíveis vacinas para controlar a COVID-19, estas não previnem a infeção.

2. Utilização prevista

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR III, 5 Targets, 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. O kit foi desenhado para permitir uma deteção robusta e eficaz do vírus SARS-CoV-2 mesmo no caso de se verificar o aparecimento de variantes com diferenças genéticas significativas relativamente às atualmente em circulação. A robustez do kit resulta da capacidade de detetar 5 alvos virais em simultâneo permitindo que, mesmo no caso de um ou mais alvos se tornarem inviáveis por alteração genética acumulada no vírus, o diagnóstico continua a ser eficaz. 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-qPCR III, 5 Targets, IVD, fornece o conjunto de reagentes, *primers* e sondas para a deteção qualitativa de 5 regiões do genoma do SARS-CoV-2, através de PCR em tempo real. Este kit tem como alvo, regiões nos genes da ARN polimerase dependente de RNA (RdRp), da fosfoproteína de nucleocápside (N) ambas específicas para o genoma de SARS-CoV-2 e ainda uma região específica do gene E presente no genoma de SARS-CoV-2 e comum a todos os Sarbecovirus. Todas as sequências-alvo foram 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 (maio, 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 três controlos externos (dois controlos positivos fornecidos em baixa concentração e um controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo 1 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo três sequências-alvo de SARS-CoV-2 localizadas em regiões específicas dos genes RdRp, N e E, incluindo uma sequência-alvo humana específica para o gene da RNase P (RP). O controlo positivo 2 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos localizados nos mesmos genes referidos para o controlo positivo 1, mas com sequências-alvo distintas dentro desses mesmos genes e ainda, a sequência-alvo humana localizada no gene RP. 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 5 fragmentos 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 ARN viral isolado e purificado de amostras infetadas é retro-transcrito para cDNA e posteriormente amplificado numa única reação usando cinco conjuntos de *primers*/ sondas altamente específicas para SARS-CoV-2 que exploram o denominado princípio TaqMan®. Para permitir a identificação da amplificação dos seis alvos específicos numa única reação, as sondas específicas para SARS-CoV-2 e RNase P humana são marcadas com os seguintes fluoróforos emissores: HEX™, FAM™, TexasRed® e Cy5™. Assim, este kit consiste num ensaio TaqMan® hexaplex em que no canal ótico HEX são detetados dois alvos de SARS-CoV-2 localizados no gene RdRp, no canal ótico FAM são detetados dois alvos de SARS-CoV-2 localizados no gene N, no canal ótico TexasRed é detetado o alvo referente ao gene E de SARS-CoV-2 (também comum a outros Sarbecovírus) e, finalmente, no canal ótico Cy5 é detetado o alvo humano endógeno localizado no gene RP. O facto de quatro alvos de SARS-CoV-2 emitirem fluorescência detetada em dois canais, permite amplificar a robustez e sensibilidade de deteção do SARS-CoV-2. 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 III, 5 Targets, IVD, fornece o conjunto de reagentes e controlos necessários para a deteção qualitativa de SARS-CoV-2 num único passo.

Composição do kit		Volume (por tubo)	Número de tubos	
			MD04911	MD04912
SARS-CoV-2 MMix III (RdRP, N & E)	NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRP, N & E)	SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP PPMix III (10x)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E)	SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP Positive Control 1	105 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E)	SARS-CoV-2 (RdRp, N & E)/RP Positive Control 2	105 µL	1	4
NTC	No-Template Control	105 µL	1	4

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados de -85°C a -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. Adicionalmente:

- 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 III (RdRP, N & E) deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente SARS-CoV-2 MMix III (RdRP, N & E) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente SARS-CoV-2 PPMix III (RdRP, N & E).
- 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™, Texas Red® e Cy5™ (nos comprimentos de onda de emissão de 520, 556, 603 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-qPCR III, 5 Targets, 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 ou superior para a razão entre a absorvência a 260 e a 280 nm ($A_{260/280}$) é geralmente indicativo de ARN puro. Uma vez que o etanol é um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYTech contém um controlo interno que tem como alvo o ARN humano co-purificado com o ARN viral. O ARN humano é amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos (*primers* e sonda) específicos para o gene 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 o estado de conservação aquando da 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). 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. Assim, 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-qPCR 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 os controlos positivos SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E) e SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E) em último lugar 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 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 III (RdRP, N & E) (**)	10	*n* x 10.5
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRP, N & E)	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 três para os controlos negativo e positivos (2), respetivamente.

(**) Atenção, pode ser observado um precipitado no fundo do tubo da SARS-CoV-2 MMix III. Depois de descongelar, ressuspenda a mistura de reação antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de reação RT-qPCR antes de pipetar.

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

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 & E)/RNase P, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.

5. Para os controlos positivos, adicione 8 µL de SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N & E) e 8 µL de SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N & E) nos poços relativos aos controlos positivos, 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-qPCR em tempo real para deteção das sequências.

7. 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 descreve o protocolo de tempo real optimizado para a realização de testes SARS-CoV-2/RNAse P, usando o kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, da NZYTech, nos equipamentos mencionados em baixo.

Ciclos	Temperatura	Tempo	Etapa
1	50 °C	10 min	*Transcrição Reversa*
1	95 °C	2 min	*Ativação da Polimerase*
40	95 °C	5 s	*Desnaturação*
	60 °C	60 s	*Emparelhamento/Extensão**

**Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais FAM, HEX/VIC, Texas Red/JUN e Cy5.*

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™	HEX/VIC
SARS-CoV-2, gene N	FAM™	FAM
SARS-CoV-2, gene E	Texas Red®	Texas Red/JUN
RNase P	Cy5™	Cy5

O kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, da NZYTech, foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II 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

A deteção do ARN do SARS-CoV-2 é pesquisada pela amplificação de cinco regiões do genoma viral, que são detetadas em três diferentes canais de fluorescência (FAM, HEX/VIC e Texas Red/JUN) e o controle do RP humano num quarto 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 quatro sinais de fluorescência (FAM, HEX/VIC, Texas Red/JUN 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 controlos Positivos e Negativo tiveram o desempenho esperado, de acordo com os seguintes critérios:

- **Controlos positivos**: as curvas de amplificação para HEX (dois alvos no gene RdRp do SARS-CoV-2), FAM (dois alvos no gene N do SARS-CoV-2), Texas Red (um alvo no gene E do SARS-CoV-2) e Cy5 (um alvo no gene RP humano) são todas positivas. É expectável que ambos os controlos positivos originem curvas de amplificação com Ct<32, para os canais, FAM, HEX/VIC, Texas Red/JUN 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, três ou quatro curvas de amplificação (HEX, FAM, Texas Red 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 kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, da NZYTech, utiliza os seguintes valores de Ct como *cut-off* (ciclos limiares), de forma que cada gene alvo seja considerado positivo:

Valor Ct	Interpretação dos resultados
Amplificação Ct ≤36	**Detetado (+) → POSITIVO**
Sem amplificação Ct>36	**Não detetado (-) → NEGATIVO**

O SARS-CoV-2 é detetado se as curvas de amplificação do HEX, FAM e Texas Red são sigmoides com Ct≤36, independentemente do resultado obtido para o gene RP (Cy5).

O SARS-CoV-2 é detetado se as curvas de amplificação do HEX e FAM são sigmoides com Ct≤36, independentemente dos resultados obtidos para os genes E (Texas Red) e RP (Cy5).

O SARS-CoV-2 é detetado se as curvas de amplificação do HEX e Texas Red são sigmoides com Ct≤36, independentemente dos resultados obtidos para os genes N (FAM) e RP (Cy5).

O SARS-CoV-2 é detetado se as curvas de amplificação do FAM e Texas Red são sigmoides com Ct≤36, independentemente dos resultados obtidos para os genes RdRp (HEX) e RP (Cy5).

O SARS-CoV-2 não é detetado se as curvas HEX, FAM e Texas Red 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 apenas uma curva de amplificação HEX, FAM ou Texas Red exibe uma forma sigmoide com um Ct≤36 enquanto os outros alvos SARS-CoV-2 forem negativos, independentemente do resultado obtido para o RP (Cy5). O teste deve ser repetido com ácidos 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).**

SARS-CoV-2 gene RdRp Ct (HEX)	**SARS-CoV-2 gene N** Ct (FAM)	**SARS-CoV-2 gene E** Ct (Texas Red)	**gene RP humano** Ct (Cy5)	**Interpretação dos resultados**
+	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO**
+	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO**
+	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO**
-	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO**
+	-	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado só num canal → INCONCLUSIVO**
-	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado só num canal → INCONCLUSIVO**
-	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detetado só num canal → INCONCLUSIVO**
-	-	-	+	**SARS-CoV-2 não detetado → NEGATIVO**
-	-	-	-	**Teste inválido, repetir extração de ARN e teste**

* *Não é necessária a deteção do Controlo interno no canal de deteção Cy5 para resultados positivos nos canais de deteção HEX/VIC, FAM ou Texas Red/JUN. Uma carga viral elevada de ARN alvo na amostra pode originar a redução ou ausência do sinal do Controlo Interno em Cy5.*

Nota: A NZYTech recomenda repetir a análise para todas as amostras que apresentem uma curva ambígua ou atípica que não permite uma interpretação clara. 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 genes alvo em três 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 dos tubos SARS-CoV-2 POS 1 e SARS-CoV-2 POS 2.
- 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-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II e Bio-Rad® CFX96™. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador usando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1 Resultados esperados

Gráficos de amplificação típicos referentes a amostras clínicas contendo ácidos nucleicos virais 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 Cy5 correspondente ao gene humano RNase P pode estar ausente ou exibir uma forma atípica (ver Figura 1A).

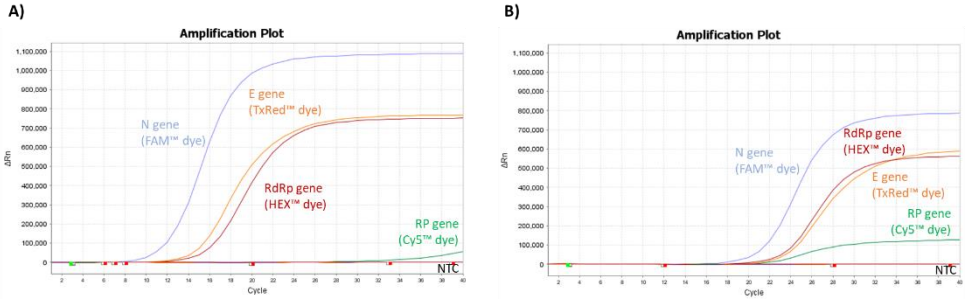

Figura 1. Deteção em simultâneo das sequências alvo SARS-CoV-2 (genes RdRp, N e E) e do gene humano da RNase P (RP), a partir de amostras clínicas com elevada (A) e média carga viral (B). Curva vermelha: deteção de dois alvos SARS-CoV-2 vRNA (gene RdRp) através do canal HEX/VIC; Curva azul: deteção de dois alvos SARS-CoV-2 vRNA (gene N) através do canal FAM; Curva laranja: deteção do alvo SARS-CoV-2 vRNA (gene E) através do canal TexasRed/JUN; Curva verde: deteção do gene humano RNase P através do canal Cy5. NTC, controlo negativo.

11.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 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 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 confirmado por dois operadores diferentes usando 3 lotes de

kit num ensaio de 48 réplicas, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem.

11.3 Reatividade (inclusividade) e especificidade (exclusividade) analíticas

A inclusividade e a reatividade cruzada do SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, 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 kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, não reage com outros microrganismos colonizadores e patogénicos comumente encontrados em amostras clínicas humanas. Este estudo foi realizado usando um painel comercial de patógenos respiratórios comercializados pela ZeptoMetrix, nomeadamente, o NATtrol ™ Respiratory Verification Panel (# NATRVP-IDI). Este painel inclui amostras representativas de verdadeiros espécimes clínicos humanos, incluindo Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A 2009 H1N1pdm, Influenza B (B/Florida/02/06), Metapneumovirus 8 (Peru 6-2003), Respiratory Syncytial Virus A, Rhinovirus Type 1A, Parainfluenza virus Type 1, Parainfluenza virus Type 2, Parainfluenza virus Type 3, Parainfluenza virus Type 4, Adenovirus Type 3, Coronavirus NL63, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU-1, *M. pneumoniae* M-129, *C. pneumoniae* CWL-029 e *B. pertussis* A639. Os resultados obtidos, utilizando-se três lotes diferentes do kit, confirmaram que nenhum dos microrganismos testados interferiu no desempenho do kit ao originar uma amplificação de sinal detetável quer fosse resultado falso positivo ou um sinal inespecífico. Quer a extração de todas as amostras quer os ensaios foram feitos em triplicado.

Adicionalmente, foi ainda realizado o ensaio RT-qPCR utilizando ácidos nucleicos de outros 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 diferentes deste kit, confirmaram que nenhum dos microrganismos testados interferiu no desempenho do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, 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 kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, 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 kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD. Todas as experiências realizaram-se no instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST.

Potencial Interferente	Substância ativa	Concentração final na amostra	Interferência Sim (S) 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-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, 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 nasorofaringe, 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 36 réplicas de cada amostra (15 e 150 cópias por reação), durante 3 dias com 12 réplicas por cada concentração por dia (num total de 72 ensaios).

Precisão of kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD.

Variável testada		Gene RdRp (Cópias/Reação)		Gene N (Cópias/Reação)		Gene E (Cópias/Reação)	
		15	150	15	150	15	150
Repeatabilidade							
	n	12	12	12	12	12	12
	Média Cq	32,40	29,07	31,67	28,46	32,89	29,28
	Coeficiente de Variação(%)	1,53	1,23	1,94	1,48	2,79	2,24
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100	100	100
Reprodutibilidade Diária							
	n	36	36	36	36	36	36
	Média Cq	32,57	29,56	31,87	28,58	31,95	30,24
	Coeficiente de Variação(%)	2,31	2,58	2,51	2,76	3,48	3,22
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100	100	100
Reprodutibilidade Entre lotes							
	n	36	36	36	36	36	36
	Média Cq	32,55	29,39	31,77	28,42	32,13	30,03
	Coeficiente de Variação(%)	2,25	2,49	2,68	2,30	3,87	3,24
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100	98	100
Reprodutibilidade Entre operadores							
	n	36	36	36	36	36	36
	Média Cq	32,44	29,33	31,88	28,68	32,03	29,66
	Coeficiente de Variação(%)	1,56	2,14	1,63	2,24	3,46	3,07
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100	100	100
Reprodutibilidade Instrumento							
	n	48	48	48	48	48	48
	Média Cq	33,10	29,96	32,08	29,00	32,90	30,55
	Coeficiente de Variação(%)	1,98	1,24	2,68	2,83	4,12	3,87
	% Réplicas detetadas	100	100	100	100	96	100

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada pela análise de 36 réplicas de cada amostra (15 e 150 cópias por reação) usando 3 lotes diferentes do kit com 24 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 48 réplicas por cada amostra (15 e 150 cópias por reação), em quatro equipamentos de PCR em tempo real diferentes (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 96 e Bio-Rad® CFX96™), num total de 96 testes por equipamento e reação.

11.5 Avaliação clínica

A avaliação do desempenho do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, da NZYTech ao utilizar amostras recolhidas das vias respiratórias foi levada a cabo em um laboratório de diagnóstico molecular independente. No total, 501 amostras clínicas negativas e 150 amostras clínicas positivas foram testadas. Os resultados revelaram uma concordância de 97,4% de sensibilidade clínica e 100% de especificidade clínica para as amostras positivas e negativas analisadas.

12. Controlo de qualidade

Todos os componentes do kit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit III, 5 Targets, IVD, da NZYTech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema hexaplex de RT-qPCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp, N e E), 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, TexasRed 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 III, 5 Targets, IVD

Número de catálogo: MD04911 e MD04912

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

Nathan J, Hardenbrook1 and Peijun Zhang (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. Current Opinion in Virology. 52:123–134.

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Docherty AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. Lancet 399(10334):1463-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. Science 372:1043-1044.

Irwin Jungreis, Rachel Sealfon and Manolis Kellis (2021). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. Nature Communications. 12:2642.

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 30 September 2021. 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.

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.

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.

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.

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