

Instruções de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

06/2020 PT

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



821019



4800



06 2020



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	7
3.	Armazenamento	8
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	9
5.	Informação de Base	10
6.	Descrição do Produto.....	10
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	12
6.2	Tipos de amostras.....	12
7.	Avisos e Precauções	13
8.	Procedimento	15
8.1	Preparação de Amostras.....	15
8.2	Preparação da Master Mix.....	18
8.3	Preparação da Reação	20
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	21
9.1	Definições	21
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	21
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	22
10.	Análise de Dados	22
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	23
10.1.1	Processamento de teste de diagnóstico válido.....	23
10.1.2	Processamento de teste de diagnóstico inválido	23
10.2	Interpretação dos Resultados	23
10.2.1	Análise Qualitativa	24

11. Avaliação do Desempenho.....	25
11.1 Sensibilidade Analítica	25
11.2 Especificidade Analítica	29
11.2.1 Inclusividade	29
11.2.2 Reatividade cruzada	31
11.3 Precisão	32
11.4 Avaliação de Diagnóstico	33
12. Limitações	35
13. Controlo de Qualidade.....	36
14. Apoio Técnico	36
15. Bibliografia	36
16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade.....	37
17. Explicação de Símbolos.....	38

1. Utilização Prevista

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico da linhagem B-beta coronavírus (linhagem B-βCoV) e do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).

Destina-se a ser utilizado como um auxiliar de diagnóstico em pessoas com sinais e sintomas da doença coronavírus 2019 (COVID-2019) associados a fatores de risco clínicos e epidemiológicos.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 destina-se a ser utilizado por pessoal qualificado em laboratórios devidamente equipados que cumprem as diretrizes relativas à biossegurança em laboratório.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de tubos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	100	240
Violeta	Master B	100	720
Vermelho	Positive Control*	25	250
Verde	Internal Control	48	1000
Branco	Water (PCR grade)	4	500

* O Controlo Positivo contém ambos os alvos, B-βCoV e SARS-CoV-2

Positive Control = Controlo Positivo

Internal Control = Controlo Interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

ATENÇÃO



Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integralidade com respeito ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto com defeitos ou incompleto, pois o desempenho poderá estar comprometido.

3. Armazenamento

- O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master, Controlo Interno e Controlo Positivo (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

ATENÇÃO



Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



Não exceda a sequência descongelar-congelar e as durações de manuseamento, conforme especificado nestas Instruções de Utilização.

ATENÇÃO



Não utilize componentes de produtos para além da data de validade indicada na etiqueta do componente.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (consulte o capítulo 8.1 Preparação de Amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (ótico) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.

NOTA



É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é um vírus de ARN de cadeia simples de sentido positivo pertencente à família Coronaviridae.

O SARS-CoV-2 surgiu na região de Wuhan na China em dezembro de 2019 e propagou-se a nível mundial em 2 meses. O vírus foi inicialmente designado como 2019-nCoV (novo Coronavírus) e o seu nome foi alterado para SARS-CoV-2 pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses” no dia 11.02.2020. Ao mesmo tempo, a OMS designou a doença causada pelo SARS-CoV-2 como COVID-19. Tendo em consideração o rápido aumento e propagação da COVID-19 a nível mundial, a OMS caracterizou o surto como uma pandemia em 12.03.2020.

O SARS-CoV-2 é altamente contagioso e transmitido por aerossóis e gotículas e causa infeções respiratórias agudas com sintomas semelhantes aos da gripe. Principalmente, mas não exclusivamente, em pessoas idosas e pessoas com doenças pré-existentes, a infeção com SARS-CoV-2 pode provocar uma doença grave e potencialmente fatal. Foram notificados casos de infeção assintomática, doença ligeira, doença grave e mortes.

6. Descrição do Produto

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico da linhagem B-beta coronavírus (linhagem B-βCoV) e do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas

alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com reporter fluorescente e corante quencher.

A sonda específica para o ARN do B-βCoV (gene alvo E) está marcada com o fluoróforo FAM™, enquanto a sonda específica para o ARN do SARS-CoV-2 (gene alvo S) está marcada com o fluoróforo Cy5. A sonda específica para o Internal Control (IC) (Controlo Interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico do B-βCoV e do ARN específico do SARS-CoV-2, assim como a deteção do Internal Control (Controlo Interno) nos canais de deteção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

O teste consiste em três processos num único tubo de ensaio:

- Transcricção reversa do ARN para ADNc alvo e do Controlo Interno (Internal Control)
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno (Internal Control)
- Deteção simultânea de amplificações de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

- Master A
- Master B
- Positive Control (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Internal Control
- Water (PCR grade)

Positive Control = Controlo Positivo

Internal Control (IC) = Controlo Interno

Water (PCR grade) = Água de PCR

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcrição reversa, a amplificação mediada por PCR e a detecção de ARN específico de B-βCoV (gene alvo E), ARN específico de SARS-CoV-2 (gene alvo S) e do Internal Control (Controlo Interno) numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para ser usado com os seguintes instrumentos PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipos de amostras

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi validado para utilização com o seguinte tipo de amostras:

- Esfregaços respiratórios humanos colhidos em Universal Transport Medium™ (UTM®)

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi validado utilizando o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) para a extração e purificação de ácido nucleico.

7. Avisos e Precauções

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade com respeito ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto com defeitos ou incompleto, pois o desempenho poderá estar comprometido.
- Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.
- A presença de inibidores de PCR poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.
- Se a amostra apresentar outros agentes patogénicos diferentes do SARS-CoV-2, poderá ocorrer concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas.
- Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.
- A falta de centrifugação dos componentes do produto após o descongelamento pode provocar a contaminação dos componentes com os resíduos de reagente nas tampas e, como consequência, comprometer o desempenho do produto.
- Não exceda a sequência descongelar-congelar e as durações de manuseamento, conforme especificado nestas Instruções de Utilização.
- Não utilize componentes de produtos para além da data de validade indicada na etiqueta do componente.
- O manuseamento incorreto dos componentes do produto e das amostras pode provocar contaminação, causando resultados de exame de IVD incorretos.
 - Não troque as tampas de frascos ou garrafas, para evitar o risco de contaminação cruzada.
 - Para minimizar o risco de contaminação por transferência, armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
 - Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação de amostras/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.

- Use sempre luvas descartáveis.
- Não abra as placas PCR ou os tubos pós-amplificação, para evitar a contaminação com amplificões.
- O armazenamento de eluatos em condições incorretas pode provocar a degradação das sequências alvo do SARS-CoV-2.
- Não exceda o tempo de armazenamento da Mistura PCR. Tal pode comprometer o desempenho do produto.
- As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco biológico, em conformidade com os procedimentos laboratoriais de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.
- Elimine os resíduos perigosos e biológicos apenas em conformidade com os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.
- À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- A existência potencial de mutações nas regiões-alvo do genoma do SARS-CoV-2 abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.
- A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.

8. Procedimento

ATENÇÃO



O manuseamento incorreto dos componentes do produto e das amostras pode provocar contaminação, causando resultados de exame de IVD incorretos.

- Não troque as tampas de frascos ou garrafas, para evitar o risco de contaminação cruzada.

- Para minimizar o risco de contaminação por transferência, armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.

- Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação de amostras/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.

- Use sempre luvas descartáveis.

- Não abra as placas PCR ou os tubos pós-amplificação, para evitar a contaminação com amplicões.

8.1 Preparação de Amostras

O ARN extraído é o material inicial para o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi validado com esfregaços respiratórios humanos utilizando o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico (consulte abaixo). A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 deve ser

validada pelo utilizador.

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, antes da eluição do ácido nucleico.

Após a conclusão do procedimento de extração, os eluatos na placa de eluato não selada mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (máx. 30 °C) durante 6 horas. Os eluatos numa placa de eluato selada podem ser armazenados a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C até 24 horas antes do início de uma preparação da reação PCR.

ATENÇÃO



Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.

ATENÇÃO

A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

ATENÇÃO

As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco biológico, em conformidade com os procedimentos laboratoriais de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.

ATENÇÃO

A presença de inibidores de PCR poderá causar resultados inválidos ou falsos negativos.

ATENÇÃO

Este ensaio não pode ser utilizado diretamente na amostra. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.

ATENÇÃO

Elimine os resíduos perigosos e biológicos apenas em conformidade com os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.

ATENÇÃO

O armazenamento de eluatos em condições incorretas pode provocar a degradação das sequências alvo do B-βCoV e SARS-CoV-2.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um RT-PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (Controlo Interno)	1 µl	12 µl
Volume do Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o IC **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume de eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de Elution Buffer (tampão de eluição) ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise).

- Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume do Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

A falta de centrifugação dos componentes do produto após o descongelamento pode provocar a contaminação dos componentes com os resíduos de reagente nas tampas e, como consequência, comprometer o desempenho do produto.

NOTA

Se o IC (Internal Control - Controlo Interno) for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo terá de incluir o IC.

NOTA

Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (Controlo Positivo ou Negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um Controlo Positivo e um Controlo Negativo por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

Após a conclusão da Preparação da Reação PCR, a Mistura PCR é estável à temperatura ambiente (máx. 30 °C) durante 30 minutos.

ATENÇÃO



Não exceda o tempo de armazenamento da Mistura PCR. Tal pode comprometer o desempenho do produto.

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do B-βCoV	Gene alvo E	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do SARS-CoV-2	Gene alvo S	Cy5	(Nenhum)
Internal Control (Controlo Interno)	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

► Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Repetições do Ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcriptase Reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	55	00:45
			-	72	00:15

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de teste de diagnóstico válido

Um processamento de teste de diagnóstico é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção		
	FAM™	Cy5	JOE™
Controlo Positivo [B-βCoV e SARS-CoV-2]	+	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

10.1.2 Processamento de teste de diagnóstico inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é considerado **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se qualquer uma das condições de controlo para um processamento de teste de diagnóstico **válido** não for cumprida.

No caso de um processamento de teste de diagnóstico **inválido**, repita o teste utilizando os ácidos nucleicos purificados restantes ou comece novamente a partir das amostras originais.

10.2 Interpretação dos Resultados

ATENÇÃO



À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
FAM™ (Gene E)	Cy5 (Gene S)	JOE™ (Controlo Interno)	
+	+	+*	Detetado ARN específico do B-βCoV e SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+*	Detetado apenas ARN específico do B-βCoV. Presumível positivo para SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+*	Detetado apenas ARN específico do SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	Não foi detetado ARN específico do B-βCoV nem do SARS-CoV-2. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do SARS-CoV-2.
-	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

* A deteção do Internal Control (Controlo Interno) no canal de deteção JOE™ não é necessária para os resultados positivos no canal de deteção FAM™ ou no canal de deteção Cy5. Uma carga elevada de ARN do B-βCoV (gene alvo E) e/ou do SARS-CoV-2 (gene alvo S) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (Controlo Interno).

¹ A deteção em apenas um dos dois respetivos canais de deteção para o gene E e o gene S poderão dever-se a uma baixa concentração de ARN viral próxima do limite de deteção ou devido a mutação de uma das duas sequências alvo.

² A amostra pode ser reanalisada repetindo a extracção e a RT-PCR. Se o resultado repetido continuar presumível positivo, então podem ser realizados ensaios adicionais confirmatórios.

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi realizada utilizando diluições em série de sobrenadante de cultura celular de SARS-CoV-2 inativado por calor (4,6E+05 unidades formadoras de placas (UFP)/ml antes da inativação; Institute of Virology, Charité Berlin, Alemanha).

11.1 Sensibilidade Analítica

Estimativa do Limite de Detecção (LDD):

Foram utilizadas diluições em série de sobrenadante de cultura celular de SARS-CoV-2 inativado por calor (4,6E+05 unidades formadoras de placas (UFP)/ml antes da inativação; Institute of Virology, Charité Berlin, Alemanha).

Para a extração, 700 µl de UTM® contendo matriz nasal simulada (matriz nasal simulada contida no espécime [5% p/v mucina, 5% v/v sangue total, 0,8% v/v NaCl (95% solução salina) e 0,00002% p/v ADN genómico humano]) foram potenciados com sobrenadante de cultura celular de SARS-CoV-2 diluído e carregado no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) para a extração de ácido nucleico com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Cada diluição foi extraída em cinco réplicas e testada com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de deteção). A concentração mais baixa à qual todas as réplicas testaram positivo foi tratada como LDD experimental. Os resultados encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Determinação do LDD experimental utilizando o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 para a extração de ácido nucleico - Alvo: Gene E

Alvo	Concentração [UFP/ml]	Call taxa	Réplica 1 C _i FAM™	Réplica 2 C _i FAM™	Réplica 3 C _i FAM™	Réplica 4 C _i FAM™	Réplica 5 C _i (FAM™)
Gene E	1,00E-01	5/5	32,79	33,30	33,03	33,24	33,14
	3,16E-02	4/5	-	35,23	35,25	39,43	34,22
	1,00E-02	4/5	-	35,68	38,77	36,25	36,10
	3,16E-03	2/5	-	-	-	38,30	38,70
	1,00E-03	0/5	-	-	-	-	-
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Tabela 2: Determinação do LDD experimental utilizando o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 para a extração de ácido nucleico - Alvo: Gene S

Alvo	Concentração [UFP/ml]	Call taxa	Réplica 1 C _i (Cy5)	Réplica 2 C _i (Cy5)	Réplica 3 C _i (Cy5)	Réplica 4 C _i (Cy5)	Réplica 5 C _i (Cy5)
Gene S	1,00E-01	5/5	32,75	32,82	33,07	32,95	33,14
	3,16E-02	3/5	-	35,43	34,54	-	35,44
	1,00E-02	4/5	-	37,41	36,01	38,64	39,21
	3,16E-03	1/5	-	-	-	37,80	-
	1,00E-03	2/5	-	-	38,98	-	39,76
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação)/kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção), detetou 5/5 réplicas com uma concentração de 1,00E-01 UFP/ml para ambos os alvos, o gene S e o gene E. Por conseguinte, esta concentração foi considerada o LDD experimental.

Confirmação do Limite de Detecção (LDD):

Com base no LDD experimental, o sobrenadante de cultura celular de SARS-CoV-2 inativado por calor foi adicionado a 20 amostras UTM® contendo matriz nasal simulada para uma concentração final de 1,00E-01 UFP/ml. Os ácidos nucleicos foram extraídos com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 no AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação), conforme descrito acima. Os eluatos obtidos foram testados com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção). Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Confirmação do LDD no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção)

Concentração de SARS-CoV-2 = 1,00E-01 UFP/ml				
Espécime	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (Cy5)	C _t (JOE™)
1	Pos	33,02	33,04	29,57
2	Pos	33,28	33,29	29,34
3	Neg	-	-	29,25
4	Pos	33,34	33,76	29,45
5	Pos	32,82	33,88	29,42
6	Pos	32,79	32,85	29,61
7	Pos	32,43	33,53	29,53
8	Pos	33,14	33,26	29,47
9	Pos	33,01	32,68	29,45
10	Pos	33,2	33,45	29,31
11	Pos	33,21	33,51	29,41
12	Pos	32,99	34,11	29,56
13	Pos	32,69	33,13	29,41
14	Pos	33,67	34,33	29,52
15	Pos	32,55	32,76	29,48
16	Pos	33,26	33,32	29,33
17	Pos	33,2	32,53	29,36
18	Pos	32,78	33,00	29,51
19	Pos	33,13	33,31	29,47
20	Pos	33,28	33,43	29,46
Estatística	C _t mediano	33,04	33,32	29,45
	DP	0,30	0,47	0,09
	CV %	0,92	1,42	0,32
	Resultado	19/20		

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em conjunto com o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação)/kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detecção), detetou 19/20 réplicas a uma concentração de 1,00E-01 UFP/ml.

Por conseguinte, o LDD confirmado é de 1,00E-01 UFP/ml.

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 é assegurada pela seleção cuidadosa dos oligonucleótidos (primers e sondas). Os oligonucleótidos foram verificados por análise de comparação de sequências em relação a sequências publicamente disponíveis para assegurar a detecção de todos os genótipos de B-βCoV (gene alvo E) e SARS-CoV-2 (gene alvo S) relevantes.

11.2.1 Inclusividade

A inclusividade do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi avaliada para diferentes isolados de SARS-CoV-2 por testes por via húmida. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Inclusividade (testes por via húmida) RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Estirpe/isolado de SARS-CoV-2	Fonte/Tipo de amostra	Concentração
<i>BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*</i>	Institute of Virology; Charité Berlin; Alemanha/Sobrenadante de cultura celular inativada por calor	4,6E+05 UFP/ml
2019-nCoV//Italy-INMI1	European Virus Archive Global/ARN	1,00E+04 cópias/μl

* A estirpe BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 foi utilizada para a determinação do LDD e para a avaliação do desempenho clínico do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Tabela 5: A inclusividade (análise in silico para 1906 sequências genômicas totais de SARS-CoV-2, das quais 1809 foram publicadas através da GISAID e.V. (www.gisaid.org) e 107 foram publicadas através do National Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov) a 27 de março de 2020 para o gene alvo E e o gene alvo S): RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

1916 sequências genômicas totais		Homologia	Comentário
Gene E	Primer Forward	1915 sequências: 100%	1 sequência 96% (1 incompatibilidade)
	Primer Reverse	1915 sequências: 100%	1 sequência 95 % (1 incompatibilidade)
	Sonda	1914 sequências: 100%	2 sequências: 95% (1 incompatibilidade)
Gene S	Primer Forward	1912 sequências: 100%	4 sequências: 95% (1 incompatibilidade)
	Primer Reverse	1903 sequências: 100%	13 sequências: 95% (1 incompatibilidade)
	Sonda	1881 sequências: 100%	34 sequências: 95% (1 incompatibilidade); 1 sequência: 91% (2 incompatibilidades)

Numa sequência de oligonucleotídeos única, os eventos de mutação que resultam em ≤ 2 incompatibilidade(s) não têm um impacto negativo significativo na amplificação da respetiva sequência alvo. Nenhuma das sequências analisadas demonstrou incompatibilidades em mais de um oligonucleotídeo e nenhuma das sequências incompatíveis demonstrou incompatibilidades com ambos os sistemas de deteção específicos (gene E e gene S), pelo que não se prevê que a reatividade dos oligonucleotídeos específicos incluídos no kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 seja afetada.

11.2.2 Reatividade cruzada

A especificidade analítica do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogénicos que não o SARS-CoV-2 foi avaliada através do teste de vírus relacionados com o SARS-CoV-2, agentes patogénicos que causam sintomas semelhantes a uma infeção com SARS-CoV-2 e agentes patogénicos provavelmente presentes em doentes que sofrem de infeção por SARS-CoV-2.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Coronavírus humano 229E
- Coronavírus humano OC43
- Coronavírus humano NL63
- SARS-coronavírus 3
- MERS-coronavírus
- Adenovírus
- Metapneumovírus humano (hMPV)
- Vírus parainfluenza 1
- Vírus parainfluenza 2
- Vírus parainfluenza 3
- Vírus parainfluenza 4
- Vírus da gripe A
- Vírus da gripe B
- Enterovírus
- Vírus sincicial respiratório A
- Vírus sincicial respiratório B
- Rinovírus
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*

ATENÇÃO



Se a amostra apresentar outros agentes patogénicos diferentes do SARS-CoV-2, poderá ocorrer concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas.

11.3 Precisão

A precisão do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 foi determinada como variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de uma experiência), variabilidade interensaio (variabilidade entre experiências diferentes) e variabilidade entre lotes (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada combinando as 3 análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do desvio padrão e do coeficiente de variação com base nos valores do ciclo limiar (C_t). Foram analisadas pelo menos 4 réplicas por amostra quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade interensaio e entre lotes.

Tabela 6: Dados de precisão (CV % [valores C_t]) para amostras de UTM® muito positivas de SARS-CoV-2

	Amostra muito positiva de SARS-CoV-2 [C_t no canal FAM™, gene alvo E]	Amostra muito positiva de SARS-CoV-2 [C_t no canal Cy5, gene alvo S]
Variabilidade Intraensaio	0,13 - 0,75	0,39 - 1,35
Variabilidade Interensaio	0,40 - 2,12	0,52 - 0,62
Variabilidade Entre Lotes	0,22	1,53
Variabilidade Total	2,74	2,02

Todas as amostras testadas a 3x LDD (amostras pouco positivas) foram detetadas como positivas para SARS-CoV-2 (gene E e gene S).

Tabela 7: Dados de precisão (CV % valores [C_i]) para o Internal Control (Controlo Interno) nas amostras de UTM® negativo de SARS-CoV-2

	Internal Control (Controlo Interno)
Variabilidade Intraensaio	0,17 - 0,37
Variabilidade Interensaio	0,05 - 0,95
Variabilidade Entre Lotes	0,42
Variabilidade Total	1,19

11.4 Avaliação de Diagnóstico

Para prever o desempenho clínico a um intervalo de confiança (IC) de 95%, foi preparado o sobrenadante de cultura celular de SARS-CoV-2 em concentrações diferentes, ocultado e adicionado a 34 esfregaços nasofaríngeos individuais ressuspensos em Universal Transport Medium™ (UTM®).

Dez espécimes de cada foram potenciados com ARN a uma concentração final de 1x LDD (1,00E-01 UFP/ml), catorze espécimes de cada foram potenciados com ARN a uma concentração final de 2x LDD (2,00E-01 UFP/ml), e dez espécimes de cada foram potenciados com ARN a uma concentração final de 20 x LDD (2,00E00 UFP/ml). Outros 35 esfregaços nasofaríngeos individuais presumidos negativos para SARS-CoV-2 ressuspensos em Universal Transport Medium™ (UTM®) foram deixados não potenciados. Todas as amostras foram ocultadas, entregues a um operador imparcial. Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 (Altona Diagnostics).

Os eluatos foram testados com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de deteção) (Bio-Rad). A chave de "spiking" ocultada foi revelada depois de os resultados estarem completos. Os resultados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados de testes a amostras clínicas

Concentração da amostra [UFP/ml]	Call Rate do gene alvo S	Call Rate do gene alvo E
1x LDD (1,00E-01)	9/10	10/10
2x LDD (2,00E-01)	14/14	14/14
20x LDD (2,00E00)	10/10	10/10
negativo	0/35	0/35

95% (23/24) das amostras com uma concentração de SARS-CoV-2 com 1x ou 2x LDD apresentaram resultados positivos para o gene alvo S e foram comunicadas como “Positivas para ARN de SARS-CoV-2”. Uma amostra foi positiva apenas para o gene alvo E e foi comunicada como “Positiva presumível para ARN de SARS-CoV-2”. Todas (100%) estas amostras apresentaram resultados positivos para o gene alvo E. A partir destas amostras com uma concentração de 20x LDD, todas as amostras (100%) apresentaram resultados positivos para o gene S, bem como para o gene alvo E. Todas as amostras não potenciadas (100%) apresentaram resultados negativos para ambos os alvos.

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as Instruções de Utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e em procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento de amostras adequados para o desempenho ideal deste teste.
- O ensaio do gene E (canal FAM™) deteta ARN específico da linhagem B-betacoronavírus, incluindo coronavírus SARS e vários coronavírus de morcegos. Os sinais isolados com o ensaio do gene E poderão indicar a presença de coronavírus SARS ou coronavírus de morcegos.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do

e-mail: support@altona-diagnostics.com

telefone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliografia

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao diagnóstico *in vitro*.

















Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 da altona Diagnostics recebeu a Autorização Provisória da Autoridade de Ciências da Saúde em Singapura.

Não disponível em todos os países.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para “n” testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notas:

Notas:

Notas:

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

