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

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

REF

MD04901, 96 reações
MD04902, 4 x 96 reações
MD04903, 2 x tiras de 8 poços, perfil alto

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

CE IVD

PT

Instruções de utilização

MD0490_IM_pt

VERSÃO 2302, outubro 2023

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 4
4. Descrição do produto 5
5. Armazenamento, conservação e manuseamento 6
6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos 7
7. Colheita e preparação da amostra 7
8. Advertências e precauções 8
8.1. Informação de segurança 8
8.2. Manuseamento e Procedimentos adequados 8
9. Procedimentos de testagem 9
9.1. Preparação das reações de RT-qPCR 9
9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real 10
10. Análise de dados 11
10.1. Critérios de validação da corrida 11
10.2. Interpretação dos resultados 12
11. Avaliação de desempenho do teste 14
11.1. Resultados esperados 14
11.2. Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD) 15
11.3. Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes 16
11.4. Precisão 17
11.4.1. Repetibilidade 18
11.4.2. Repetibilidade diária 18
11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes 18
11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores 18
11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos 18
11.5. Avaliação Clínica 21
12. Controlo de Qualidade 21
13. Apoio Técnico 21
14. Marcas registadas e direitos de propriedade 21
15. Tabela de símbolos 22
16. Declaração de Conformidade 23
17. Referências 24

1. Introdução

A COVID-19 foi inicialmente detetada em dezembro de 2019, na China, e é provocada pelo novo *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 ("síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2", em português). A pandemia COVID-19 causou, a nível mundial, um elevado número de casos de morbilidade e mortalidade, originando uma crise de saúde pública global e o colapso dos recursos de saúde. A gripe sazonal (Influenza) é uma doença infeciosa respiratória aguda, contagiosa, apresentando na maioria dos casos uma forma benigna sendo causada por vírus de ARN da Família Orthomyxoviridae (vírus Influenza/gripal). A gripe apresenta-se, na maior parte das vezes, sob a forma epidémica afetando anualmente milhões de pessoas, das quais cerca de 0.1% desenvolvem pneumonias que levam à hospitalização e/ou morte. Contudo, o rácio de fatalidades da gripe é menor do que a de COVID-19. Existem três tipos de vírus Influenza, o A, o B e o C, embora apenas os dois primeiros apresentem relevância clínica na saúde humana, pois são os principais causadores das epidemias atuais. Os vírus Influenza A são os mais frequentes e são essencialmente vírus das aves que se adaptam, ocasionalmente, aos mamíferos, incluindo suínos, equinos e humanos, podendo causar surtos pandémicos. Os vírus B e C infetam apenas humanos. A influenza B é responsável por surtos localizados em pequenas comunidades. O vírus sincicial respiratório humano (VSR; RSV, pelo seu acrónimo em inglês) é um vírus de ARN da família Paramyxoviridae. O RSV causa infeções do trato respiratório em indivíduos de todas as idades e é a principal causa de infeção do trato respiratório inferior em pediatria. A infeção natural com RSV não induz imunidade protetora e, portanto, a infeção pode ocorrer várias vezes. Apesar de ser um vírus sobejamente conhecido, ainda não existe vacina nem tratamento específico. Assim, a infeção por RSV é a principal causa de internamento nas crianças abaixo de um ano, sendo responsável por 40% das pneumonias e até 80% dos casos de bronquiolite viral aguda.

Embora o SARS-CoV-2 e os vírus gripais/sincicial sejam agentes infeciosos diferentes, originam infeções respiratórias com sintomatologia semelhante e cuja principal via de transmissão é o contacto direto com gotículas respiratórias *produzidas* ao falar, tossir ou espirrar. Este contacto pode dar-se de forma direta, através da interação com uma pessoa infetada ou de forma indireta, através do contacto com superfícies ou objetos contaminados e posterior toque nos olhos, nariz ou boca. A COVID-19 é consideravelmente mais contagiosa do que a gripe. A possibilidade da coexistência de COVID-19 com uma epidemia simultânea de gripe e concomitante co-circulação de outros vírus sazonais representa um desafio adicional para os sistemas de saúde. Assim, a deteção precoce do SARS-CoV-2 bem como dos outros vírus respiratórios é critica, quer para providenciar o tratamento mais rápido aos pacientes infetados, mas principalmente para minimizar a transmissão destes agentes. Embora existam vacinas disponíveis para SARS-CoV-2 e para alguns vírus influenza, há uma escassez de medicamentos antivirais eficazes, e em particular para o RSV não há vacina disponível e os tratamentos terapêuticos são muito limitados.

2. Utilização prevista

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, da NZYtech é um teste molecular multiplexado baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção qualitativa dos ácidos nucleicos específicos dos vírus responsáveis pela COVID-19 (SARS-CoV-2), pela Influenza (vírus das gripes A e B) e pelo vírus sincicial respiratório (RSV, subtipos A e B), em amostras biológicas humanas. Contudo, este kit não permite a distinção do vírus da Influenza A e o da B, uma vez que ambos geram sinal de fluorescência no mesmo canal

de deteção (FAM). Por outro lado, outros betacoronavírus e o vírus da Influenza C não são detetados através deste kit. Este teste serve como complemento ao diagnóstico que deverá ser combinado com os sinais clínicos e sintomas de infeção viral respiratória. Do ponto de vista da rapidez de diagnóstico, este teste é vantajoso uma vez que permite distinguir, na mesma reação de RT-qPCR, os três tipos de infeções virais em pacientes com sintomas clínicos semelhantes. Um resultado positivo indica a presença de ARN viral de SARS-CoV-2 e/ou Influenza A e B e/ou RSV (subtipos A e B), mas a correlação clínica da anamnese e outras informações de diagnóstico são necessárias para determinar o estado de infeção do paciente. Um resultado negativo não preclude a existência de infeção por quaisquer um dos quatro vírus e não deve ser adotado como único instrumento para a decisão de tratamento do paciente. A testagem deve ser realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e experiência em diagnóstico in vitro. As amostras clínicas adequadas incluem zaragatoa ou aspirado nasofaríngeo ou orofaríngeo, expetoração, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, zaragatoa conjuntival.

3. Princípio do ensaio

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa dos genomas do SARS-CoV-2, do Influenza A, do Influenza B e do vírus sincicial respiratório, através da técnica de PCR em tempo real (ver requisitos das especificações do equipamento na Secção 6). Os genes codificadores da ARN polimerase dependente de RNA (RdRp) e da fosfoproteína de nucleocápside (N) foram previamente identificados como marcadores altamente específicos para o SARS-CoV-2. No caso dos vírus de Influenza, a escolha das regiões genómicas alvo foi informada pela análise de sequências altamente conservadas com sequências disponíveis publicamente, para garantir que os genes alvos, que codificam a proteína de matriz (M1) e o proteína não estrutural (NS2), sejam detetados nos genomas da Influenza A e da Influenza B, respetivamente. Relativamente ao vírus sincicial respiratório, foram analisadas sequências altamente conservadas dos dois subtipos existentes (A e B), tendo sido selecionado o gene L que codifica para uma RNA polimerase viral dependente de RNA (L) que contém as múltiplas atividades enzimáticas necessárias para a replicação do vírus.

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi constituído para ter um amplo perfil de deteção (inclusividade) possível, mas permanecendo específico e exclusivo, para os genomas do SARS-CoV-2, do RSV e dos vírus da Influenza tipo A e B, respetivamente. Assim, o conjunto de *primers*/sondas foi desenhado especificamente para deteção dos quatro genomas virais, incluindo variantes atualmente identificadas, não apresentando homologia significativa com outros genomas não relacionados, o que traduz a elevada especificidade e sensibilidade de deteção do teste, já que evita a deteção cruzada de outros organismos causadores de doenças respiratórias. O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar se a extração dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas humanas foi eficiente possibilitando, igualmente, detetar a presença de inibidores de PCR que possam influenciar a reação de amplificação. A capacidade de mutação das maquinarias genéticas de sobrevivência destes vírus é praticamente ilimitada, o que implica que novas sequências dos seus genomas virais venham a ser disponibilizadas após a criação deste kit. Desta forma, a NZYtech revisita periodicamente as sequências genómicas dos genes alvo do SARS-CoV-2, do RSV e dos vírus gripais A e B, e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit. Adicionalmente, o kit inclui três controlos externos (dois controlos positivos fornecidos em

baixa concentração e o controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo 1 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as seguintes quatro sequências alvo detetadas pelo kit (gene RdRp SARS-CoV-2, gene NS2 Influenza B, gene L RSV e gene RP humano). O controlo positivo 2 consiste em fragmentos de ácidos nucleicos contendo as seguintes quatro sequências alvo detetadas pelo kit (genes N SARS-CoV-2, gene M1 Influenza A, gene L RSV e gene RP humano).

No contexto deste kit, a determinação qualitativa de ARN viral é baseada na técnica de RT-qPCR em tempo real, metodologia de referência no diagnóstico laboratorial. O princípio do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech, consiste na utilização do ARN viral, isolado e purificado através de um sistema de extração (IVD), que é retro transcrito (RT) em ADNc e posteriormente amplificado por PCR, numa única reação, através de cinco conjuntos de *primers*/sondas altamente específicos baseados no princípio TaqMan®. Na presença de ARN viral extraído de amostras de um paciente infetado, as sondas TaqMan® ligam-se especificamente a regiões conservadas dos genes virais alvo que se encontram flanqueados por dois pares de *primers* igualmente específicos. Um sexto conjunto de oligonucleótidos (*primers* e sonda) funciona como controlo interno, detetando uma sequência de ácidos nucleicos do gene humano RNAse P (RP), o que permite, deste modo, confirmar a eficácia do processo de extração do material biológico recolhido do paciente.

Para permitir a identificação da amplificação dos seis alvos específicos numa única reação, as sondas específicas para SARS-CoV-2, Influenza A e B, RSV e RNase P humana são marcadas com diferentes fluoróforos emissores, respetivamente TexasRed™, FAM™, HEX™ Cy5™. Assim, este kit consiste num ensaio TaqMan® hexaplex em que no canal ótico TexasRed™ são detetados dois alvos do SARS-CoV-2, no canal ótico FAM™ são detetados dois alvos referentes aos vírus da gripe A e B, no canal ótico HEX™ é detetado o alvo referente ao vírus RSV (subtipos A e B) e, finalmente, no canal ótico Cy5™ é detetado o gene alvo humano. O facto de dois alvos do SARS-CoV-2 emitirem a mesmo fluorescência detetada no mesmo canal, permite amplificar a robustez e sensibilidade de deteção do SARS-CoV-2. No caso dos dois vírus da Influenza, ao amplificarem no mesmo canal estes não são distinguidos em A ou B. Assim, este teste não se destina a diferenciar os subtipos do vírus Influenza A nem as linhagens do vírus Influenza B, nem os subgrupos do RSV. Caso seja necessária a diferenciação de estirpes e subtipos específicos de vírus RSV ou Influenza são necessários testes adicionais. Igualmente, estes conjuntos de *primers* /sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que a amplificação do ARNm humano, mesmo quando presente em concentrações extremamente altas, não limita a eficiência dos *primers* /sonda específicos para os ARNs virais.

4. Descrição do produto

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, da NZYtech fornece um conjunto de reagentes e controlos necessários para realizar a deteção qualitativa de SARS-CoV-2, dos vírus Influenza A e Influenza B e do vírus RSV num único passo. O kit está disponível em formato de tubo: referência MD04901 para 96 reações e referência MD04902 para 4x 96 reações.

COMPOSIÇÃO DO KIT		VOLUME (POR TUBO)	NÚMERO DE TUBOS		COR DA TAMPA
			MD04901	MD04902	
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix	Mistura enzimática NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	4	Neutra
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	Mistura de primers & sonda COVID-19, Flu A/B, RSV (10x)	205 µL	1	4	Castanha
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	Controlo positivo 1 COVID-19, Flu A/B, RSV	105 µL	1	4	Vermelha
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	Controlo positive 2 COVID-19, Flu A/B, RSV	105 µL	1	4	Vermelha
NTC	Controlo negativo	105 µL	1	4	Neutra

Como alternativa, o kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD está disponível num formato de tiras de 8 poços, com uma solução pré-preparada da mistura enzimática NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix e da mistura de primers & sonda, para a realização de 16 reações de RT-qPCR (2 tiras de 8 poços, perfil alto), simplificando e otimizando o processo de teste.

COMPOSIÇÃO DO KIT		VOLUME (POR TUBO)	NÚMERO DE TUBOS/TIRAS	COR DA TAMPA
			MD04903	
COVID-19, Flu A/B, RSV Mix	Solução pré-preparada da mistura enzimática NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix e da mistura de primers & sonda	Tira de 8 poços x 12 µL por poço	2	Neutra
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	Controlo positivo 1 COVID-19, Flu A/B, RSV	20 µL	1	Vermelha
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	Controlo positivo 2 COVID-19, Flu A/B, RSV	20 µL	1	Vermelha
NTC	Controlo negativo	20 µL	1	Neutra
TAMPAS PARA TIRAS DE 8 POÇOS	-	-	2	Neutra

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD é enviado em gelo seco. 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.

- É recomendável reduzir ao mínimo o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas com soluções de trabalho. Se conveniente, após descongelação preparar alíquotas de volumes menores dos componentes do kit.

- O componente COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix deve ser armazenado protegido da luz. Em particular, não exponha o componente COVID-19, Flu A/B, RSV MMix à luz solar direta após a mistura com o COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix. O componente COVID-19, Flu A/B, RSV Mix incluído no formato de tiras de 8 poços (referência MD04903) também deve ser armazenado protegido da luz.
- Contactar imediatamente a NZYtech caso, ao receber o kit, a embalagem esteja danificada.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYtech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que deteta os canais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos Texas Red, FAM, HEX/VIC e Cy5 (canais de comprimento de onda de 615, 520, 556 e 670 nm, respetivamente) e acessórios fornecidos pelo fabricante. Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Consumíveis, reagentes e equipamento para extração de ARN viral de amostras biológicas/clínicas do trato respiratório.
- Consumíveis de plástico para qPCR, isentos de nucleases: tubos de PCR de 1,5 ou 2 mL, tubos e tampas de tiras de 0,1 mL, placas de 96 poços, peliculas adesivas (apenas necessários para as referências de produto MD04901 e MD04902).
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases.
- Luvas descartáveis.
- Agitador de vórtex e centrífuga de bancada.

7. Colheita e preparação da amostra

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, foi validado para amostras de zaragatoa oro-nasofaríngea. Diferentes fatores, como o protocolo de recolha da amostra do trato respiratório humano (zaragatoas oro-nasofaríngeas), transporte, armazenamento e tempo de processamento da amostra, são críticos para obter resultados ótimos. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita inadequada, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Além disso, devem ser transportadas e armazenadas a baixas temperaturas em concordância com os regulamentos de biossegurança. O ARN ou ácidos nucleicos totais, extraídos segundo um protocolo IVD, constituem o material inicial para o ensaio usando o kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech. Por favor, assegure-se de que as amostras de ARN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Um valor de ~2 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 RNase P (RP). A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração e isolamento do ARN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores durante o processamento da amostra.

8. Advertências e precauções

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade, totalidade e tipo de componentes do kit, etiquetagem correta e o estado de conservação aquando da entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Qualquer alteração das mesmas 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 dos vírus respiratórios SARS-CoV-2, RSV, Influenza A e Influenza B deve ser realizada somente por profissionais especializados com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2 Manuseamento e Procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.
- Em todos os procedimentos devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem DNase/RNase).
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possivel mude de bata.
- Selecione materiais e equipamentos especificos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias virais. Assim, este deve ser guardado e manuseado longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre o controlo negativo fornecido no kit (NTC).
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem. As placas devem ser sempre descartadas num contentor de riscos biológicos. Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.

- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos.
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, como sejam vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara, não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que todos os passos de pipetagem e preparação da placa devem ser feitos em gelo. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de RT-PCR em tempo real. Durante a preparação das misturas de reação, a exposição prolongada à temperatura ambiente pode levar a artefactos que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos, centrifugar por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo e colocar em gelo. **Recomenda-se vivamente pipetar sempre em último lugar os 2 controlos positivos do kit, COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 e COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2, de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

9.1 Preparação das reações de RT-qPCR

Para as referências do kit MD04901 e MD04902 - tubos

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). Armazene os volumes restantes de acordo com a **Seção 5**.

COMPONENTE	**VOLUME 1 TESTE (µL)**	**VOLUME *n* TESTES * + 5% (µL)**
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix **	10	*n* x 10,5
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	2	*n* x 2,1
VOLUME FINAL	**12**	***n* x 12,6**

** Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais três, uma para o controlo negativo e duas para os controlos positivos, respetivamente.*

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

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. Prossiga para a etapa **8.** para preparar os controlos e as amostras biológicas.

Para a referência do kit MD04903 - tiras de 8 poços

4. Determine o número de reações necessárias para o ensaio, conte o número de amostras e adicione mais três reações: uma para o controlo negativo e duas para os controlos positivos, respetivamente. Armazene as tiras de 8 poços não utilizadas, protegendo-as da luz, de acordo com as instruções indicadas na **Seção 5**.
5. Certifique-se de que as tiras de 8 poços estão completamente descongeladas.
6. Centrifugue brevemente as tiras de 8 poços para garantir a homogeneidade da solução COVID-19, Flu A/B, RSV Mix. Cada poço individual contém 12 µL da COVID-19, Flu A/B, RSV Mix (solução que inclui a NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix e a mistura de iniciadores e sondas, previamente misturadas na proporção correta.
7. Prossiga para a etapa **8.** para preparar os controlos e as amostras biológicas.

Controlos e amostras

8. Para o <u>controlo negativo</u>, adicione 8 µL de NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
9. Para as <u>amostras biológicas</u>, adicione 8 µL de cada amostra de ARN nos poços relativos ao ensaio COVID-19, Flu A/B, RSV, de acordo com a configuração de testagem da placa/tiras de 8 poços. O volume final deve ser de 20 µL.
10. Para os dois <u>controlos positivos</u>, adicionar 8 µL de COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 (que deteta os genes SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2, RSV L e RP humano) e 8 µL de COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2 (que deteta os genes SARS-CoV-2 N, Influenza A M1, RSV L e RP humano) em substituição do ARN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
11. Para as referências do kit MD04901 e MD04902, 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. Para a referência do kit MD04903, fechar as tiras de 8 poços com as tampas extra de tiras de 8 poços que estão incluídas neste formato.
12. Colocar a placa/tiras de 8 poços[¥] no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de RT-qPCR de acordo com a secção seguinte.

[¥] *Tenha em consideração que as **tiras de 8 poços de perfil alto são exclusivamente compatíveis com termocicladores de blocos de 0.2 ml**.*

9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. Estas condições podem, contudo, ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

Definições sugeridas para o protocolo RT-qPCR

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	50 °C	10 min	Transcrição Reversa
1	95 °C	3 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 Texas Red, FAM, VIC/HEX e Cy5.*

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

Fluoróforos/Marcações

GENES ALVO /DETETOR	CORANTE REPORTER (SONDAS)	CANAIS DE DETEÇÃO
COVID-19 (SARS-CoV-2)	Texas Red™	Texas Red/JUN
GRIPE A/B (INFLUENZA A/ INFLUENZA B)	FAM™	FAM
RSV	HEX™	HEX/VIC ou JOE
RNASE P	Cy5™	Cy5

As referências do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD MD04901 e MD04902 foram validadas nos seguintes equipamentos de PCR em tempo Real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 96 e Bio-Rad® CFX Opus. A referência do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD MD04903 foi validada nos seguintes equipamentos de PCR em tempo Real: Applied Biosystems® 7500 and Bioer LineGene Mini S. Se pretender usar outro equipamento, o kit dever ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

10. Análise de dados

10.1 Critérios de validação da corrida

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

- **Controlos positivos**: as curvas de amplificação para Texas Red (SARS-CoV-2), FAM (Influenza A e Influenza B), VIC/HEX (RSV), e Cy5 (RP) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct<32, para qualquer um dos canais FAM, Texas Red, VIC/HEX 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):** nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (FAM, Texas Red, VIC/HEX 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, significa que o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.
Por favor, repita o teste.
Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2 Interpretação dos resultados

O kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech para as amostras clínicas, utiliza os seguintes valores de Ct como *cut-off* (ciclos limiares), por forma a que cada gene alvo seja considerado positivo:

VALOR CT	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
Amplificação Ct ≤35	Detetado (+) → POSITIVO
Sem amplificação Ct>35	Não detetado (-) → NEGATIVO

SARS-CoV-2 é detetado se a curva de amplificação do Texas Red é sigmoide com Ct≤35, independentemente do resultado obtido para o gene RP (Cy5). A presença ou ausência de um sinal no canal Cy5 não é significativa para a validade da análise processada.

SARS-CoV-2 não é detetado se a curva do Texas Red não for positiva (Ct>35), enquanto o gene RP (Cy5) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct≤40.

Influenzas A e/ou B é/são detetado(s) se a curva de amplificação do FAM é sigmoide com Ct≤35, independentemente do resultado obtido para o gene RP (Cy5). A presença ou ausência de um sinal no canal Cy5 não é significativa para a validade da análise processada.

Influenzas A e/ou B não são detetados se a curva do canal FAM não for positiva (Ct>35), enquanto o gene RP (Cy5) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct≤40.

RSV é detetado se a curva de amplificação do VIC/HEX é sigmoide com Ct≤35, independentemente do resultado obtido para o gene RP (Cy5). A presença ou ausência de um sinal no canal Cy5 não é significativa para a validade da análise processada.

RSV não é detetado se a curva do VIC/HEX não for positiva (Ct>35), enquanto o gene RP (Cy5) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct≤40.

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

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

SARS-CoV-2 (TEXAS RED)	**INFLUENZA A/B** (FAM)	**RSV** (VIC/HEX)	**RP** (CY5)	**INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**
+	-	-	+/-*	SARS-CoV-2 detetado → POSITIVO
-	+	-	+/-*	Influenza A/B detetado → POSITIVO
-	-	+	+/-*	RSV detetado → POSITIVO
+	+	-	+/-*	SARS-CoV-2 e Influenza A/B detetados → POSITIVO
+	-	+	+/-*	SARS-CoV-2 e RSV detetados – dupla infeção → POSITIVO
-	+	+	+/-*	Influenza A/B e RSV detetados – dupla infeção → POSITIVO
+	+	+	+/-*	SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV detetados → POSITIVO
-	-	-	+	SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV não detetados → NEGATIVO
-	-	-	-	Teste inválido, repetir extração

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

Nota: *A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.*

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

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

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos equipamentos de PCR referidos no tópico 9.2. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1. Resultados esperados

Gráficos representativos e exemplificativos de amplificação referentes a amostras clínicas contendo ácidos nucleicos virais SARS-CoV-2 e/ou Influenza A/B e/ou RSV encontram-se apresentados na Figura 1. Em casos de cargas virais muito altas a curva do canal Cy5, correspondente ao gene humano RNase P, pode estar ausente ou exibir uma forma atípica.

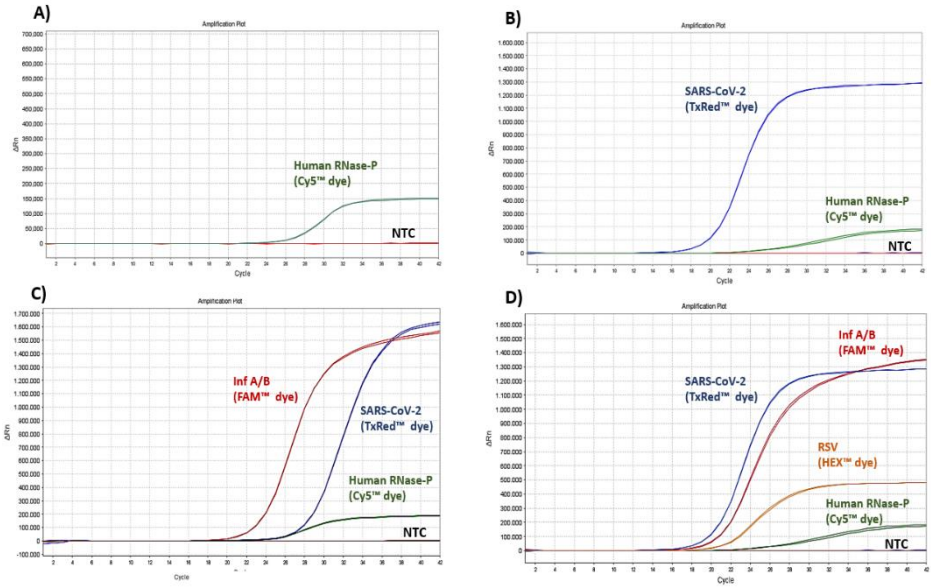

Figura 1. Deteção de ácidos nucleicos do SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV e RNase P humano em amostras clínicas negativa (A), positiva para o SARS-CoV-2 (B), positiva para o SARS-CoV-2 e Influenza A/B (C), **ou positiva para uma coinfecção tripla com SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV (D).** Curva verde: Deteção de gene humano RNAse P através do canal Cy5. Curva azul: deteção das sequências alvo de ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp e N) através do canal Texas Red. Curva vermelha: deteção das sequências alvo de ARN viral Influenza A (gene M1) e Influenza B (gene NS2) através do canal FAM. Curva laranja: deteção das sequências alvo de ARN viral RSV (gene L) através do canal VIC/HEX. NTC controlo negativo.

11.2. Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração limitante do vírus respiratório que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias (mas todas diluições limitantes) dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B e RSV, individualmente ou misturadas com ARN extraído de amostras negativas da oro-nasofaringe, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação recomendadas. Os testes foram repetidos duas vezes por dia, durante 4 dias, produzindo 48 réplicas para cada concentração de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, RSV testadas. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta 0,25 cópias/µL de ARN viral SARS-CoV-2, 0,375 cópias/µL de Influenza A, 0,375 copies/µL de Influenza B e 0,375 cópias/µL de RSV com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Deteção (LoD), é de 250 cópias/mL para o SARS-CoV-2, 375 cópias/mL para o vírus de Influenza A, 375 cópias/mL para o vírus de Influenza B e 375 cópias/mL para o vírus RSV.

Os diferentes LoDs foram confirmados por dois operadores usando os 3 lotes de kit num ensaio de 48 testes, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem para as referências do kit MD04901 e MD04902. O estudo do LoD estabeleceu quais as menores concentrações virais de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A e RSV B (número de cópias/mL) que podem ser detetadas pelo kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD em, pelo menos, 99% dos casos. Amostras colhidas com zaragatoas orofaríngeas (OF) e nasofaríngeas (NF) negativas foram agrupadas, e enriquecidas com várias concentrações de vírus inativados, nomeadamente com as seguintes estirpes e linhagens: SARS-CoV-2 (variante Ómicron); Influenza A (estirpes A/Singapore/ INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) e A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09); Influenza B (estirpes B/Colorado/06/2017 (linhagem Vitoria) e B/Phuket/3073/2013 (linhagem Yamagata); RSV A (estirpe não determinada) e RSV B (estirpe CH93 18-18). O LoD foi confirmado para a referência MD04903 do kit por dois operadores diferentes, usando três lotes diferentes, num ensaio de 48 réplicas utilizando amostras negativas de orofaringe/nasofaringe contaminadas com várias concentrações de vírus de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A ou RSV B.

A sensibilidade analítica do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, num contexto de coinfecção foi avaliada através da realização de ensaios em que a sensibilidade da deteção de um vírus foi avaliada no contexto de coinfecção com os restantes vírus detetados pelo kit. Para o ensaio de sensibilidade da deteção do SARS-CoV-2, foram utilizadas exatamente 10^4 cópias de ácidos nucleicos de Influenza A, 10^4 cópias de ácidos nucleicos de Influenza B e 10^4 cópias de ácidos nucleicos de RSV. Por sua vez, a sensibilidade da deteção da Influenza A foi calculada numa coinfecção com 10^4 cópias de SARS-CoV-2, 10^4 cópias de Influenza B e 10^4 cópias de RSV. A sensibilidade da deteção da Influenza B foi calculada numa coinfecção com 10^4 cópias de SARS-CoV-2, 10^4 cópias de Influenza A e 10^4 cópias de RSV. Finalmente, a sensibilidade da deteção do RSV foi calculada no contexto de uma coinfecção com 10^4 cópias de SARS-CoV-2, 10^4 cópias de Influenza A e 10^4 cópias de Influenza B. Para a determinação de sensibilidade do kit quando estamos na presença de vários vírus alvo presentes numa amostra, elaborou-se um ensaio em que todas as amostras foram analisadas em quadruplicado usando 3 lotes de kit diferentes (o que perfaz um total de 12 replicados por diluição) e seguindo as condições de reação recomendadas no kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Os resultados da interferência competitiva mostram que o LoD para o SARS-CoV-2 não se alterou na presença de coinfecção. No entanto, o LoD da Influenza A na presença de coinfecção é de

2500 cópias/mL, o LoD da Influenza B na presença de coinfecção é de 1250 cópias/mL e o LoD do RSV na presença de coinfecção é de 750 cópias/mL.

11.3. Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos quer do SARS-CoV-2 quer dos vírus da Influenza A, da Influenza B e RSV, e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. A análise *in silico* (simulação computacional) indica que amplificação de sequências não-alvo que resultam em reatividade cruzada ou que podem interferir potencialmente na detecção de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e RSV, não é provável. Através da análise *in silico*, conclui-se que o ensaio permitiu detetar todas as estirpes dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e de RSV, e que não existe reatividade com espécies não relacionadas. O painel *NATtrol™ Flu Verification* (ZeptoMetrix®) foi utilizado para avaliar a performance do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, na deteção dos ácidos nucleicos virais dos seguintes organismos: Influenza AH1 A/New Caledonia/20/99; Influenza AH3 A/Brisbane/10/07; Influenza A H1N1pdm A/NY/02/091; Influenza B B/Florida/02/06; Respiratory Syncytial Virus A N/A Respiratory Syncytial Virus B CH93(18)-18. Além disso também, foi testada uma amostra positiva SARS-CoV-2 (variante Ómicron) inativada.

Os ensaios *in vitro* para reatividade cruzada (exclusividade) foram realizados para confirmar que o kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, 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-ID (# MDZ001). Este painel inclui amostras representativas de espécimes clínicos verdadeiros, 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 diferentes lotes do kit, confirmaram que, com exceção dos patógenos respiratórios que são terminantemente identificados pelo kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD (nomeadamente, SARS-CoV-2, Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A 2009 H1N1pdm, Influenza B (B/Florida/02/06) e Respiratory Syncytial Virus A, 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.

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 de diferentes deste 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, pelo que o kit apresenta uma especificidade analítica de 100%.

O impacto da possível interferência de substâncias encontradas em amostras de exsudado nasofaríngeo na sensibilidade de deteção viral pelo kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, foi avaliada num ensaio de 17 substâncias interferentes (tabela em baixo). Neste estudo foram utilizadas amostras artificiais constituídas pelos vírus inativados de SARS-CoV-2, Influenza A e B e RSV, numa matriz de exsudado nasofaríngeo negativo. As amostras artificiais foram preparadas adicionando o vírus na concentração 3x LoD a uma matriz clínica negativa tendo sido também preparada uma amostra controlo sem vírus. As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras artificiais em concentrações que representam os níveis mais elevados esperados em amostras respiratórias artificiais com base na revisão da literatura. Foi também incluído um controlo negativo utilizando-se água como substância adicionada. Estes ensaios demonstraram que todas estas substâncias não interferem na sensibilidade de deteção do vírus pelo COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech. Todas as experiências realizaram-se no instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST.

Potencial Interferente	Substância ativa	Concentração final na amostra	Interferência Sim (S) ou Não (N)				
			SARS-CoV-2	Gripe A	Gripe B	VSR A	VSR B
Nenhum	N/A	-	N	N	N	N	N
Água do Mar isotónica (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N	N	N	N	N
Spray para a garganta, anestésico e analgésico oral (Strepfen)	Flurbiprofeno	5% v/v	N	N	N	N	N
Solução de lavagem nasal (spray para alergias - Vibrocil)	Propionato de Fluticasona	5% v/v	N	N	N	N	N
Corticosteroides em spray nasal (Nasomet)	Furoato de Mometasona	5% v/v	N	N	N	N	N
Corticosteroides em spray nasal (Pulmicort)	Budesonida	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimicrobial, sistémico (Trobex)	Trobamicina	10 µg/mL	N	N	N	N	N
Solução bucal anti-inflamatória, analgésica e anti-séptica (Pyralvex)	Extracto de Ruibardo e Ácido salicílico	5% v/v	N	N	N	N	N
Tópico orofaríngeo, antifúngico e Antimicrobiano (Daktarin)	Nitrato de Miconazol	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Elixir Bucal Antisséptico (Eludril Gé)	Gluconato de Clrohexidina, Clrobutanol hemihidratado	5% v/v	N	N	N	N	N
Xarope Antitússico (Codipront)	Codeína, Citrato de feniltoloxamina	5% v/v	N	N	N	N	N
Sangue (humano)	-	4% v/v	N	N	N	N	N
Antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mucolítico (Mucolsovan)	Cloridrato de ambroxol	5% v/v	N	N	N	N	N
Solução gotas nasais (Nasarox)	Cloridrato de Oximetazolina	10% v/v	N	N	N	N	N
Antibiótico, pomada nasal (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Saliva (human)	-	25% v/v	N	N	N	N	N
Etanol absoluto	Álcool	5% v/v	N	N	N	N	N

11.4. Precisão

A precisão do ensaio do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD da NZYtech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos individuais dos vírus SARS-CoV-2, da gripe A, da gripe B e do RSV representativos de duas cargas virais, 3x LoD e 30x LoD por reação, combinadas com ARN extraído de amostras biológicas negativas da orofaringe, utilizando-se 3 lotes de kit e seguindo as condições de reação específicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de 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 por um operador através da análise de 12 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), contabilizando um total de 24 testes executados por de SARS-CoV-2, RSV e do vírus das gripes A e B.

11.4.2. Repetibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 48 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), durante 4 dias, com 12 réplicas por cada concentração por dia (num total de 96 reações).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 84 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 28 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 24 réplicas de cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), por quatro operadores, com 6 réplicas por operador e por carga viral, num total de 36 testes por operador.

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada, para as referências do kit MD04901 e MD04902, pela testagem de 36 réplicas por cada amostra (3x LoD e 30x LoD por reação), em dois equipamentos de PCR em tempo real diferentes, o Applied Biosystems® 7500 FAST e o Applied Biosystems® QuantStudio 5), num total de 24 testes por equipamento e reação. Além disso, a reprodutibilidade entre instrumentos para a referência MD04903 do kit foi avaliada por um operador, testando 24 réplicas de cada amostra (3x cópias de LoD e 30x cópias de LoD por reação) em dois instrumentos de qPCR diferentes (Applied Biosystems™ 7500 e Bioer LineGene Mini S), totalizando 48 testes por amostra.

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

VARIÁVEL TESTADA		SARS-CoV-2 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3X LOD	30X LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	33,84	30,75
	Coeficiente de Variação (%)	0,61	0,19
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	33,79	30,66
	Coeficiente de Variação (%)	2,02	1,62
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	84	84
	Média Cq	33,82	30,59
	Coeficiente de Variação (%)	1,96	1,60
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	24	24
	Média Cq	33,86	30,73
	Coeficiente de Variação (%)	1,26	1,13
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	48	48
	Média Cq	33,75	30,80
	Coeficiente de Variação (%)	2,25	2,62
	% Réplicas detetadas	100	100

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

VARIÁVEL TESTADA		INFLUENZA A (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3X LOD	30X LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	34,39	31,26
	Coeficiente de Variação (%)	3,31	1,05
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	34,30	30,92
	Coeficiente de Variação (%)	2,90	1,52
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	84	84
	Média Cq	34,28	30,76
	Coeficiente de Variação (%)	2,55	1,88
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	24	24
	Média Cq	34,14	30,97
	Coeficiente de Variação (%)	1,43	0,57
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	48	48
	Média Cq	33,82	30,28
	Coeficiente de Variação (%)	3,39	3,09
	% Réplicas detetadas	100	100

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

VARIÁVEL TESTADA		INFLUENZA B (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3X LOD	30X LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	33,87	30,63
	Coeficiente de Variação (%)	1,85	1,19
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	33,75	30,23
	Coeficiente de Variação (%)	2,10	2,56
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	84	84
	Média Cq	33,73	30,23
	Coeficiente de Variação (%)	1,99	2,00
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	24	24
	Média Cq	33,70	30,34
	Coeficiente de Variação (%)	1,51	0,65
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	48	48
	Média Cq	33,59	30,01
	Coeficiente de Variação (%)	2,86	2,46
	% Réplicas detetadas	100	100

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

VARIÁVEL TESTADA		RSV (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3X LOD	30X LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	33,66	30,126
	Coeficiente de Variação (%)	1,00	0,84
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	33,24	30,05
	Coeficiente de Variação (%)	2,55	0,84
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	84	84
	Média Cq	33,50	30,26
	Coeficiente de Variação (%)	2,16	1,23
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	24	24
	Média Cq	33,32	30,18
	Coeficiente de Variação (%)	2,85	1,33
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	48	48
	Média Cq	32,67	29.83
	Coeficiente de Variação (%)	2,97	2,14
	% Réplicas detetadas	100	100

11.5. Avaliação Clínica

A avaliação do desempenho do Kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, da NZYtech ao utilizar amostras oro-nasofaríngeas foi levada a cabo em um laboratório de diagnóstico molecular externo. No total, 1516 amostras clínicas, das quais: 850 amostras negativas para quaisquer um dos vírus respiratórios em análise; 205 amostras positivas para os vírus de influenza A/B (41 amostras positivas para a estirpe H1N1, 41 amostras positivas para a estirpe H1N1 pdm09, 41 amostras positivas para a estirpe H3N2, 41 amostras positivas para o vírus Influenza B linhagem vitoria e 41 amostras positivas para Influenza B linhagem Yamagata); 293 amostras positivas para o SARS-CoV-2 (compreende o período entre maio 2021 a junho 2022, abrangendo várias Variantes de Preocupação), 168 amostras positivas para o vírus RSV (84 para o RSV-A e 84 RSV-B). Os resultados revelaram uma concordância de 99% para as amostras positivas e negativas analisadas. Além disso, foi realizada uma comparação do desempenho clínico do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR, IVD, referência MD04901 versus referência MD04903. Os dados revelaram que foram alcançados 100% de concordância de sensibilidade clínica (PPA) e 100% de concordância de especificidade clínica (NPA) para todas as amostras positivas e negativas testadas, respetivamente.

12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, 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 e N), ARN virais do Influenza A e/ou B (genes M1 e NS2, respetivamente), ARN viral RSV (gene L) e do ARN humano (gene RNase P, RP). Amplificações positivas foram observadas para os genes alvo, controlos positivos e controlos internos através dos canais Texas Red, FAM, HEX e Cy5, de acordo com os conjuntos de oligonucleótidos (*primers* e sonda).

13. Apoio Técnico

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

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

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

15. Tabela de símbolos

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 (mistura primer/sonda)
CONTROL −	Controlo negativo		

16. Declaração de Conformidade

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

Número de catálogo: MD04901, MD04902 e MD04903

Utilização: Deteção qualitativa de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e RSV

Classificação: Outros (não abrangidos pelo Anexo II ou não destinados ao auto-diagnóstico) segundo a Diretiva 98/79/CE

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038, Lisboa
Portugal

Nós, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC e do regulamento (EU) 2017/746 aplicado aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD
Diretora Técnica

17. Referências

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.

Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C.J (2022). Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the US, 1999-2018. AMA Netw Open. 5(2):e220527. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.0527.

Dhanasekaran, V., Sullivan, S., Edwards, K.M. et al. Human seasonal influenza under COVID-19 and the potential consequences of influenza lineage elimination. Nat Commun 13, 1721 (2022). https://doi.org/10.1038/s41467-022-29402-5.

Chotpitayasunondh T, Fischer TK, Heraud JM, Hurt AC, Monto AS, Osterhaus A, Shu Y, Tam J (2021). Influenza and COVID-19: what does co-existence mean? Influ Other Respir Viruses. 2021; 15: 407-412

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. 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