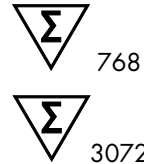


Julho 2021

Instruções de utilização (Manual) do *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro

Para utilização nos instrumentos Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM e
ABI[®] 7500 Fast Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

Índice

| | |
|--|----|
| Utilização prevista | 4 |
| Descrição e princípio | 5 |
| Informações sobre agentes patogénicos | 5 |
| Resumo e explicação | 6 |
| Materiais fornecidos | 9 |
| Conteúdo do kit | 9 |
| Componentes do kit..... | 10 |
| Plataformas e software | 11 |
| Materiais necessários, mas não fornecidos | 12 |
| Consumíveis | 12 |
| Equipamento..... | 12 |
| Avisos e precauções | 13 |
| Informações de segurança..... | 13 |
| Precauções | 14 |
| Armazenamento e manuseamento de reagentes..... | 15 |
| Transporte, armazenamento e manuseamento de espécimes..... | 15 |
| Colheita, transporte e armazenamento de amostras | 15 |
| Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no RGQ MDx 5plex HRM..... | 16 |
| Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no ABI 7500 Fast Dx | 22 |
| Resultados | 27 |

| | |
|---|----|
| Interpretação de resultados | 29 |
| Limitações | 31 |
| Desempenho | 32 |
| Sensibilidade analítica (limite de deteção)..... | 32 |
| Estudos de especificidade analítica (inclusividade e exclusividade/ reatividade cruzada) | 33 |
| Substâncias interferentes | 40 |
| Precisão | 41 |
| Desempenho clínico..... | 42 |
| Referências | 46 |
| Guia de resolução de problemas..... | 47 |
| Símbolos | 49 |
| Informações de contacto..... | 50 |
| Informações de encomenda | 51 |
| Histórico de revisões do documento..... | 52 |

Utilização prevista

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit é um teste de real-time PCR destinado à deteção qualitativa de ácido nucleico de SARS-CoV-2 em esfregaços nasofaríngeos (Nasopharyngeal Swab, NPS), esfregaços nasais e esfregaços orofaríngeos de indivíduos com sinais e sintomas de infeção ou de indivíduos sem sintomas ou outros motivos para se suspeitar de infeção por COVID-19.

Destina-se a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da COVID-19 durante a fase aguda da infeção, em combinação com observações clínicas, o historial do paciente e informações epidemiológicas.

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit destina-se a ser utilizado num ambiente de laboratório de biologia molecular por profissionais, como pessoal de laboratório clínico qualificado com formação específica em técnicas de real-time PCR e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

Resultados negativos não excluem a presença de infeção por SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como a única base para decisões de tratamento de pacientes.

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit destina-se a ser utilizado com o Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System ou o ABI 7500 Fast Dx como sistemas de real-time PCR.

Descrição e princípio

Informações sobre agentes patogénicos

Os coronavírus, um género da família *Coronaviridae*, são grandes vírus de ARN de cadeia positiva envelopados que causam doenças altamente virulentas em humanos e animais domésticos (1). Consta que os coronavírus são responsáveis por um terço das infeções por constipação comum em humanos e representam também uma causa bem conhecida de infeções respiratórias nosocomiais do trato respiratório superior em bebés prematuros (2).

Um novo membro da família dos coronavírus foi responsável por um surto de doença respiratória na cidade de Wuhan, na China (1, 3). Inicialmente denominado de novo coronavírus (2019-nCoV), o SARS-CoV-2 difere do SARS-CoV (1, 3), que foi responsável pelo surto de 2003, e do MERS-CoV, que circula no Médio Oriente desde 2012. O SARS-CoV-2 é o agente causador da COVID-19. O ARN do SARS-CoV-2 é detetável em várias amostras do trato respiratório superior (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos) durante as fases precoces e agudas da infeção (3).

Em conjunto com o historial do paciente e a epidemiologia do SARS-CoV-2, os ensaios de RT-PCR tornaram-se a norma para o diagnóstico de SARS-CoV-2. O Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) propôs combinar ensaios baseados em RT-PCR com imunoenaios para monitorizar o estado da infeção e avaliar a eficácia das medidas restritivas adotadas para controlar o surto (4, 5).

O ensaio SARS-CoV-2 Prep&Amp UM visa dois alvos genéticos virais (genes N1 e N2) detetados com o mesmo canal de fluorescência. Os dois alvos genéticos não são diferenciados e a amplificação de um ou de ambos os alvos genéticos produz um sinal de fluorescência. Resultados positivos são indicativos da presença do vírus SARS-CoV-2, mas não excluem coinfeção por outros agentes patogénicos. Por outro lado, resultados negativos de RT-PCR não excluem uma possível infeção.

Resumo e explicação

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit é um sistema pronto a utilizar com um simples passo de preparação de amostras, seguido da detecção de ARN do SARS-CoV-2 utilizando RT-PCR no sistema RGQ MDx ou em plataformas ABI 7500 Fast Dx (Figura 1). O SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 72 pares de base (pb) e 67 pb do genoma do ARN do SARS-CoV-2 e para a sua detecção direta no canal de fluorescência "Green" dos instrumentos RGQ MDx e com o filtro de fluorescência A/1 do ABI 7500 Fast Dx.

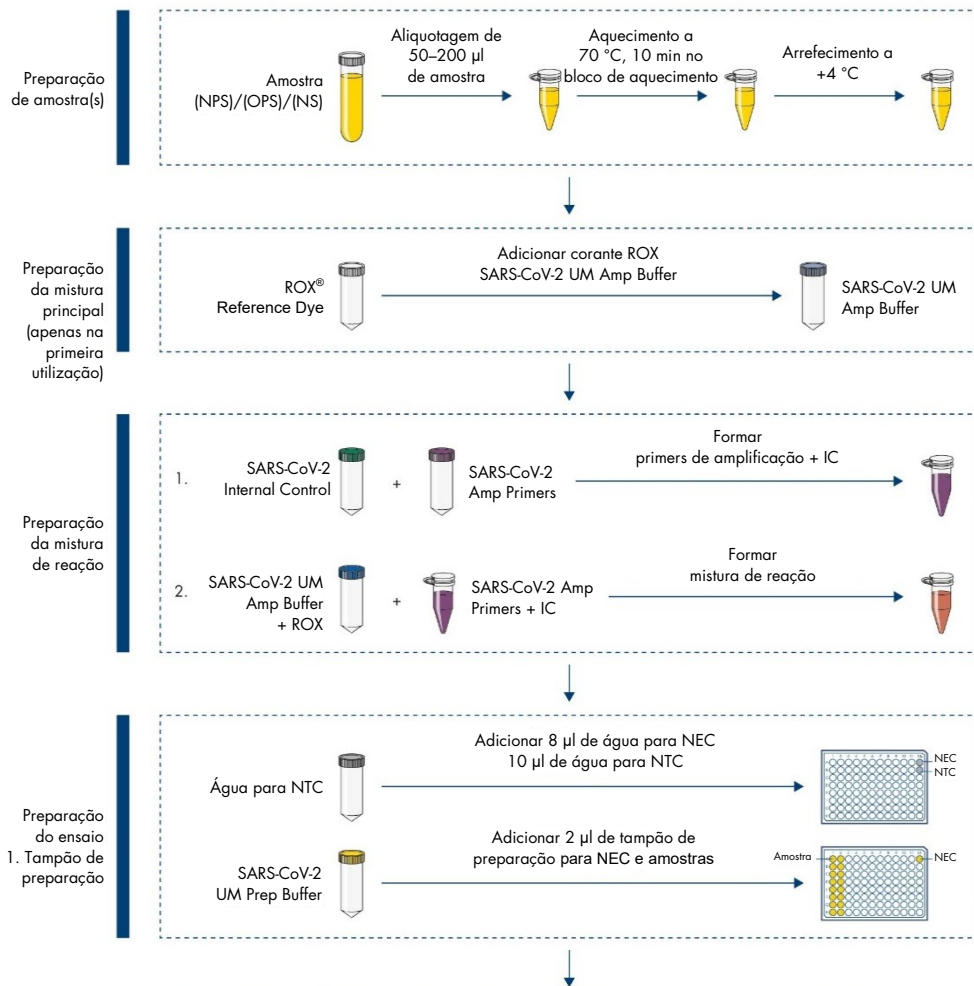
A mistura de primers e sondas do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit também contém os oligonucleotídeos necessários para amplificação da RNase P. Quando detetados no canal de fluorescência "Yellow" do instrumento RGQ MDx ou com o filtro de fluorescência B/2 do ABI 7500 Fast Dx, esses amplicons garantem a colheita de uma quantidade suficiente de amostra biológica no esfregaço. Este controlo é fundamental para assegurar a presença de amostras biológicas em amostras negativas para a SARS-CoV-2. Uma amplificação deve ser sempre detetável; caso contrário, coloca em causa a qualidade da amostra.

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit também contém um terceiro sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da RT-PCR. Tal é detetado como um controlo interno (Internal Control, IC) de ARN no canal de fluorescência "Red" dos instrumentos RGQ MDx e com o filtro de fluorescência E/5 do ABI 7500 Fast Dx. Uma vez que o controlo interno (Internal Control, IC) está incluído no SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, a sua amplificação deve ser constante, a menos que exista um inibidor da RT-PCR na amostra ou na reação de RT-PCR que atrase ou impeça a amplificação.

Os controlos externos positivos e negativos (SARS-CoV-2 Positive Control e água isenta de nuclease utilizados como controlo sem modelo [No Template Control, NTC], respetivamente) são fornecidos no *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit para comprovar o desempenho do passo de PCR. Recomenda-se vivamente a utilização de um controlo negativo de extração (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer utilizado como controlo negativo de extração [No Extraction Control, NEC]) para verificar a ausência de inibidores da RT-PCR no tampão de preparação.

No seu conjunto, a eficiência da transcrição reversa e os passos de PCR são monitorizados por estes controlos.

Fluxo de trabalho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



(continuação na página seguinte)

(continuação da página anterior)

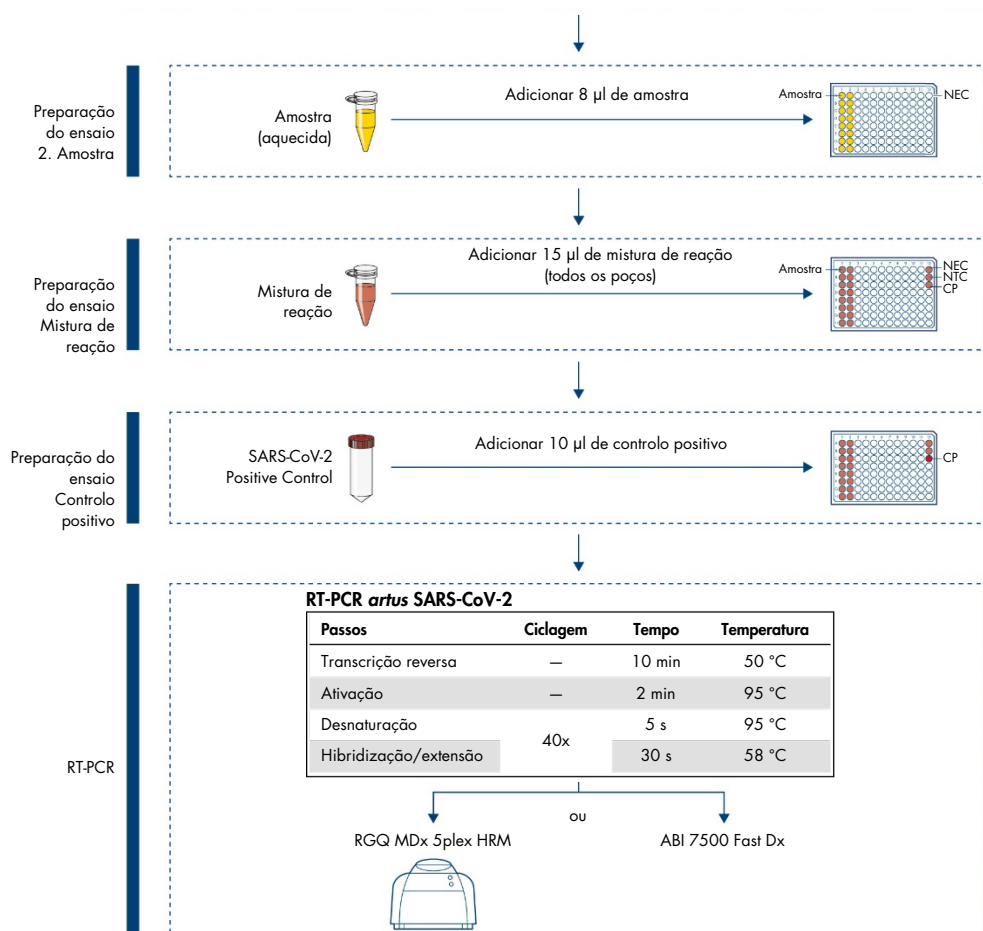


Figura 1. Fluxo de trabalho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

| artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit | | | | | |
|---|---------------------|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|
| N.º de catálogo | | | | 4511460 | 4511469 |
| Número de reações | | | | 768 | 3072 |
| Cor do tubo | Cor da tampa | Identificação | ID do tubo | Volume (µl) | Volume (µl) |
| Transparente | Amarelo | SARS-CoV-2 UM Prep Buffer | Preparation Buffer (Tampão de preparação) | 2 x 930 | 8 x 930 |
| Transparente | Azul | SARS-CoV-2 UM Amp Buffer | Master Mix (Mistura principal) | 4 x 1440 | 16 x 1440 |
| Transparente | Roxo | SARS-CoV-2 Amp Primers | Primers and Probes (Primers e sondas) | 4 x 1680 | 16 x 1680 |
| Transparente | Verde | SARS-CoV-2 Internal Control | Internal Control (Controlo interno) (IC) | 1 x 1390 | 4 x 1390 |
| Transparente | Vermelho | SARS-CoV-2 Positive Control | Positive Control (Controlo positivo) | 1 x 220 | 4 x 220 |
| Transparente | Transparente | Water for NTC (Água para NTC) | Water (Água) (No Template Control, NTC) | 1 x 1900 | 4 x 1900 |
| Transparente | Transparente | ROX Reference Dye | ROX Dye (Corante ROX) | 1 x 210 | 4 x 210 |

Componentes do kit

Reagentes

Em cada tubo, os volumes de reagente foram otimizados para 8 lotes de 96 amostras (para o kit de 768 reações) ou 32 lotes de 96 reações (para o kit de 3072 reações), incluindo um controlo positivo (Positive Control, PC), um controlo sem modelo (No Template Control, NTC) e um controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC).

É possível ensaiar um número menor ou maior de amostras, mas verificar-se-á uma subtilização de reagentes. É recomendado evitar múltiplos ciclos de congelação/descongelação. É possível proceder à aliquotagem dos reagentes para evitar múltiplos ciclos de congelação/descongelação.

Primers e sondas

Os primers e as sondas que visam as sequências de SARS-CoV-2 são baseados nos primers e nas sondas concebidos pela agência Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Controlos e calibradores

O ensaio contém 5 controlos para monitorizar a eficiência da RT-PCR.

Controlo interno (Internal Control, IC): o controlo interno é um ARN de transcrição *in vitro* de cadeia simples que verifica a presença de contaminantes que podem inibir a transcrição reversa. O controlo interno também monitoriza a eficiência da transcrição reversa no controlo sem modelo (No Template Control, NTC) e no controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC).

Controlo sem modelo (No Template Control, NTC): o controlo sem modelo é composto por água isenta de nuclease. Este é adicionado à placa de PCR para verificar a introdução de contaminantes durante a preparação da placa de PCR, o que poderia originar uma interpretação errónea dos alvos de SARS-CoV-2.

Controlo positivo (Positive Control, PC): O controlo positivo é um ADN de cadeia dupla amplificado com o SARS-CoV-2 Primers and Probes (mistura de primers e sondas). A sua deteção verifica a eficiência do reagente envolvido no passo de amplificação da PCR.

Passo de controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC): o controlo negativo de extração é composto pelo SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Este é processado em paralelo com as amostras clínicas para verificar a introdução de contaminantes durante a preparação de amostras, o que poderia originar uma interpretação errónea dos alvos de SARS-CoV-2.

Controlo de amostragem: o controlo de amostragem deteta o gene RNase P e é crucial para garantir a presença de amostras biológicas em amostras negativas para a SARS-CoV-2. A amplificação do controlo de amostragem deve ser sempre detetável; caso contrário, coloca em causa a qualidade da amostra.

Plataformas e software

Antes de utilizar os instrumentos, certifique-se de que foram objeto de manutenção e calibração de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit pode ser utilizado em dois fluxos de trabalho que exigem a utilização dos instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou ABI 7500 Fast Dx e o respetivo software:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Software Rotor-Gene Q, versão 2.3.1 ou superior
- ABI 7500 Fast Dx: Software SDS, versão 1.4.1 ou superior

Materiais necessários, mas não fornecidos

Consumíveis

- Luvas de laboratório isentas de pó talco
- Pontas de pipeta esterilizadas isentas de nuclease com filtros
- Tubos de 1,5 ml ou 2 ml isentos de PCR
- Tubos de PCR de 0,1 ml para utilização com o Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, n.º de cat. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ para utilização com a plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (placa de 96 poços Applied Biosystems, n.º de cat. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film para utilização com a plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems, n.º de cat. 4360954)

Equipamento*

- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Pipetas (ajustáveis)
- Agitador de vórtex
- Bloco de aquecimento
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n.º de cat. 9002032) com software Rotor-Gene Q, versão 2.3.1 ou superior
- Rotor-Disc 72 Rotor (n.º de cat. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (n.º de cat. 9018900)
- Bloco de carregamento de 72 poços (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n.º de cat. 9018901)
- Em alternativa: plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Thermo Fisher Scientific®, n.º de cat. 4406985), com versão do software 1.4.1 ou superior e uma centrífuga de placas de 96 poços

* Antes de utilizar os instrumentos e sempre que aplicável, certifique-se de que foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ter ocorrido em relação ao dispositivo, ao fabricante e à autoridade reguladora da área de afetação do utilizador e/ou do paciente.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a ficha de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

Utilize sempre equipamento de proteção individual adequado, incluindo, mas não se limitando a, luvas descartáveis sem pó talco, bata de laboratório e óculos de proteção. Proteja a pele, os olhos e as membranas mucosas. Troque frequentemente de luvas quando manusear amostras.

Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente perigoso. Cumpra sempre as precauções de segurança descritas nas diretrizes relevantes, tal como a diretriz *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline (M29)* do Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) ou outros documentos apropriados.

Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos. Elimine as amostras e os resíduos dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

Precauções

- Observe os procedimentos laboratoriais normais para manter a área de trabalho limpa e descontaminada. Reserve uma área com equipamento específico para manipular ARN.
- Siga as boas práticas de laboratório para minimizar o risco de contaminação cruzada.
- Tenha atenção para evitar a contaminação com RNase durante a experiência e utilize material de plástico isento de RNase.
- Certifique-se de manter uma boa rastreabilidade através de registos, em especial no que diz respeito à identificação de amostras.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes que estejam fora do prazo de validade ou que tenham sido armazenados de forma incorreta.

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit pode ser conservado a uma temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante seis meses ou até ao fim do prazo de validade.

Transporte, armazenamento e manuseamento de espécimes

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit destina-se a ser utilizado com esfregaços nasofaríngeos, nasais e orofaríngeos. Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente perigoso.

As agências Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e Public Health England forneceram orientações para colheita de amostras, manuseamento e testagem de espécimes clínicos. Para obter mais informações, consulte estas orientações ou outros protocolos de laboratórios de referência nacionais relevantes.

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Para a colheita, o armazenamento e o transporte de amostras de esfregaço, consulte as recomendações do fabricante. Os esfregaços devem ser totalmente submersos em meios de transporte de modo a preservar a integridade das amostras.

Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no RGQ MDx 5plex HRM

O presente protocolo descreve a preparação das amostras e da RT-PCR para detetar os alvos do SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte no RGQ MDx 5plex HRM.

Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes em questão são respeitados. Não utilize componentes que estejam fora do prazo de validade ou que tenham sido armazenados de forma incorreta.
- Utilize equipamento sujeito a manutenção e calibração adequadas.
- Tenha atenção para evitar a contaminação com RNase durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.

Aspetos importantes antes de iniciar o procedimento

- As amostras podem ser conservadas à temperatura ambiente durante os passos de preparação e a preparação da reação, mas é recomendado que sejam conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento.
- Antes da utilização, permita que o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, o SARS-CoV-2 Amp Primers, o SARS-CoV-2 IC, a água para NTC e o SARS-CoV-2 Positive Control descongelem completamente à temperatura ambiente (15–25 °C). Mantenha os tubos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até à sua utilização.
- Antes da utilização, homogeneíze o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer e o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer invertendo-os 2-3 vezes (não agite em vórtex) e, em seguida, aplicando uma breve rotação. Todos os restantes reagentes individuais podem ser homogeneizados através de agitação em vórtex pulsado durante 3–5 segundos ou invertendo-os 2-3 vezes e, em seguida, aplicando uma breve rotação.

- O SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inibe as RNAses presentes nas amostras clínicas para o passo de detecção, mas não é uma solução de inativação de vírus. Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente perigoso.
- Verifique se as condições de ciclagem da plataforma de qPCR são as especificadas no presente protocolo.
- É possível proceder à alíquotagem dos reagentes para evitar múltiplos ciclos de congelação/descongelação.
- Prepare a mistura de reação no momento (<2 h antes da execução da placa de RT-PCR).
- Para minimizar a contaminação, é necessário que as preparações de amostras e da RT-PCR sejam realizadas em zonas distintas.

Procedimento

1. Preparação de amostras

- 1a. Agite vigorosamente o esfregaço que contém a amostra.
- 1b. Proceda à alíquotagem de 50–200 µl de amostra em tubos de 1,5 ml isentos de PCR
- 1c. Execute o passo de aquecimento a 70 °C durante 10 minutos num bloco de aquecimento. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.

2. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.

- 2a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
- 2c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.

3. Para uma placa RGQ MDx completa (72 poços), prepare uma mistura de alíquota de SARS-CoV-2 Amp Primers com SARS-CoV-2 Internal Control.

- 3a. Transfira os volumes necessários de SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com a Tabela 1 para um novo tubo de 1,5 ml isento de PCR.

- 3b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
- 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 Amp Primers contendo IC até que a solução se deposite no fundo do tubo.

Tabela 1. Preparação da mistura SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

| Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC | | | | Número de reações |
|--|-----------------------|--------------------|----------|--|
| Reagentes | Concentração de stock | Concentração final | 1 reação | Volume (µl) |
| | | | | 72 reações (+22% de volume adicional*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 638 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 132 |
| Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total | | | 8,75 | 770 |

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 UM Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com o número de amostras a testar. Pondere a utilização de volume adicional para compensar o volume morto.

4. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 2 e misture bem.

Tabela 2. Preparação da mistura de reação

| Mistura de reação de RT-PCR | | | | Número de reações |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------|--|
| Reagentes | Concentração de stock | Concentração final | 1 reação | Volume (µl) |
| | | | | 72 reações (+20% de volume adicional*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer [†] | 4x | 1x | 6,25 | 540 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers [‡] | 2,9x | 1x | 8,75 | 756 |
| Volume de reação total | | – | 15,00 | 1296 |

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e SARS-CoV-2 Amp Primers de acordo com o número de amostras a testar. Pondere a utilização de volume adicional para compensar o volume morto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer complementado com o ROX Reference Dye.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers complementado com o SARS-CoV-2 Internal Control.

5. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no tubo de PCR atribuído ao NEC.
6. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no tubo de PCR atribuído ao NTC.
7. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada tubo de PCR atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.

8. Adicione 8 µl da amostra preparada a um tubo de PCR contendo o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
9. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 4 aos tubos dedicados a amostras e controlos (a Figura 2 é fornecida como exemplo). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes e, em seguida, feche as tampas dos tubos de PCR, à exceção do reservado como SARS-CoV-2 Positive Control.

Nota: Verifique se os tubos estão bem fechados para evitar contaminação cruzada.

10. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no tubo de PCR apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Configure o programa de RT-PCR do RGQ MDx 5plex HRM de acordo com as especificações na Tabela 3.

Nota: A aquisição de dados deve ser efetuada durante o passo de hibridização/extensão.

12. Coloque os tubos no ciclador de PCR em tempo real (a Figura 2 representa um exemplo da disposição dos tubos) e inicie o programa de ciclagem conforme descrito na Tabela 3.

Nota: Tenha o cuidado de seguir a mesma posição e a mesma ordem dos tubos desde a preparação do ensaio até aos passos do ciclador de PCR em tempo real.

Tabela 3. Programa SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

| Passos | Tempo | Temperatura (°C) | Número de ciclos | Aquisição |
|-----------------------------------|--------|------------------|------------------|--|
| Transcrição reversa | 10 min | 50 | 1 | Não |
| Ativação inicial da PCR por calor | 2 min | 95 | 1 | Não |
| Ciclagem de 2 passos | | | | |
| Desnaturação | 5 s | 95 | 40 | Não |
| Hibridização/extensão | 30 s | 58 | | Green (FAM), Yellow (HEX) e Red (Atto) |

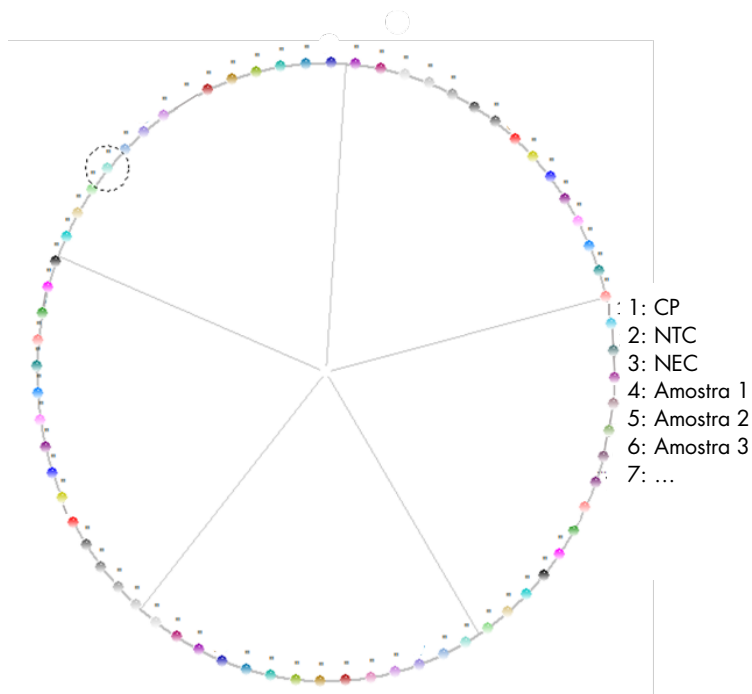


Figura 2. Exemplo da disposição dos tubos na plataforma RGQ MDx 5plex HRM

13. Clique em **Gain Optimization** (Otimização do ganho) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de novo ensaio) e abra a caixa de diálogo **Auto-Gain Optimization Setup** (Configuração da otimização do ganho automático).

14. Verifique se os canais de aquisição estão definidos conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Configuração do RGQ MDx 5plex HRM

| Nome | Posição do tubo de CP | Leitura mín. (Fl) | Leitura máx. (Fl) | Ganho mín. | Ganho máx. |
|--------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|
| Green | 1* | 5 Fl | 10 Fl | -10 | 10 |
| Yellow | 1* | 5 Fl | 10 Fl | -10 | 10 |
| Red | 1* | 5 Fl | 10 Fl | -10 | 10 |

* Nota: Isto tem de ser alterado de acordo com a posição do tubo de SARS-CoV-2 Positive Control.

15. Seleccione **Perform optimization before the first acquisition** (Efetuar otimização antes da primeira aquisição).

16. Inicie o ensaio.

17. Uma vez concluído o ensaio, analise os resultados (consulte a secção Resultados).

Protocolo: Preparação de amostras e detecção de SARS-CoV-2 no ABI 7500 Fast Dx

Este protocolo destina-se à preparação e à detecção de alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte no instrumento ABI 7500 Fast Dx qPCR.

Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes em questão são respeitados. Não utilize componentes que estejam fora do prazo de validade ou que tenham sido armazenados de forma incorreta.
- Utilize equipamento sujeito a manutenção e calibração adequadas.
- Tenha atenção para evitar a contaminação com RNase durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.
- Ao utilizar o ABI 7500 Fast Dx e antes da primeira utilização, é necessário adicionar corante ROX ao tubo de mistura principal.

Aspetos importantes antes de iniciar o procedimento

- As amostras podem ser conservadas à temperatura ambiente durante os passos de preparação e a preparação da reação, mas é recomendado que sejam conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento.
- A utilização do ABI 7500 Fast Dx requer corante ROX.
- **Os dados devem ser adquiridos com a configuração de corante passivo ROX.**
- Antes da utilização, permita que o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, o SARS-CoV-2 Amp Primers, o SARS-CoV-2 IC, a água para NTC e o SARS-CoV-2 Positive Control descongelem completamente à temperatura ambiente (15–25 °C). Mantenha os tubos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até à sua utilização.

- Antes da utilização, homogeneíze o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer e o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer invertendo-os 2-3 vezes (não agite em vórtex) e, em seguida, aplicando uma breve rotação. Todos os restantes reagentes individuais podem ser homogeneizados através de agitação em vórtex pulsado durante 3–5 segundos ou invertendo-os 2-3 vezes e, em seguida, aplicando uma breve rotação.
- O SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inibe as RNAses presentes nas amostras clínicas para o passo de deteção mas não é uma solução de inativação de vírus. Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente perigoso.
- Verifique se as condições de ciclagem da plataforma de qPCR são as especificadas no presente protocolo.
- É possível proceder à aliquotagem dos reagentes para evitar múltiplos ciclos de congelação/descongelação.
- Prepare a mistura de reação no momento (<2 h antes da execução da placa de RT-PCR).
- Para minimizar a contaminação, é necessário que as preparações de amostras e da RT-PCR sejam realizadas em zonas distintas.

Procedimento

1. Preparação de amostras

- 1a. Agite vigorosamente o esfregaço que contém amostra.
- 1b. Proceda à aliquotagem de 50–200 µl de amostra em tubos de 1,5 ml isentos de PCR.
- 1c. Execute um passo de aquecimento a 70 °C durante 10 minutos num bloco de aquecimento. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.

2. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.

- 2a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
- 2c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.

3. Para uma placa ABI 7500 Fast Dx completa (96 poços), prepare uma mistura de alíquota de SARS-CoV-2 Amp Primers com SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3a. Transfira o volume necessário de SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com a Tabela 5 para um novo tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 3b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 Amp Primers contendo IC até que a solução se deposite no fundo do tubo.

Tabela 5. Preparação da mistura SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

| Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC | | | | Número de reações Volume (µl) | |
|--|-----------------------|--------------------|----------|--|--|
| Reagentes | Concentração de stock | Concentração final | 1 reação | 96 reações (+21% de volume adicional*) | |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 841 | |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 174 | |
| Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total | | | 8,75 | 1015 | |

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 UM Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com o número de amostras a testar. Pondere a utilização de volume adicional para compensar o volume morto.

4. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 6 e misture bem.

Tabela 6. Preparação da mistura de reação

| Mistura de reação de RT-PCR | | | | Número de reações Volume (µl) | |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------|--|--|
| Reagentes | Concentração de stock | Concentração final | 1 reação | 96 reações (+20% de volume adicional*) | |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer [†] | 4x | 1x | 6,25 | 720 | |
| SARS-CoV-2 Amp Primers [‡] | 2,9x | 1x | 8,75 | 1008 | |
| Volume de reação total | | – | 15,00 | 1728 | |

* **Nota:** Ajuste o volume de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e SARS-CoV-2 Amp Primers de acordo com o número de amostras a testar. Pondere a utilização de volume adicional para compensar o volume morto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer complementado com o ROX Reference Dye

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers complementado com o SARS-CoV-2 Internal Control

5. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NEC.
6. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NTC.
7. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada poço atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.
8. Adicione 8 µl da amostra preparada a um poço contendo o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
9. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 4 aos poços dedicados a amostras e controlos (consulte o exemplo na Figura 3). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
10. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no poço apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Vede bem a placa de PCR para evitar contaminação cruzada. Certifique-se de que aplica pressão uniformemente em toda a placa para obter uma boa estanqueidade em todos os poços.
12. Centrifugue brevemente a placa de PCR para recolher líquido no fundo dos poços.
13. Configure o programa de RT-PCR para o modo de ensaio "Standard 7500" do ABI 7500 Fast Dx de acordo com a Tabela 7.
Nota: A aquisição de dados deve ser efetuada durante o passo de hibridização/extensão.
Nota: Consulte as *Instruções de utilização do ABI 7500 Fast Dx* para obter mais informações.
14. Coloque a placa no ciclador de PCR em tempo real (a Figura 3 representa um exemplo da disposição da placa de PCR) e inicie o programa de ciclagem conforme descrito na Tabela 7.
15. Seleccione os poços utilizados e aplique os corantes repórter FAM, VIC e Cy5. Os dados devem ser adquiridos com o corante passivo ROX **ativado**.
16. Verifique se a curva-padrão do ABI 7500 Fast Dx está configurada para Absolute Quantitation (Quantificação absoluta).
17. Inicie o ensaio.

18. Uma vez concluído o ensaio, analise os resultados (consulte a secção Resultados).

Tabela 7. Programa SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

| Passos | Tempo | Temperatura (°C) | Número de ciclos | Aquisição |
|-----------------------------------|--------|------------------|------------------|---------------------------------------|
| Transcrição reversa | 10 min | 50 | 1 | Não |
| Ativação inicial da PCR por calor | 2 min | 95 | 1 | Não |
| Ciclagem de 2 passos | | | | |
| Desnaturação | 5 s | 95 | 40 | Não |
| Hibridização/extensão | 30 s | 58 | | Green (FAM), Yellow (VIC) e Red (Cy5) |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | PC | | | | | | | | | | | |
| B | NTC | | | | | | | | | | | |
| C | NEC | | | | | | | | | | | |
| D | Sample 1 | | | | | | | | | | | |
| E | Sample 2 | | | | | | | | | | | |
| F | Sample 3 | | | | | | | | | | | |
| G | ... | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figura 3. Exemplo da disposição das placas no ABI 7500 Fast Dx

Resultados

No RGQ MDx 5plex HRM, os dados são analisados com o software Rotor-Gene Q, versão 2.3.1 (ou superior) de acordo com as instruções do fabricante (Manual do utilizador do Rotor-Gene Q MDx, revisão 7, setembro de 2018). Para que haja consistência entre as diferentes análises, são necessários os seguintes parâmetros de análise (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros de análise para o RGQ MDx 5plex HRM

| Canais | Green | Red | Yellow |
|---|--|-------|--|
| Limiar de fluorescência | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Correção de declive | Sim | Sim | Sim |
| Tubo dinâmico | Sim | Sim | Sim |
| Ponto de remoção | Não | 10–20 | 10–20 |
| Remoção de valores atípicos: Limiar de eficiência da reação | Sim Ativado 0% | Não | Não |
| Ciclos de início eliminados | 5 | 5 | 5 |
| Ciclos de cut-off | Ct >38,00 é considerado como 40,00 | Não | Ct >35,00 é considerado como 40,00 |

No software do RGQ, os resultados dos ensaios estão disponíveis na grelha de resultados de quantificação aberta durante a análise. Os dados de amostras selecionadas são resumidos na tabela e podem ser exportados como um ficheiro Excel® clicando com o botão direito do rato na grelha e selecionando **Export to Excel** (Exportar para Excel). Antes de exportar os resultados, certifique-se de selecionar todas as amostras.

No ABI, os dados são analisados com o sistema 7500 Fast System, versão de software 1.4.1 (ou superior), de acordo com as instruções do fabricante. Para que haja consistência entre as diferentes análises, são necessários os seguintes parâmetros (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros de análise para o ABI 7500 Fast Dx

| Canais | FAM* | VIC/HEX* | Cy5/Atto* |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Corante passivo | ROX | ROX | ROX |
| Limiar de fluorescência | 0,13 | 0,05 | 0,025 |
| Linha de base definida | Auto | Auto | Auto |
| Ciclos de cut-off | Ct >39,00 é considerado como 40,00 | Não | Ct >35,00 é considerado como 40,00 |

* FAM = filtro A/1 na plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 na plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 na plataforma ABI

No software ABI SDS, os valores Ct de um grupo selecionado de poços ou da placa inteira estão disponíveis na folha **Report** (Relatório) da secção principal de **Results** (Resultados). Os dados podem ser exportados em formato de texto de valores separados por vírgulas (.csv) (recomendado): Na janela do software SDS, selecione **File** (Ficheiro) > **Export** (Exportar) > **Results** (Resultados) (o item de menu **Ct** também pode ser selecionado). Selecione o formato do ficheiro exportado como .csv.

Interpretação de resultados

O controlo positivo (Positive Control, PC) e os genes N1 e N2 são detetados no canal de fluorescência Green com o RGQ MDx 5plex HRM (ou no canal fluorescente FAM no ABI).

O controlo de amostragem, composto por RNAse P, é detetado no canal de fluorescência Yellow com o RGQ MDx 5plex HRM (ou no canal de fluorescência VIC/HEX no ABI). Todas as amostras clínicas devem apresentar uma amplificação de controlo de amostragem. No CP, é possível observar-se uma amplificação amarela, apesar da ausência de sequências humanas. Neste caso, é possível ignorar um sinal no canal amarelo do CP, dado que o forte sinal de fluorescência no canal verde é suscetível de contaminar o canal amarelo.

O controlo interno (Internal Control, IC) está incluído no SARS-CoV-2 Amp Primers. É detetado no controlo sem modelo (No Template Control, NTC), no controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC), no controlo positivo (Positive Control, PC) e nas amostras clínicas com o canal de fluorescência Red com o RGQ MDx 5plex HRM (ou no canal de fluorescência Cy5/Atto no ABI).

Para validar os ensaios de RT-PCR, é necessário amplificar e detetar os controlos CP, NTC e NEC conforme o previsto.

Tabela 10. Critérios de validação de ensaios e interpretação de resultados para o RGQ MDx 5plex HRM

| Controlo | Deteção no canal Green | Deteção no canal Yellow | Deteção no canal Red | Interpretação |
|---|---|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| Controlo positivo (Positive Control, PC) | Ct ≤ 38,00 | Indiferente | Indiferente | O ensaio é validado. |
| | Ct > 38,00 ou sem Ct | Indiferente | Indiferente | O ensaio não é validado. |
| Controlo sem modelo (No Template Control, NTC) ou | Ct > 38,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Sim | O ensaio é validado. |
| Controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC) | Quaisquer outras combinações com amplificação no canal verde ou amarelo | | Indiferente | O ensaio não é validado. |

Tabela 11. Critérios de validação de ensaios e interpretação de resultados para o ABI 7500 Fast Dx

| Controlo | Deteção no corante FAM* | Deteção no corante VIC/HEX* | Deteção no corante Cy5/Atto* | Interpretação |
|---|---|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Controlo positivo (Positive Control, PC) | Ct ≤ 39,00 | Indiferente | Indiferente | ○ ensaio é validado. |
| | Ct > 39,00 ou sem Ct | Indiferente | Indiferente | ○ ensaio não é validado. |
| Controlo sem modelo (No Template Control, NTC) ou Controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC) | Ct > 39,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Sim | ○ ensaio é validado. |
| | Quaisquer outras combinações com amplificação em FAM ou VIC/HEX | | Indiferente | ○ ensaio não é validado. |

* FAM = filtro A/1 na plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 na plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 na plataforma ABI

Para validar as amostras testadas, as amostras devem ser amplificadas e detetadas conforme o previsto.

Tabela 12. Critérios de validação de amostras e interpretação de resultados para o RGQ MDx 5plex HRM

| Deteção no canal Green | Deteção no canal Yellow | Deteção no canal Red | Interpretação |
|------------------------|-------------------------|----------------------|---|
| Ct ≤ 38,00 | Indiferente | Indiferente | A amostra é positiva para ARN de SARS-CoV-2. |
| Ct > 38,00 ou sem Ct | Ct ≤ 35,00 | Indiferente | A amostra é negativa, ARN de SARS-CoV-2 não detetado. |
| Ct > 38,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Sim | Amostra inválida. Não foi detetado material humano ou este é insuficiente. É necessário repetir a amostragem. |
| Ct > 38,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Não | Amostra inválida. A reação de RT-qPCR é inibida. É necessário repetir o teste. |

Tabela 13. Critérios de validação de amostras e interpretação de resultados para o ABI 7500 Fast Dx

| Deteção no corante FAM* | Deteção no corante VIC/HEX* | Deteção no corante Cy5/Atto* | Interpretação |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
| Ct ≤ 39,00 | Indiferente | Indiferente | A amostra é positiva. |
| Ct > 39,00 ou sem Ct | Ct ≤ 35,00 | Indiferente | A amostra é negativa, SARS-CoV-2 não detetado. |
| Ct > 39,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Sim | Amostra inválida. Não foi detetado material humano. É necessário repetir a amostragem. |
| Ct > 39,00 ou sem Ct | Ct > 35,00 ou sem Ct | Não | Amostra inválida. A reação de RT-qPCR é inibida. É necessário repetir o teste. |

* FAM = filtro A/1 na plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 na plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 na plataforma ABI

Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Os resultados do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit não se destinam a ser utilizados como a única base para diagnóstico, tratamento ou outras decisões de tratamento de pacientes. Resultados negativos não excluem a presença de infecção por SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como a única base para decisões de tratamento de pacientes.
- O produto deve ser utilizado por pessoal com formação específica em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e devidamente instruído para o efeito.
- Para a obtenção de resultados ótimos de PCR, é necessário que o manual do utilizador da plataforma de qPCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx ou ABI 7500 Fast Dx) seja rigorosamente observado.
- Deverá ser dada atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade.

Desempenho

Sensibilidade analítica (limite de detecção)

A sensibilidade analítica (ou limite de detecção) é definida como a menor concentração na qual $\geq 95\%$ das amostras analisadas geram um resultado positivo.

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD) foi aferido através da análise de diluições em série de amostras nasofaríngeas negativas preparadas com stocks de alta titulação de partículas virais inativadas obtidos de fornecedores comerciais (ZeptoMetrix®). Para confirmar a concentração de limite de detecção (Limit of Detection, LoD) estabelecida, a taxa de detecção de todas as réplicas deve ser $\geq 95\%$ (pelo menos 19/20 réplicas devem gerar um sinal positivo). A concentração de limite de detecção (Limit of Detection, LoD) foi confirmada em ambas as plataformas de real-time PCR declaradas utilizando dois lotes diferentes de reagentes.

O limite de detecção declarado de ambas as plataformas de real-time PCR para o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit é de 950 cp/ml.

Estudos de especificidade analítica (inclusividade e exclusividade/reatividade cruzada)

Inclusividade

A inclusividade do *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes foi aferida através de uma análise *in silico* em sequências disponíveis na base de dados GISAID (www.gisaid.org). Foi analisado um total de 722 488 sequências (disponíveis a 23/03/2021) no site COVID CG (<https://covidcg.org>), alimentado por metadados do GISAID. As sequências foram alinhadas com a sequência de referência WIV04 (100% idêntica à Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, à exceção do comprimento da cauda poli-A), e as variantes de nucleótido simples (Single Nucleotide Variation, SNV) foram analisadas na região genômica visada pelos primers e pelas sondas do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. A prevalência das variantes de nucleótido simples (Single Nucleotide Variation, SNV) identificadas manteve-se abaixo de 1%, bem como a frequência das mutações coocorrentes. Não se identificou qualquer variante de nucleótido simples (Single Nucleotide Variation, SNV) localizada nos últimos 1 a 3 nucleótidos da extremidade 3' nos respectivos oligonucleotídeos, o que se esperaria ter afetado o desempenho. O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit possui a capacidade de detectar 100% das sequências publicadas.

Exclusividade/reação cruzada

Análise *in silico*

A exclusividade do *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes foi aferida através de uma análise *in silico* em sequências armazenadas na base de dados do NCBI. A análise *in silico* revelou que alguns dos agentes patogênicos testados têm mais de 80% de homologia com um dos primers ou sondas do *artus* SARS-CoV-2. Entre estes, encontram-se *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou menos de 80% de homologia com um dos primers/sondas do ensaio de SARS-CoV-2. No entanto, o *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes não revelou qualquer possível amplificação com as diferentes sequências armazenadas na base de dados de proteínas/nucleótidos não redundantes do NCBI.

Foi analisado um total de 36 estirpes bacterianas, víricas e fúngicas por PCR *in silico* com um potencial tamanho de amplicon limitado a 500 pb. Foram recolhidas sequências de agentes patogênicos da base de dados do NCBI; contudo, nenhum destes agentes patogênicos sofreu amplificação *in silico*.

Tabela 14. Lista de agentes patogênicos testados *in silico*.

| Agentes patogênicos | Estirpe/tipo | ID de taxonomia | Resultados de PCR <i>in silico</i> |
|-------------------------------|---------------------|------------------------|---|
| <i>Adenovirus Tipo 3</i> | Tipo 3 | 45659 | Sem correspondência |
| <i>Adenovirus Tipo 4</i> | Tipo 4 | 28280 | Sem correspondência |
| <i>Adenovirus Tipo 5</i> | Tipo 5 | 28285 | Sem correspondência |
| <i>Adenovirus Tipo 7A</i> | Tipo 7A | 85755 | Sem correspondência |
| <i>Adenovirus Tipo 14</i> | Tipo 14 | 10521 | Sem correspondência |
| <i>Adenovirus Tipo 31</i> | Tipo 31 | 10529 | Sem correspondência |
| <i>Bordetella pertussis</i> | A639 | 520 | Sem correspondência |
| <i>Candida albicans</i> | Z006 SC5314 | 5476 | Sem amplificação possível*† |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | CWL-029 TW-183 | 115713 | Sem correspondência |
| Enterovirus | Tipo 68 | 42789 | Sem correspondência |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | KW20 | 727 | Sem correspondência |
| Coronavírus humano | 229E | 11137 | Sem correspondência |
| Coronavírus humano | NL63 | 277944 | Sem correspondência |
| Coronavírus humano | HKU-1 | 290028 | Sem correspondência |
| Coronavírus humano OC43 | OC43 | 31631 | Sem correspondência |
| Coronavírus humano | MERS-CoV | 1335626 | Sem correspondência |
| Metapneumovirus humano | n/a | 162145 | Sem correspondência |
| Influenza A | H1N1 | 114727 | Sem correspondência |
| Influenza A | H3N2 | 119210 | Sem correspondência |
| Influenza B | n/a | 11520 | Sem correspondência |

* Correspondência de sequência com um dos primers/sondas apresentou <80% de homologia.

† Correspondência de sequência com um dos primers/sondas apresentou ≥80% de homologia.

(continuação na página seguinte)

Tabela 14 (continuação da página anterior)

| Agentes patogênicos | Estirpe/tipo | ID de taxonomia | Resultados de PCR <i>in silico</i> |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | M129 FH | 272634 | Sem correspondência |
| Vírus parainfluenza | Tipo 1 | 12730 | Sem correspondência |
| Vírus parainfluenza | Tipo 2 | 2560525 | Sem correspondência |
| Vírus parainfluenza | Tipo 3 | 11216 | Sem correspondência |
| Vírus parainfluenza | Tipo 4 | 2560526 | Sem correspondência |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | RU7 | 42068 | Sem correspondência |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | PAO1 | 287 | Sem amplificação possível* |
| Vírus sincicial respiratório | Tipo A (RSV A) | 208893 | Sem correspondência |
| Vírus sincicial respiratório | Tipo B (RSV B) | 208895 | Sem correspondência |
| Rinovírus | Tipo A | 147711 | Sem correspondência |
| Rinovírus | Tipo B | 147712 | Sem correspondência |
| Coronavírus SARS | Tor2 | 694009 | Sem amplificação possível† |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | n/a | 1282 | Sem correspondência |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | n/a | 1314 | Sem amplificação possível† |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3 | 1304 | Sem amplificação possível† |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC 700669 NCTC11032 | 1313 | Sem correspondência |

* Correspondência de sequência com um dos primers/sondas apresentou <80% de homologia.

† Correspondência de sequência com um dos primers/sondas apresentou ≥80% de homologia.

Análise *in vitro*

A reatividade cruzada foi verificada *in vitro* com agentes patogênicos que apresentavam ≥80% de homologia com o SARS-CoV-2 Amp Primers na análise *in silico*. Foram preparadas amostras através da adição de organismos com potencial de reação cruzada à matriz de esfregaço nasofaríngeo a 10⁶ cp/ml, exceto para SARS-CoV-1, que foi testado não diluído de acordo com as recomendações do fabricante. Nenhum destes agentes patogênicos apresentou reatividade cruzada *in vitro*.

A interferência microbiana do ensaio *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit foi aferida *in vitro* num painel de agentes patogénicos recomendados. Foram preparadas amostras através da adição de um máximo de cinco agentes patogénicos — a 105 TCID50/ml para alvos virais, 10⁶ cp/ml para alvos bacterianos e fúngicos ou à máxima concentração possível com base na concentração de stock — a esfregaços nasofaríngeos negativos enriquecidos com partículas de SARS-CoV-2 inativadas (Zeptomatrix) a 2,87 x limite de deteção (Limit of Detection, LoD). Os painéis NATrol™ e o SARS-CoV-1 foram enriquecidos diretamente com partículas de SARS-CoV-2 inativadas (Zeptomatrix) a 2,87 x limite de deteção (Limit of Detection, LoD). Os resultados para cada pool de microrganismos testado e as respetivas concentrações estão resumidos abaixo.

Tabela 15. Lista de agentes patogénicos testados *in vitro* em interferência microbiana.

| ID do pool/ID da amostra | Microrganismo | Origem | Concentração final | Unidade | Resultado |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------|-------------------|
| Pool 1 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.72E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Coronavírus humano 229E | Zeptomatrix (0810229CFHI) | 1.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Coronavírus humano OC43 | Zeptomatrix (0810024CFHI) | 5.86E+04 | TCID50/ml | |
| | Coronavírus humano NL63 | Zeptomatrix (0810228CFHI) | 2.84E+04 | TCID50/ml | |
| | Adenovírus T3 | Zeptomatrix (0810016CFHI) | 1.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Vírus parainfluenza 1 | Zeptomatrix (0810014CFHI) | 9.14E+06 | TCID50/ml | |
| Pool 2 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.72E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Adenovírus T31 | Zeptomatrix (0810073CFHI) | 1.67E+04 | TCID50/ml | |
| | Vírus parainfluenza 2 | Zeptomatrix (0810015CFHI) | 4.29E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenza B Florida/02/2006 | Zeptomatrix (0810037CFHI) | 1.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Rinovírus T 1A | Zeptomatrix (0810012CFNHI) | 2.86E+04 | TCID50/ml | |

(continuação na página seguinte)

Tabela 15 (continuação da página anterior)

| ID do pool/ID da amostra | Microorganismo | Origem | Concentração final | Unidade | Resultado |
|--------------------------|---|---------------------------------|--------------------|-----------|-------------------|
| Pool 3 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.72E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Vírus parainfluenza T3 | Zeptomatrix (0810016CFHI) | 1.43E+07 | TCID50/ml | |
| | <i>Haemophilus influenzae</i> | ATCC (51907D-5) | 1.00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC (700669DQ) | 3.30E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Candida albicans</i> | Zeptomatrix (0801504DNA) | 1.00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC (12228DQ) | 4.60E+06 | CFU/ml | |
| Pool 4 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Adenovírus T7A | Zeptomatrix (0810021CFHI) | 1.02E+06 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | ATCC (700294DQ) | 1.00E+07 | CFU/ml | |
| | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Zeptomatrix (0801579DNA) | 1.00E+08 | CFU/ml | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC (47085DQ) | 1.00E+07 | CFU/ml | |
| Pool 5 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.72E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Vírus sincicial respiratório RSA | Zeptomatrix (0810482CFHI) | 7.14E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenza A H1N1 Califórnia | Zeptomatrix (0810165CFHI) | 1.43E+04 | TCID50/ml | |
| | Grupo principal de enterovírus tipo 68 | Zeptomatrix (0810300CFHI) | 1.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Adenovírus T14 | Zeptomatrix (0810108CFHI) | 2.86E+04 | TCID50/ml | |
| Pool 6 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Coronavírus MERS | Zeptomatrix (0810575CFHI) | 1.43E+04 | TCID50/ml | |
| | Adenovírus T4 | Zeptomatrix (0810070CFHI) | 1.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Metapneumovírus humano (Human Metapneumovirus, hMPV) tipo B | Zeptomatrix (0810156CFHI) | 7.14E+03 | TCID50/ml | |
| | Vírus sincicial respiratório tipo B (RSV-B) | Zeptomatrix (0810040CFHI) | 1.43E+03 | TCID50/ml | |

(continuação na página seguinte)

Tabela 15 (continuação da página anterior)

| ID do pool/ID da amostra | Microorganismo | Origem | Concentração final | Unidade | Resultado |
|--------------------------|---|---------------------------------|--------------------|-----------|-------------------|
| Pool 7 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | Adenovírus T5 | Zeptomatrix (0810020CFHI) | 6.43E+05 | TCID50/ml | |
| | Vírus parainfluenza 4B | Zeptomatrix (0810060BCFHI) | 7.14E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenza A H3N2 Switzerland/9715293/13 | Zeptomatrix (0810511CFHI) | 2.86E+04 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> | Zeptomatrix (BAA-1024D-5) | 1.00E+06 | CFU/ml | |
| Pool 8 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | NATrol Panel RP1 – Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/2009), Rinovírus (tipo 1A), Adenovírus T3, Parainfluenza T1, Vírus parainfluenza T4, Metapneumovírus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (tipo A1) | Zeptomatrix (MDZ001) | Desconhecido* | N/A | |
| Pool 9 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | NATrol Panel RP2 – Influenza A H1 (New Caledonia/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenza T2, Parainfluenza T3, Coronavírus HKU recombinante, Coronavírus (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639) | Zeptomatrix (MDZ001) | Desconhecido* | N/A | |
| Pool 10 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2.73E+03 | cp/ml | Sem interferência |
| | SARS-CoV-1 | Zeptomatrix (NATSARS-ST) | Desconhecido* | N/A | |

* Concentração não comunicada pelo fabricante.

Substâncias interferentes

Aferiu-se o efeito de substâncias interferentes putativas (para as substâncias indicadas na Tabela 16) sobre o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Foram realizados testes em 3 pools de esfregaços nasofaríngeos negativos e em 3 pools de esfregaços nasofaríngeos positivos enriquecidos com partículas virais de SARS-CoV-2 inativadas (Zeptomatrix) a 4 x limite de detecção (Limit of Detection, LoD). As experiências foram realizadas na plataforma RGQ MDx 5plex HRM (em quatro instrumentos) por um operador com um kit piloto.

Cada pool foi dividido em dois para testar a substância interferente dissolvida num solvente (amostra de teste) ou apenas o solvente (amostra de controlo). As taxas de incidência nos canais de fluorescência verde e vermelho foram comparadas entre o teste e as suas amostras de controlo correspondentes. Na ausência de interferência, o teste e as suas respetivas amostras de controlo apresentam a mesma taxa de incidência.

A Tabela 16 mostra que nenhuma das substâncias testadas interfere com o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit no canal de fluorescência verde.

Tabela 16. Lista de substâncias interferentes.

| Substâncias interferentes | Função | Concentração testada | Resultados em esfregaço nasofaríngeo negativo | Resultados em esfregaço nasofaríngeo positivo (4x limite de detecção [Limit of Detection, LoD]) |
|---|------------------------------|----------------------|---|---|
| Tobramicina | Antibiótico sistémico | 1 mg/ml | Sem interferência 0/15 | Sem interferência 0/15 |
| Mupirocina | Pomada nasal antibiótica | 6,6 mg/ml | Sem interferência 0/15 | Sem interferência 0/15 |
| Fluticasona | Corticosteroide nasal | 5% (v/v) | Sem interferência 0/15 | Sem interferência 0/15 |
| Mentol (pastilhas para a garganta) | Anestésico e analgésico oral | 0,5 mg/ml | Sem interferência 0/15 | Sem interferência 0/15 |

(continuação na página seguinte)

Tabela 16. (continuação da página anterior)

| Substâncias interferentes | Função | Concentração testada | Resultados em esfregaço nasofaríngeo negativo | Resultados em esfregaço nasofaríngeo positivo (4x limite de detecção [Limit of Detection, LoD]) |
|---|--------------------|----------------------|---|---|
| Oximetazolina | Pulverizador nasal | 10% (v/v) | Sem interferência (0/15) | Sem interferência (0/15) |
| Oseltamivir | Fármaco antiviral | 3,3 mg/ml | Sem interferência (0/15) | Sem interferência (0/15) |
| Mucina (glândula submandibular bovina, tipo I-S) | | 2,5 mg/ml | Sem interferência (0/15) | Sem interferência (0/15) |
| Sangue total | | 4% (v/v) | Sem interferência (1/15*) | Sem interferência (0/15) |

* Foi detetada uma amplificação correspondente a um artefacto.

Precisão

O estudo de precisão avaliou a reprodutibilidade (a mesma amostra é repetida em ensaios e condições diferentes: 5 dias, 3 lotes de kits, 3 operadores e 2 instrumentos) e a repetibilidade (a mesma amostra é repetida no mesmo ensaio e condição). Foram realizados testes em amostras nasofaríngeas negativas e em amostras nasofaríngeas negativas enriquecidas a 5 x limite de detecção (Limit of Detection, LoD) no RGQ MDx.

Para cada nível de diluição, foram recolhidos 204 pontos de dados. Os dados de repetibilidade e reprodutibilidade foram utilizados para determinar o desvio padrão (Standard Deviation, SD) e o coeficiente de variação (Coefficient of Variation, %CV) dos alvos de SARS-CoV-2 nos canais verde, amarelo e vermelho. A Tabela 17 mostra que o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit tem uma precisão geral de 0,63 SD (2,03% CV) no canal verde, 0,54 SD (2,22% CV) no canal amarelo e de 1,28 SD (4,10% CV) no canal vermelho.

Tabela 17. Desvio padrão e coeficiente de variação do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

| Amostras e canal de detecção | Total | Entre dias | Entre lotes | Entre operadores | Entre instrumentos | Entre ensaios | No ensaio |
|---|--------|------------|-------------|------------------|--------------------|---------------|-----------|
| Desvio padrão (Standard Deviation, SD) (Coeficiente de variação [Coefficient of Variation, %CV]) | | | | | | | |
| NPS negativo | 0,54 | 0,09 | 0,10 | 0,06 | 0,11 | 0,09 | 0,50 |
| Canal Yellow | (2,22) | (0,37) | (0,42) | (0,27) | (0,47) | (0,36) | (2,05) |
| NPS negativo | 1,15 | 0,0 | 0,55 | 0,00 | 0,12 | 0,39 | 0,92 |
| Canal Red | (3,68) | (0,00) | (1,76) | (0,00) | (0,40) | (1,26) | (2,96) |
| NPS enriquecido | 0,63 | 0,18 | 0,31 | 0,00 | 0,08 | 0,00 | 0,51 |
| Canal Green | (2,03) | (0,59) | (1,00) | (0,00) | (0,25) | (0,00) | (1,64) |
| NPS enriquecido | 0,47 | 0,13 | 0,24 | 0,05 | 0,18 | 0,00 | 0,33 |
| Canal Yellow | (1,93) | (0,53) | (0,98) | (0,20) | (0,73) | (0,00) | (1,38) |
| NPS enriquecido | 1,28 | 0,12 | 0,58 | 0,11 | 0,00 | 0,49 | 1,02 |
| Canal Red | (4,10) | (0,37) | (1,84) | (0,34) | (0,00) | (1,57) | (3,27) |

Desempenho clínico

O desempenho clínico do ensaio *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp foi aferido utilizando espécimes de esfregaço nasofaríngeo retrospectivos em meio de transporte, consistindo em:

- 98 espécimes negativos para ARN de SARS-CoV-2
- 52 espécimes positivos para ARN de SARS-CoV-2

Todas as amostras foram colhidas de pacientes com sinais e sintomas de infecção por COVID-19 e foram armazenadas congeladas até à sua utilização.

A validação clínica foi realizada no ABI 7500 Fast Dx. A Tabela 18 compara o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit com um método de referência, o que é expresso como concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) e concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabela 18. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit comparado a um método de referência

| Tipo de amostra | N | % de positivos | IC de 95% | % de negativos | IC de 95% |
|-----------------|----|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Positivos | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9–99,7 | 5,1 (5/98) | |
| Negativos | 98 | 1,9 (1/52) | | 94,9 (93/98) | 88,7–97,8 |

Os resultados discordantes foram aferidos através de um terceiro método e reanalisados com uma tabela de contingência. Os resultados gerais do desempenho clínico são expressos como concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) e concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) e são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

| Tipo de amostra | N | % de positivos | IC de 95% | % de negativos | IC de 95% |
|-----------------|----|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Positivos | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9–99,7 | 5,1 (5/98) | |
| Negativos | 98 | 1,9 (1/52) | | 94,9 (93/98) | 88,7–97,8 |

Segue-se a fração de amostras em concordância e em concordância na percentagem de positivos e negativos ([Positive Percent Agreement], PPA e [Negative Percent Agreement], NPA, respetivamente) com os estados esperados das amostras:

Concordância na percentagem de positivos

(Positive Percent Agreement, PPA%): $51/52 = 98,1\%$ (IC 95%: 89,9%–99,7%)

Concordância na percentagem de negativos

(Negative Percent Agreement, NPA%): $93/98 = 94,9\%$ (IC 95%: 88,6%–97,8%)

Desempenho clínico incluindo indivíduos assintomáticos

O desempenho clínico do ensaio *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp foi aferido utilizando espécimes de esfregaço nasofaríngeo retrospectivos em meio de transporte, consistindo em:

- 100 espécimes negativos para ARN de SARS-CoV-2
- 53 espécimes positivos para ARN de SARS-CoV-2

Todos os espécimes foram colhidos de indivíduos sem sintomas ou outros motivos para se suspeitar de infecção por COVID-19.

A validação clínica foi realizada no ABI 7500 Fast Dx. Dezasseis amostras foram excluídas da análise após a testagem com o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit devido a um estado inválido, de acordo com os critérios de validação de amostras (Tabela 13).

A Tabela 20 compara o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit com um método de referência, o que é expresso como concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) e concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabela 20. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit comparado a um método de referência

| Tipo de amostra | N | % de positivos | IC de 95% | % de negativos | IC de 95% |
|-----------------|----|-----------------|-----------|------------------|-----------|
| Positivos | 50 | 64,0 (32/50) | 50,1–75,9 | 1,15 (1/87) | – |
| Negativos | 87 | 36,0 (18/50) | – | 98,85 (86/87) | 93,8–99,8 |

Foram aferidos dezanove resultados discordantes através de um terceiro método e reanalisados com uma tabela de contingência. Os resultados gerais do desempenho clínico são expressos como concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) e concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) e são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

| Tipo de amostra | N | % de positivos | IC de 95% | % de negativos | IC de 95% |
|-----------------|-----|------------------|------------|--------------------|-----------|
| Positivos | 32 | 100,0 (32/32) | 89,3–100,0 | 0,95 (1/105) | – |
| Negativos | 105 | – | – | 99,05 (104/105) | 94,8–99,8 |

Dezoito amostras falso-negativas foram reclassificadas como verdadeiras negativas, enquanto a amostra falso-positiva permaneceu falso-positiva.

Segue-se a fração de amostras em concordância e em concordância na percentagem de positivos e negativos ([Positive Percent Agreement], PPA e [Negative Percent Agreement], NPA, respetivamente) com os estados esperados das amostras:

Concordância na percentagem de positivos

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (IC 95%: 89,3%–100,0%)

Concordância na percentagem de negativos

(Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = 99,05\%$ (IC 95%: 94,8%–99,8%)

Referências

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de assistência técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Comentários e sugestões

Sinal verde fraco ou ausente (FAM) no controlo positivo (Positive Control, PC)

- | | |
|---|---|
| a) O canal de fluorescência selecionado para análise de dados de RT-PCR não respeita o protocolo. | Para a análise de dados, selecione o canal de fluorescência FAM (verde) para os alvos de RT-PCR analíticos de SARS-CoV-2, o canal de fluorescência HEX/VIC/JOE (amarelo) para o controlo de amostragem e Cy5/Atto (vermelho) para o controlo interno. |
| b) Programação incorreta do perfil de temperatura. | Compare o programa de RT-PCR com o protocolo. |
| c) Configuração incorreta da reação de PCR | Verifique os seus passos de trabalho ao longo do esquema de pipetagem e repita a PCR, se necessário. |
| d) As condições de armazenamento de um ou mais componentes do kit não está em conformidade com as instruções ou o <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit expirou. | Obedeça às condições de armazenamento, verifique o prazo de validade dos reagentes e, se necessário, utilize um novo kit. |
| e) Configuração incorreta da plataforma de qPCR durante a configuração de dados. | Aplique as configurações recomendadas relacionadas com a sua plataforma de qPCR descritas no presente manual. |
| f) A PCR foi inibida. | Siga as boas práticas de laboratório de biologia molecular para evitar a introdução de contaminantes. Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente. Siga o protocolo indicado no presente manual. Verifique o prazo de validade do reagente e, se necessário, utilize um novo kit. Repita o ensaio com outra amostra. |

Sinal verde (FAM) no controlo sem modelo ou no controlo negativo de extração

- | | |
|--|--|
| Ocorreu contaminação com sequências de SARS-CoV-2 durante a preparação da placa de RT-PCR. | Repita a RT-PCR com novos reagentes. Siga as boas práticas de laboratório de biologia molecular para evitar a introdução de contaminantes. Siga o protocolo indicado no presente manual. Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente. |
|--|--|

Comentários e sugestões

Sinal vermelho fraco ou ausente (Cy5/Atto) do controlo interno
















- a) Foi introduzido um interferente na reação de RT-PCR. A PCR foi inibida.
- Siga as boas práticas de laboratório de biologia molecular para evitar a introdução de contaminantes.
- Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.
- Siga o protocolo indicado no presente manual.
- Repita a experiência com uma amostra recém-colhida.
- b) O controlo interno está degradado.
- Siga as boas práticas de laboratório de biologia molecular para evitar a introdução de RNAses. Siga as recomendações indicadas no presente manual.
- Certifique-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.
- Obedeça às condições de armazenamento, verifique o prazo de validade dos reagentes e, se necessário, utilize um novo kit.
- c) Configuração incorreta da plataforma de qPCR durante a configuração de dados.
- Aplique as configurações recomendadas relacionadas com a sua plataforma de qPCR descritas no presente manual.

Sinal amarelo fraco ou ausente (VIC/HEX) do controlo de amostragem

- a) A amostra clínica está degradada.
- Siga as recomendações fornecidas pelo fornecedor do dispositivo de colheita relativamente ao seu armazenamento, manuseamento e transporte.
- Siga o protocolo indicado no presente manual, incluindo os passos de preparação de amostras com o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Obedeça às condições de armazenamento, verifique o prazo de validade dos reagentes, como o SARS-CoV-2 UM Prep Buffer e, se necessário, utilize um novo kit.
- b) A amostra não foi devidamente colhida. A quantidade de células humanas colhidas no esfregaço ou transferidas no meio de transporte não foi suficiente.
- Siga as recomendações fornecidas pelo fornecedor do dispositivo de colheita para a colheita e o manuseamento de amostras.
- c) Configuração incorreta da plataforma de qPCR durante a configuração de dados.
- Aplique as configurações relacionadas com a sua plataforma de qPCR descritas no presente manual.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer nas instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos:

| Símbolo | Definição do símbolo |
|---|--|
|  | Contém reagentes suficientes para 768 ou 3072 reações |
|  | Prazo de validade |
|  | Dispositivo médico de diagnóstico in vitro |
|  | Número de catálogo |
|  | Número de lote |
|  | Componentes |
|  | Conteúdo |
|  | Número |
|  | Número global de item comercial |
|  | R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão |
|  | Limitação de temperatura |
|  | Fabricante |
|  | Consultar as instruções de utilização |
|  | Manter afastado da luz solar |
|  | Aviso/cuidado |

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN em **support.qiagen.com**.

Informações de encomenda

| Produto | Conteúdo | N.º de cat. |
|--|---|--------------------|
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768) | Para 768 reações: Tampão de preparação, corante ROX, mistura principal, primers e sondas, controlo interno, água (No Template Control, NTC) e controlo positivo | 4511460 |
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072) | Para 3072 reações: Tampão de preparação, corante ROX, mistura principal, primers e sondas, controlo interno, água (No Template Control, NTC) e controlo positivo | 4511469 |
| Instrumento e acessórios | | |
| PCR Tubes, 0.1 ml para Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Para utilização com rotor de 72 poços, tubos de tiras e tampas | 981103 |
| Software Rotor-Gene Q | Software Rotor-Gene Q, versão 2.3.1 (ou superior) | |
| Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Ciclador de real-time PCR com 5 canais, analisador de fusão de alta resolução, software, computador portátil e acessórios; 1 ano de garantia em peças e mão de obra, instalação | 9002032 |
| Loading Block | 72 tubos x 0,1 ml | 9018901 |

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo manuais do kit QIAGEN ou manual do utilizador. Os manuais do utilizador e os manuais dos kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

| Revisão | Descrição |
|-------------------|--|
| R1, abril de 2021 | Versão inicial. |
| R2, julho de 2021 | Extensão da alegação: O teste foi estabelecido para indivíduos assintomáticos. Utilização prevista foi atualizada para incluir indivíduos sem sintomas ou outros motivos para se suspeitar de infecção por COVID-19. Secção sobre Desempenho clínico incluindo indivíduos assintomáticos adicionada a dados de Desempenho. Declaração "O desempenho deste teste não foi determinado para pacientes sem sinais ou sintomas de infecção respiratória" removida da secção Limitações. Pequenas alterações editoriais e de formatação. |

Acordo de licença limitada para o *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Acordo de licenciamento limitado em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Acordo de licenciamento limitado ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific ou suas subsidiárias). Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com