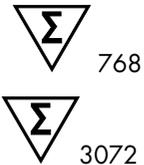


Janeiro de 2022

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



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro nos instrumentos Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx, QuantStudio[®] 5 Dx, cobas[®] z 480 ou CFX96[™] Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R4

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 e equipamento	12
Avisos e precauções	14
Informações de segurança.....	14
Precauções	15
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	16
Transporte, armazenamento e manuseamento de espécimes.....	16
Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no RGQ MDx 5plex HRM .	18
Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no ABI 7500 Fast Dx	23
Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no CFX96 Dx	30
Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no cobas z 480	36
Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no QuantStudio 5 Dx.....	42
Resultados	48

Análise no RGQ MDx 5plex HRM.....	48
Análise no ABI 7500 Fast Dx.....	50
Análise no CFX96 Dx	50
Análise no cobas z 480.....	52
Análise no QuantStudio 5 Dx	54
Interpretação de resultados.....	56
Limitações.....	58
Desempenho	59
Sensibilidade analítica (limite de deteção).....	59
Estudos de especificidade analítica (inclusividade e exclusividade/ reatividade cruzada)	60
Precisão	72
Desempenho clínico.....	73
Referências	77
Guia de resolução de problemas.....	79
Símbolos	81
Informações de contacto.....	83
Informações de encomenda	84
Histórico de revisões do documento.....	85

Utilização prevista

O *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit é um teste de real-time RT-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. Para espécimes de saliva pura, o teste é destinado a indivíduos com sinais e sintomas de infeção ou suspeitos de 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 RT-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 MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 ou CFX96 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 vários espécimes do trato respiratório superior (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos) e em espécimes de saliva pura 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 real-time 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 real-time 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 *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit foi concebido para abranger dois alvos (N1 e N2) do gene N detetados com o mesmo canal de fluorescência. Os dois alvos não são diferenciados e a amplificação de um ou de ambos os alvos produz um sinal de fluorescência. Resultados positivos são indicativos da presença do SARS-CoV-2, mas não excluem coinfeção por outros agentes patogénicos. Por outro lado, resultados negativos de real-time 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 da amostra, seguido da deteção de ARN do SARS-CoV-2 utilizando real-time RT-PCR no sistema RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ou QuantStudio 5 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 deteção direta no canal de fluorescência "Green" dos instrumentos RGQ MDx e no canal de fluorescência "FAM" do ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ou QuantStudio 5 Dx.

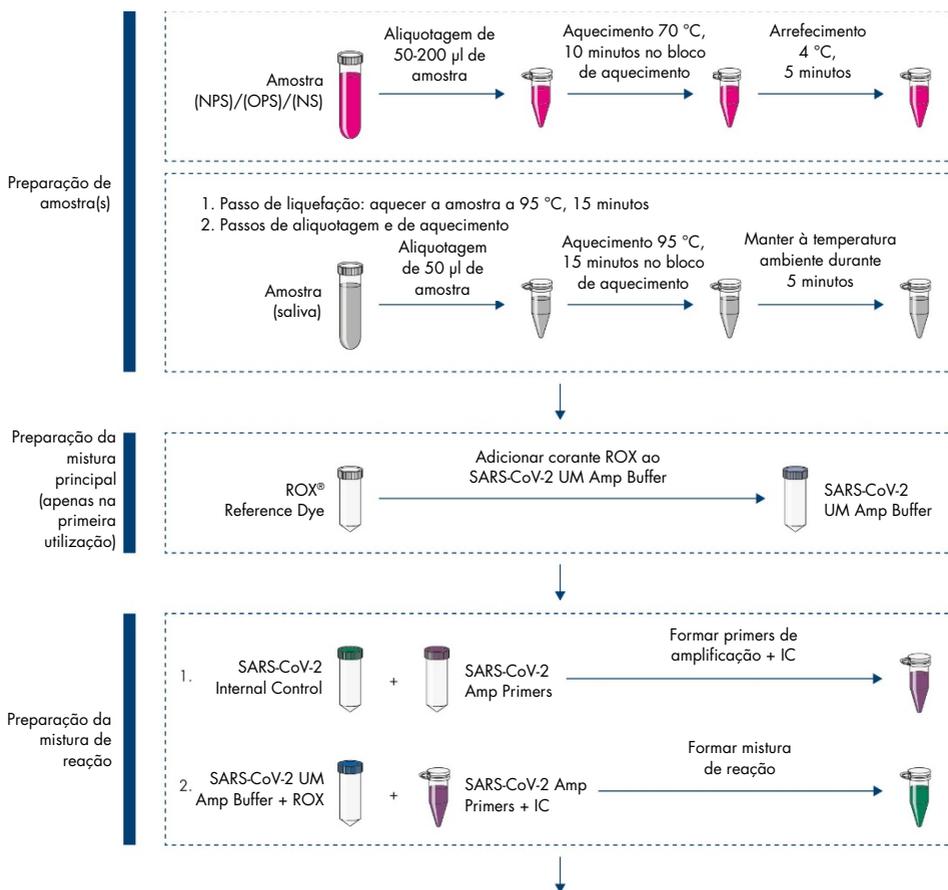
A mistura de primers e sondas do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit também contém os oligonucleotídeos necessários para amplificação da RNase P. Quando detetadas no canal de fluorescência "Yellow" do instrumento RGQ MDx, no VIC/HEX do ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ou QuantStudio 5 Dx, estas amplificações garantem a colheita de uma quantidade suficiente de amostra biológica. 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 real-time RT-PCR. Tal é detetado como um controlo interno (Internal Control, IC) de ARN no canal de fluorescência "Red" dos instrumentos RGQ MDx ou no Cy5/ATTO647N do ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ou QuantStudio 5 Dx. Uma vez que o IC está incluído no SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, a sua amplificação deve ser constante, a menos que exista um inibidor da real-time RT-PCR na amostra ou na reação de 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 real-time RT-PCR no tampão de preparação.

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



(continuação na página seguinte)

(continuação da página anterior)

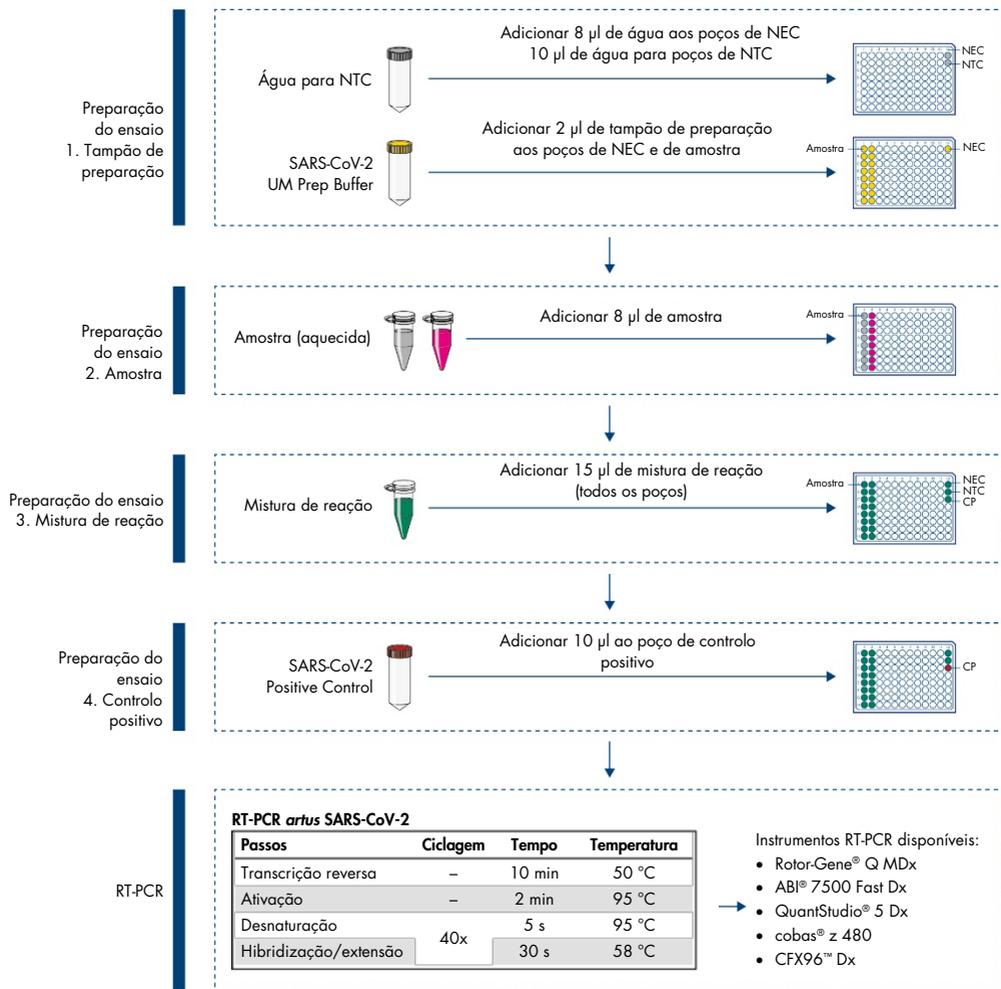


Figura 1. Fluxo de trabalho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

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 (Corante de referência ROX)	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 alíquotagem 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 real-time 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.

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 da amostra, 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 cinco fluxos de trabalho que exigem a utilização dos seguintes instrumentos de real-time RT-PCR e o seu 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
- CFX96 Dx com CFX Manager Dx, versão do software 3.1.3090.1022 ou superior
- cobas z 480 com LightCycler® 480 SW UDF versão 2.0.0 ou superior
- QuantStudio 5 Dx com QuantStudio 5 Dx IVD, versão do software 1.0.1 ou superior, e QuantStudio 5 Dx TD, versão do software 1.0.1 ou superior

Materiais necessários, mas não fornecidos

Consumíveis e equipamento

Consumíveis e equipamento habituais

- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Pipetas (ajustáveis)
- Agitador de vórtex
- Bloco de aquecimento
- 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
- Instrumento de centrifuga com placa de 96 poços

Consumíveis e equipamento para cada plataforma

Instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

- 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).
- 72-Well Rotor (n.º de cat. 9018903) e Locking Ring 72-Well Rotor (n.º de cat. 9018904)

Instrumento ABI 7500 Fast Dx

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. 4360954)

Instrumento CFX96 Dx

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, perfil baixo, parede fina, contorno branco/transparente (Bio-Rad Laboratories Inc., n.º de cat. HSP9601)
- Microseal "B" PCR Plate Sealing Film, adesiva, ótica (Bio-Rad Laboratories Inc., n.º de cat. MSB1001).

Instrumento cobas z 480

- LightCycler 480 Multiwell Plate, branca (Roche Group, n.º de cat. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, n.º de cat. 04729757001).

Instrumento QuantStudio 5 Dx

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, n.º de cat. 4360954)

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 e espécimes de saliva pura. 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 esfregaços nasofaríngeos, nasais e orofaríngeos

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

- $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) até 72 horas
- $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 semanas

As amostras de esfregaço nasofaríngeo permanecem estáveis ao longo de 3 ciclos de congelação/descongelação.

Colheita, transporte e armazenamento de amostras de saliva pura

As amostras de saliva pura devem ser colhidas em recipientes esterilizados sem quaisquer conservantes, tampões ou outros aditivos.

Instruções para a colheita de saliva pura:

- Evitar tossir antes da colheita de saliva pura.
- Não comer, beber, fumar, mastigar pastilha elástica ou escovar os dentes 30 minutos antes da colheita da amostra de saliva pura.
- Não devem ser realizados tratamentos ou exames dentários 24 horas antes da colheita de saliva pura.

As amostras de saliva pura permanecem estáveis e podem ser armazenadas a:

- Temperatura ambiente (18–26 °C) até 72 horas
- 4 °C (2 a 8 °C) até 72 horas
- Um armazenamento combinado à temperatura ambiente, depois a 4 °C e, em seguida, a -20 °C (-30 a -15 °C) até 12 dias
- -20 °C (-30 a -15 °C) até 1 mês

As amostras de saliva pura permanecem estáveis ao longo de 3 ciclos de congelação/descongelação.

Se as condições de armazenamento da amostra não seguirem estas indicações, deve validar as suas próprias condições de armazenamento.

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

Este protocolo descreve a preparação da amostra e da real-time RT-PCR para a deteção dos alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte e em amostras de saliva pura no instrumento de real-time RT-PCR RGQ MDx 5plex HRM associado à versão do software Rotor-Gene Q 2.3.1.49 (ou superior).

Pontos importantes antes de iniciar

- 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 RNases durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- As amostras do trato respiratório podem ser conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) 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.
- As amostras de saliva podem ser conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento, mas é recomendado que sejam conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) durante os passos de preparação e a preparação da reação.
- 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. 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 real-time RT-PCR 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

Preparação da amostra: Para espécimes do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos), siga o passo 1. Para amostras de saliva, avance para o passo 2.

1. Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos):
 - 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. Amostras de saliva:
 - 2a. Liquefação (para facilitar a pipetagem): aqueça a amostra de saliva a 95 °C durante 15 minutos (volume, recipiente ou dispositivo de aquecimento não especificados).
 - 2b. Homogeneíze a amostra pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 8–10 vezes.
 - 2c. Proceda à alíquotagem de 50 µl da amostra num tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 2d. Execute o passo de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos num bloco de aquecimento e, em seguida, mantenha a amostra à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos até ao seu carregamento num poço ou tubo de PCR.
3. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.
 - 3a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
 - 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.
4. 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.
 - 4a. 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.
 - 4b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 4c. 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 Volume (µl)
Reagentes	Concentração de stock	Concentração final	1 reação	72 reações (+20% de volume adicional*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	129,6
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total			8,75	756

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

5. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 2 e misture bem invertendo o tubo 3 vezes.

Tabela 2. Preparação da mistura de reação

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

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

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

10. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 5 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.

11. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no tubo de PCR apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.

12. 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.

13. 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, Yellow e Red

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

14. 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).

15. 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. (FI)	Leitura máx. (FI)	Ganho mín.	Ganho máx.
Green	1 *	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1 *	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1 *	5 FI	10 FI	-10	10

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

16. Selecione Perform optimization before the first acquisition (Efetuar otimização antes da primeira aquisição).

17. Inicie o ensaio.

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

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

Este protocolo destina-se à preparação e à deteção de alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte e em amostras de saliva pura no instrumento de real-time RT-PCR ABI 7500 Fast Dx.

Pontos importantes antes de iniciar

- 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 RNases 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.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- As amostras do trato respiratório podem ser conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) 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.
- As amostras de saliva podem ser conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento, mas é recomendado que sejam conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) durante os passos de preparação e a preparação da reação.
- 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. 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 real-time RT-PCR 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

Preparação da amostra: Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos), siga o passo 1. Para amostras de saliva, avance para o passo 2.

1. Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos):
 - 1a. Agite vigorosamente o esfregaço que contém 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.
 - 1d. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.
2. Amostras de saliva:
 - 2a. Liquefação (para facilitar a pipetagem): aqueça a amostra de saliva a 95 °C durante 15 minutos (volume, recipiente ou dispositivo de aquecimento não especificados).
 - 2b. Homogeneíze a amostra pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 8–10 vezes
 - 2c. Proceda à alíquotagem de 50 µl da amostra num tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 2d. Execute o passo de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos num bloco de aquecimento e, em seguida, mantenha a amostra à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos até ao seu carregamento num poço ou tubo de PCR.
3. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.
 - 3a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.

-
- 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.
 4. 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.
 - 4a. 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.
 - 4b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 4c. 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 (+20% de volume adicional*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total			8,75	1008

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

5. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 6 e misture bem invertendo o tubo 3 vezes.

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*)
Mistura de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	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.

6. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NEC.
7. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NTC.
8. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada poço atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.
9. 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.

10. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 5 aos poços dedicados a amostras e controlos (consulte o exemplo na Figura 3). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no poço apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
12. 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.
13. Centrifugue brevemente a placa de PCR para recolher líquido no fundo dos poços.
14. Configure o programa de real-time RT-PCR para o modo de ensaio "Standard 7500" do ABI 7500 Fast Dx de acordo com a Tabela 7.

Nota: Após clicar em **file** (ficheiro) e **new** (novo), verifique se o ensaio é **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Curva-padrão [Quantificação absoluta]) e o Run Mode (Modo de ensaio) está definido como **Standard 7500** (Padrão 7500). Selecione FAM, VIC e Cy5 como repórter com o supressor definido como **None** (Nenhum) e os dados devem ser adquiridos com **ROX** como **passive reference** (referência passiva).

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.

15. 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.
16. Selecione os poços utilizados e aplique os corantes repórter FAM, VIC e Cy5. Os dados devem ser adquiridos com o corante passivo ROX **ativado**.
17. Verifique se a curva-padrão do ABI 7500 Fast Dx está configurada para Absolute Quantitation (Quantificação absoluta).
18. Inicie o ensaio.
19. 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		FAM, VIC e Cy5

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

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

Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no CFX96 Dx

Este protocolo destina-se à preparação e deteção de alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte e em amostras de saliva pura no CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., n.º de cat. 1845097-IVD [módulo de reação ótica] e 1841000-IVD [módulo de termociclagem]) com CFX Manager Dx, versão do software 3.1.309001022 ou superior.

Pontos importantes antes de iniciar

- 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 RNases durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- As amostras do trato respiratório podem ser conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) 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.
- As amostras de saliva podem ser conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento, mas é recomendado que sejam conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) durante os passos de preparação e a preparação da reação.
- 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. 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 real-time RT-PCR 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 PCR).
- Para minimizar a contaminação, é necessário que as preparações de amostras e da real-time RT-PCR sejam realizadas em zonas distintas.

Procedimento:

Preparação da amostra: Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos), siga o passo 1. Para amostras de saliva, avance para o passo 2.

1. Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos):
 - 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.
 - 1d. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.

2. Amostras de saliva:
 - 2a. Liquefação (para facilitar a pipetagem): aqueça a amostra de saliva a 95 °C durante 15 minutos (volume, recipiente ou dispositivo de aquecimento não especificados).
 - 2b. Homogeneíze a amostra pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 8–10 vezes.
 - 2c. Proceda à alíquotagem de 50 µl da amostra num tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 2d. Execute o passo de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos num bloco de aquecimento. Em seguida, conserve a amostra à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos até ao seu carregamento num tubo ou poço de PCR.
3. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.
 - 3a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
 - 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.
4. Para uma placa CFX96 Dx completa (96 poços), prepare uma mistura de alíquota de SARS-CoV-2 Amp Primers com SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Transfira o volume necessário de SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com a Tabela 8 para um novo tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 4b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 4c. Centrifugue o SARS-CoV-2 Amp Primers contendo IC até que a solução se deposite no fundo do tubo.

Tabela 8. 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 (+20% de volume adicional*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total			8,75	1008

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

5. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 9 e misture bem invertendo o tubo 3 vezes.

Tabela 9. 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*)
Mistura de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Volume de reação total		–	15,00	1728

* **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.

6. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NEC.
7. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NTC.
8. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada poço atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.
9. 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.

10. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 5 aos poços dedicados a amostras e controlos (a Figura 4 é fornecida como exemplo). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no poço apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
12. 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.
13. Centrifugue brevemente a placa de PCR para recolher líquido no fundo dos poços.
14. No **CFX Manager Dx Software** (Software CFX Manager Dx) > **Startup Wizard** (Assistente de inicialização), em **run type** (tipo de ensaio) selecione **user defined** (definido pelo utilizador).
15. Separador **Protocol** (Protocolo): Defina o programa de real-time RT-PCR segundo a Tabela 10 para 25 µl de volume de reação.

Nota: Na janela **Protocol Editor** (Editor de protocolo), clique no botão **Step Options** (Opções dos passos) para ajustar a taxa de rampa em 1,6 °C/s em cada um dos 4 passos do programa de RT-PCR.

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

Nota: Consulte as *Instruções de utilização do CFX96 Dx* para obter mais informações.
16. Separador **Plate** (Placa): Selecione os poços utilizados e aplique os corantes repórter FAM, HEX e Cy5.
17. Coloque a placa no ciclador de PCR em tempo real (a Figura 4 representa um exemplo da disposição da placa de PCR).
18. Separador **Start Run** (Iniciar ensaio): clique em Start the run (Iniciar o ensaio).
19. Uma vez concluído o ensaio, analise os resultados (consulte a secção Resultados).

Tabela 10. Programa SARS-CoV-2 Prep&Amp UM para o CFX96 Dx

Passos	Tempo	Temperatura (°C)	Taxa de rampa (°C/s)	Número de repetições	Aquisição
1. Transcrição reversa	10 min	50	1,6	1	Não
2. Ativação inicial da PCR por calor	2 min	95	1,6	1	Não
Ciclagem de 2 passos				39*	
Desnaturação	5 s	95	1,6	1	Não
Hibridização/extensão	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX e Cy5

*O CFX funciona por repetição. Para que o programa execute 40 ciclos, devem ser definidas 39 repetições para a ciclagem de dois passos (como passo 5 "GOTO" no software).

	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 4. Exemplo da disposição das placas no CFX96 Dx

Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no cobas z 480

Este protocolo descreve a preparação da amostra e da real-time RT-PCR para a deteção dos alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte e em amostras de saliva pura no cobas z 480 com o LightCycler 480 SW UDF, versão 2.0.0 (ou superior).

Pontos importantes antes de iniciar.

- 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 RNases durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento.

- As amostras do trato respiratório 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.
- As amostras de saliva podem ser conservadas em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento, mas é recomendado que sejam conservadas à temperatura ambiente (15–25 °C) durante os passos de preparação e a preparação da reação.
- 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 real-time RT-PCR 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 real-time RT-PCR).
- Para minimizar a contaminação, é necessário que as preparações de amostras e da real-time RT-PCR sejam realizadas em zonas distintas.

Procedimento:

Preparação da amostra: Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos), siga o passo 1. Para amostras de saliva, avance para o passo 2.

1. Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos):
 - 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.
 - 1d. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.

2. Amostras de saliva:
 - 2a. Liquefação (para facilitar a pipetagem): aqueça a amostra de saliva a 95 °C durante 15 minutos (volume, recipiente ou dispositivo de aquecimento não especificados).
 - 2b. Homogeneíze a amostra pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 8–10 vezes.
 - 2c. Proceda à alíquotagem de 50 µl da amostra num tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 2d. Execute o passo de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos num bloco de aquecimento e, em seguida, mantenha a amostra à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos até ao seu carregamento num poço ou tubo de PCR.
3. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.
 - 3a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
 - 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.
4. Para uma placa cobas z 480 completa (96 poços), prepare uma mistura de alíquota de SARS-CoV-2 Amp Primers com SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Transfira o volume necessário de SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com a Tabela 11 para um novo tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 4b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 4c. Centrifugue o SARS-CoV-2 Amp Primers contendo IC até que a solução se deposite no fundo do tubo.

Tabela 11. 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 (+ 20% de volume adicional*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total			8,75	1008

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

5. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 12 e misture bem invertendo o tubo 3 vezes.

Tabela 12. 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*)
Mistura de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Volume de reação total		–	15,00	1728

* **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.

6. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NEC.
7. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NTC.
8. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada poço atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.
9. 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.

10. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 5 aos poços dedicados a amostras e controlos (a Figura 5 é fornecida como exemplo). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no poço apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
12. 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.
13. Centrifugue brevemente a placa de PCR para recolher líquido no fundo dos poços.
14. **Primeira utilização:** No software Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0, clique em **open tools** (abrir ferramentas) e selecione **detection formats** (formatos de deteção) para definir as seguintes combinações de excitação–emissão: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) e 610-670 (ATTO647N).
15. Defina o programa de real-time RT-PCR segundo a Tabela 13 para 25 µl de volume de reação.

Nota: No topo da página, selecione **detection format** (formato de deteção) para seleccionar o formato de deteção criado no passo 14.

Nota: Utilize uma taxa de rampa personalizada de 1,6 °C/s em cada um dos 5 passos do programa de real-time RT-PCR.

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

Nota: Consulte as *Instruções de utilização do cobas z 480* para obter mais informações.
16. Coloque a placa no ciclador de PCR em tempo real (a Figura 5 representa um exemplo da disposição da placa de PCR).
17. Inicie o ensaio.
18. Uma vez concluído o ensaio, analise os resultados (consulte a secção Resultados).

Tabela 13. Programa SARS-CoV-2 Prep&Amp UM para o cobas z 480

Passos	Tempo	Temperatura (°C)	Taxa de rampa (°C/s)	Número de ciclos	Modo de análise
Transcrição reversa	10 min	50	1,6	1	Nenhum
Ativação inicial da PCR por calor	2 min	95	1,6	1	Nenhum
Ciclagem de 2 passos				40	Quantificação
Desnaturação	5 s	95	1,6		Nenhum
Hibridização/extensão	30 s	58	1,6		Único
Arrefecimento	1 min	37	1,6	1	Nenhum

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

Figura 5. Exemplo da disposição das placas no cobas z 480

Protocolo: Preparação de amostras e deteção de SARS-CoV-2 no QuantStudio 5 Dx

Este protocolo destina-se à preparação e à deteção de alvos de SARS-CoV-2 em esfregaços nasais, nasofaríngeos ou orofaríngeos humanos armazenados em meios de transporte e em amostras de saliva pura no instrumento de real-time RT-PCR QuantStudio 5 Dx.

Pontos importantes antes de iniciar.

- 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 RNases durante a experiência e utilize material plástico isento de nuclease.
- Ao utilizar o QuantStudio 5 Dx e antes da primeira utilização, é necessário adicionar corante ROX ao tubo de mistura principal.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- As amostras do trato respiratório 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 amostra de saliva pode ser conservada em gelo ou a 4 °C numa rack de arrefecimento, mas é recomendado que seja conservada à temperatura ambiente (15–25 °C) durante os passos de preparação e a preparação da reação.
- A utilização do QuantStudio 5 requer corante 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 real-time RT-PCR 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 real-time RT-PCR).
- Para minimizar a contaminação, é necessário que as preparações de amostras e da real-time RT-PCR sejam realizadas em zonas distintas.

Procedimento

Preparação da amostra: Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos), siga o passo 1. Para amostras de saliva, avance para o passo 2.

1. Para amostras do trato respiratório (esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos):
 - 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.

- 1d. Arrefeça as amostras em gelo durante, pelo menos, 5 minutos e, em seguida, mantenha as amostras em gelo a 4 °C.
2. Amostras de saliva:
 - 2a. Liquefação (para facilitar a pipetagem): aqueça a amostra de saliva a 95 °C durante 15 minutos (volume, recipiente ou dispositivo de aquecimento não especificados).
 - 2b. Homogeneíze a amostra pipetando cuidadosamente para cima e para baixo 8–10 vezes.
 - 2c. Proceda à alíquotagem de 50 µl da amostra num tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 2d. Execute o passo de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos num bloco de aquecimento e, em seguida, mantenha a amostra à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos até ao seu carregamento num poço ou tubo de PCR.
3. Na primeira utilização, complemente o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer com o ROX Reference Dye.
 - 3a. Adicione 32,8 µl de corante ROX a um tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Feche a tampa do tubo que contém o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e o corante ROX e inverta o tubo 3 vezes.
 - 3c. Centrifugue o SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contendo corante ROX até que a solução se deposite no fundo do tubo.
4. Para uma placa QuantStudio 5 Dx completa (96 poços), prepare uma mistura de alíquota de SARS-CoV-2 Amp Primers com SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Transfira o volume necessário de SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control de acordo com a Tabela 14 para um novo tubo de 1,5 ml isento de PCR.
 - 4b. Feche a tampa e inverta o tubo 3 vezes ou agite o tubo em vórtex pulsado durante 3 a 5 segundos.
 - 4c. Centrifugue o SARS-CoV-2 Amp Primers contendo IC até que a solução se deposite no fundo do tubo.

Tabela 14. 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 (+ 20% de volume adicional*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC total			8,75	1008

* **Nota:** Ajuste os volumes de SARS-CoV-2 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.

5. Prepare uma mistura de reação de acordo com a Tabela 15 e misture bem invertendo o tubo 3 vezes.

Tabela 15. 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*)
Mistura de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mistura de SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Volume de reação total		–	15,00	1728

* **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.

6. Dispense 8 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NEC.
7. Dispense 10 µl de água isenta de nuclease no poço atribuído ao NTC.
8. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer em cada poço atribuído ao NEC e nas amostras preparadas.
9. 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.

10. Adicione 15 µl da mistura de reação preparada no Passo 5 aos poços dedicados a amostras e controlos (a Figura 6 é fornecida como exemplo). Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
11. Dispense 10 µl de SARS-CoV-2 Positive Control no poço apropriado. Misture pipetando para cima e para baixo 5 vezes.
12. 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.
13. Centrifugue brevemente a placa de PCR para recolher líquido no fundo dos poços.
14. **Primeira utilização:** O modelo deve ser criado no QuantStudio 5 Dx TD, versão do software 1.0.1 ou superior, e publicado antes de iniciar o ensaio no software QuantStudio 5 Dx IVD. Configure o modelo em conformidade:

Nota: No separador **Properties** (Propriedades), configure **Experiment type** (Tipo de experiência) como **Standard Curve** (Curva-padrão) e **Run mode** (Modo de ensaio) como **Standard** (Padrão).

Nota: No separador **Method** (Método), configure o programa de real-time RT-PCR para um volume de reação de 25 µl (Tabela 16).

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

Nota: No separador **Plate** (Placa), seleccione **ROX** como **Passive Reference** (Referência passiva) e configure FAM, VIC e Cy5 como Targets with no Quencher (Alvos sem supressor) (seleccione **None** [Nenhum]).

Nota: Consulte as *Instruções de utilização do QuantStudio 5 Dx* para obter mais informações.

15. No software QuantStudio 5 Dx IVD, carregue o modelo criado previamente no passo 14. Seleccione os poços utilizados e aplique os alvos FAM, VIC e Cy5.
16. Coloque a placa no ciclador de PCR em tempo real (a Figura 6 representa um exemplo da disposição da placa de PCR).
17. Inicie o ensaio.
18. Uma vez concluído o ensaio, analise os resultados (consulte a secção Resultados).

Tabela 16. Programa SARS-CoV-2 Prep&Amp UM para o QuantStudio 5 Dx

Fase	Passo	Tempo	Temperatura (°C)	Número de ciclos	Aquisição
Em espera	1. Transcrição reversa	10 min	50	1	Não
	2. Ativação inicial da PCR por calor	2 min	95	1	Não
PCR	Ciclagem de 2 passos			40	
	Desnaturação	5 s	95	1	Não
	Hibridização/extensão	30 s	58	1	FAM, VIC e Cy5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	—											
D	Sample 1											
E	Sample 2											
F	Sample #											
G	—											
H												

Figura 6. Exemplo da disposição das placas no QuantStudio 5 Dx

Resultados

Análise no RGQ MDx 5plex HRM

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 a análise de dados, deve ser utilizada a eliminação de ciclos (Figura 7): Abra o Raw Channel (Canal não processado) **Cycling A.Green**. Aceda a Options (Opções) > **Crop Start Cycles** (Eliminar ciclos de início) e introduza **5** na caixa de diálogo. Será gerado um novo canal chamado Cycling A (from 5). Green. O mesmo deve ser efetuado para os canais não processados Red e Yellow para gerar os canais **Cycling A(from 5).Red** e **Cycling A(from 5).Yellow**.

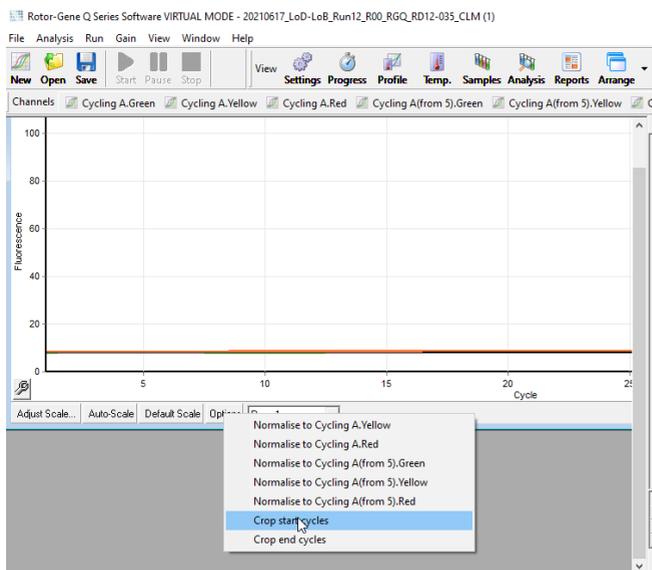


Figura 7. Capturas de ecrã da definição da eliminação de ciclos para a análise de ensaio no RGQ MDx 5plex HRM

Abra o menu de análise (Figura 8) e, para cada canal Cycling A(from 5) gerado, aplique os seguintes parâmetros de análise, de forma a manter a consistência entre as diferentes análises (Tabela 17).

Tabela 17. 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:	Sim	Não	Não
Limiar de eficiência da reação	Ativado 0%		
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 podem ser exportados em formato de texto de valores separados por vírgulas (.csv): Na janela do software RGQ, selecione **File** (Ficheiro) > **save as** (guardar como) > **Excel analysis sheet** (Folhas de análise Excel). Antes de exportar os resultados, certifique-se de que seleciona todas as amostras (Figura 8).

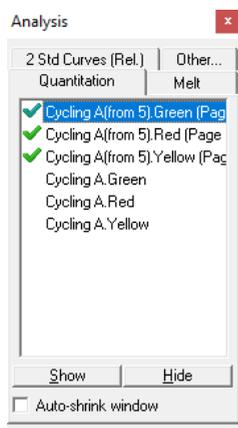


Figura 8. Captura de ecrã de canais selecionados para a aplicação de parâmetros de análise e a exportação de resultados (análise de ensaio no RGQ MDx 5plex HRM).

Análise no ABI 7500 Fast Dx

No ABI 7500 Fast Dx, os dados são analisados com o sistema 7500 Fast System, versão do software 1.4.1 (ou superior), de acordo com as instruções do fabricante. No separador **setup** (configuração), selecione um grupo de poços ou toda a placa disponível na análise e clique com o botão direito do rato para abrir as janelas do inspetor de poços. Os 3 fluoróforos (FAM, VIC e Cy5) devem ser selecionados e **ROX** deve ser selecionado como **Passive reference** (Referência passiva). Para que haja consistência entre as diferentes análises, são necessários os seguintes parâmetros (Tabela 18).

Tabela 18. Parâmetros de análise para o ABI 7500 Fast Dx

Canais	FAM	Cy5	VIC
Corante passivo	ROX	ROX	ROX
Limiar de fluorescência	0,13	0,025	0,05
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

No software ABI SDS, os valores Ct de um grupo selecionado de poços ou de toda a placa estão disponíveis na folha **data** (dados) da secção principal de **Results** (Resultados). Os dados podem ser exportados em formato de texto de valores separados por vírgulas (.csv): 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.

Análise no CFX96 Dx

No CFX96 Dx, os dados são analisados com o sistema CFX Manager Dx, versão do software 3.1.3090.1022 (ou superior), de acordo com as instruções do fabricante. Devem ser selecionados FAM, HEX e Cy5 para todos os poços utilizados na experiência. Para que haja consistência entre as diferentes análises, são necessários os seguintes parâmetros (Tabela 19).

Tabela 19. Parâmetros da análise para o CFX96 Dx

Canais	FAM	HEX	Cy5
Modo de determinação de Cq:	Sim	Sim	Sim
Limiar único			
Definição da linha de base:			
• ajuste da curva subtraído	Sim	Sim	Sim
• Aplicar correção do desvio da fluorescência	Sim	Sim	Sim
Limiar (RFU)	250	300	100
Ciclos de cut-off	Ct >39,00 é considerado como 40,00	Ct >35,00 é considerado como 40,00	Não

No software CFX manager Dx, os valores Ct (denominados **Cq** no software) de um grupo selecionado de poços ou de toda a placa estão disponíveis na folha de dados da secção **Quantification Data** (Dados da quantificação). Os dados podem ser exportados em formato de texto de valores separados por vírgulas (**.csv**) selecionando **Export** (Exportar) > **Custom Export** (Exportação personalizada) e definindo os parâmetros de acordo com a Figura 9.



Figura 9. Parâmetros de arquivo de dados brutos para o CFX96 Dx

Análise no cobas z 480

No cobas z 480, os dados são analisados com o LightCycler 480 SW UDF, versão do software 2.0.0 (ou superior), de acordo com as instruções do fabricante. Crie um subconjunto de amostras apenas com os poços utilizados na experiência. Para cada canal, crie uma página de análise **Abs Quant/Fit Points** (Quant abs/pontos de ajuste) e utilize os seguintes parâmetros para consistência entre diferentes experiências (Tabela 20).

Tabela 20. Parâmetros da análise para o cobas z 480

Canais	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Separador Cycle range (Intervalo do ciclo)	1-40	1-40	6-40
• Primeiro – último ciclo			
• Contexto	5/10	5/10	6/11
Separador Noise band (Banda de ruído)	Multiplicador STD	Multiplicador STD	Multiplicador STD
• Método			
• Valor do multiplicador STD	50	40	25
Separador Analysis (Análise)	2	2	2
• Pontos de ajuste			
• Método do limiar	Auto	Auto	Auto
Ciclo de cut-off	Ct >39,00 é considerado como 40,00	Ct >35,00 é considerado como 40,00	Não

No LightCycler 480 SW UDF, versão 2.0.0 (ou superior), os valores Ct (denominados **Cp** no software) de um grupo selecionado de poços ou de toda a placa estão disponíveis na secção **analysis** (análise) (Figura 10). Os dados podem ser exportados num formato de ficheiro de texto (**.txt**) por canal clicando com o botão direito do rato na tabela de resultados e selecionando **Export table** (Exportar tabela).

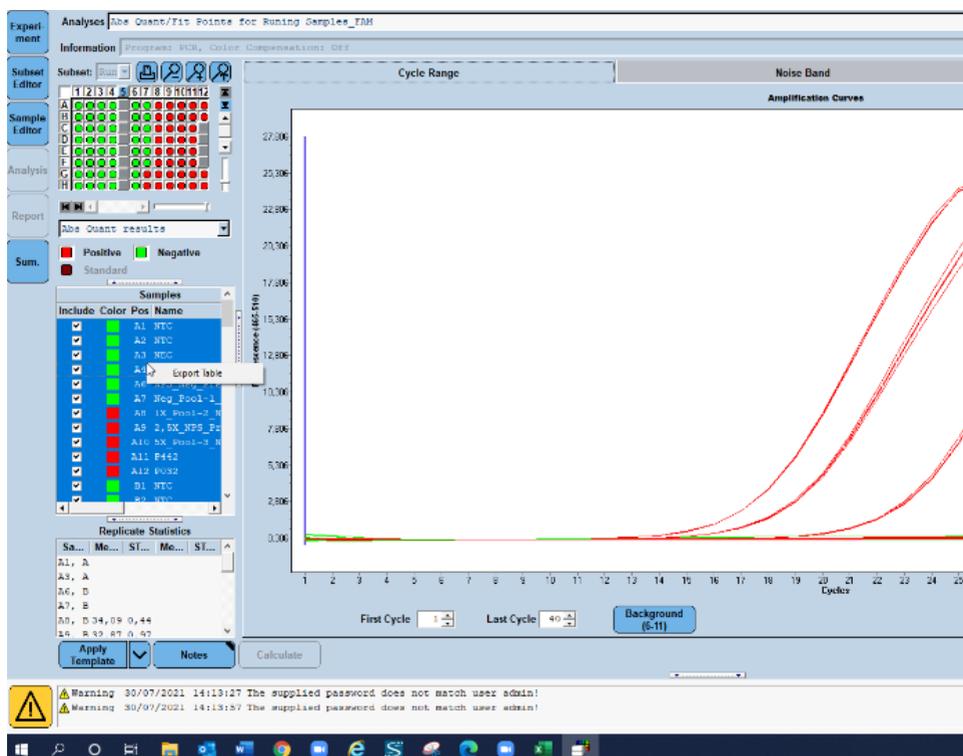


Figura 10. Captura de ecrã dos dados exportados no LightCycler 480 SW UDF, versão 2.0.0 (ou superior).

Análise no QuantStudio 5 Dx

No QuantStudio 5 Dx, os dados são analisados com o QuantStudio 5 Dx IVD, versão do software 1.0.1 (ou superior), de acordo com as instruções do fabricante. Na janela **Assign Targets and Samples** (Atribuir alvos e amostras), devem ser selecionados os 3 fluoróforos (FAM, VIC e Cy5) para todos os poços utilizados na experiência e deve ser selecionado **ROX** como **Passive reference** (Referência passiva). Para que haja consistência entre as diferentes análises, são necessários os seguintes parâmetros (Tabela 21).

Tabela 21. Parâmetros de análise para o QuantStudio 5 Dx

Canais	FAM	VIC	Cy5
Corante passivo	ROX	ROX	ROX
Limiar de fluorescência	0,21	0,062	0,04
Linha de base definida	Auto	Auto	Auto
Ciclos de cut-off	Ct >39,00 é considerado como 40,00	Ct >35,00 é considerado como 40,00	Não

Os dados podem ser exportados como uma folha de cálculo ou em formato de texto (.xls, .xlsx, .txt). No separador **Export** (Exportar) da janela do software QuantStudio 5 Dx IVD, seleccione todas as opções na secção **content** (conteúdo) e seleccione a opção **unify the above content into one file** (unificar os conteúdos acima num único ficheiro).

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 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 e QuantStudio 5 Dx.

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 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 e QuantStudio 5 Dx. Todas as amostras clínicas devem apresentar uma amplificação de controlo de amostragem. No PC, é possível observar-se uma amplificação amarela, apesar da ausência de sequências humanas. Neste caso, é possível ignorar um sinal no canal Yellow do PC, dado que o forte sinal de fluorescência no canal Green é suscetível de contaminar o canal Yellow. 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/ ATTO647N com o ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 e QuantStudio 5 Dx. Para que um ensaio de real-time RT-PCR seja válido, os controlos PC, NTC e NEC devem ter o desempenho indicado na Tabela 22 e na Tabela 23.

Tabela 22. 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	PC é válido.
	Ct >38,00 ou sem Ct	Indiferente	Indiferente	PC é inválido.
Controlo sem modelo (No Template Control, NTC) ou	Ct > 38,00 ou sem Ct	Ct > 35,00 ou sem Ct	Sim	NTC/NEC é válido.
Controlo negativo de extração (No Extraction Control, NEC)	Quaisquer outras combinações com amplificação no canal Green ou Yellow		Indiferente	NTC/NEC é inválido.

Tabela 23. Critérios de validação de ensaios e interpretação de resultados para os instrumentos de real-time RT-PCR ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 e QuantiStudio 5 Dx

Controlo	Deteção no corante FAM*	Deteção no corante VIC/HEX*	Deteção no corante Cy5/ATTO647N*	Interpretação
Controlo positivo (Positive Control, PC)	Ct ≤ 39,00	Indiferente	Indiferente	PC é válido.
	Ct > 39,00 ou sem Ct	Indiferente	Indiferente	PC é inválido.
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	NTC/NEC é válido.
	Quaisquer outras combinações com amplificação em FAM ou VIC/HEX		Indiferente	NTC/NEC é inválido.

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

Tabela 24. 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 real-time RT-PCR foi inibida. É necessário repetir o teste.

Tabela 25. Critérios de validação de amostras e interpretação de resultados para os instrumentos ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 e QuantiStudio 5 Dx real-time RT-PCR.

Deteção no corante FAM*	Deteção no corante VIC/HEX*	Deteção no corante Cy5/ATTO647N*	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 real-time RT-PCR foi inibida. É necessário repetir o teste.

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 real-time RT-PCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ou QuantStudio 5 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.
- O desempenho deste teste não foi determinado para espécimes de saliva de pacientes sem sinais ou sintomas de infecção respiratória.
- Para evitar o risco de obter um resultado falso-negativo caso seja testada uma amostra clínica fracamente positiva quando são observados vestígios de sangue no tubo, tal deve ser registado e se a amostra tiver um resultado negativo ao utilizar o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, esta deve ser novamente colhida do paciente e deve ser testada novamente utilizando o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

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 e amostras de saliva pura liquefeitas, preparadas com stocks de alta titulação de partículas virais inativadas obtidos de fornecedores comerciais (ZeptoMetrix®). Foram utilizados dois pools de amostras para cada espécime para as experiências do limite de detecção (Limit of Detection, LoD). 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 do limite de detecção (Limit of Detection, LoD) foi verificada em espécimes nasofaríngeos e de saliva nas plataformas de real-time RT-PCR declaradas (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx e cobas z 480).

Amostras nasais, orofaríngeas e nasofaríngeas

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD) é declarado a 950 cp/ml para o RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx e QuantStudio 5 Dx e a 475 cp/ml para o cobas z 480 (consulte a Tabela 26)

Amostras de saliva pura

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD) é declarado a 950 cp/ml para o RGQ MDx e a 1200 cp/ml para o ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx e CFX96 Dx (consulte a Tabela 26).

Tabela 26. Resumo dos resultados do limite de detecção (Limit of Detection, LoD) para cada plataforma de real time RT-PCR

Plataforma	Tipo de espécime	Limite de detecção (Limit of Detection, LoD) verificado (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Saliva pura	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Saliva pura	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Saliva pura	1200
cobas z 480	NPS	475
	Saliva pura	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Saliva pura	1200

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 detetar 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* (Tabela 27) 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*. A Tabela 27 apresenta a lista de agentes patogênicos analisados *in silico*.

Tabela 27. Lista de agentes patogênicos testados *in silico*.

Agentes patogênicos	Estirpe/tipo	ID de taxonomia	Resultados de PCR <i>in silico</i>
Adenovírus Tipo 3	Tipo 3	45659	Sem correspondência
Adenovírus Tipo 4	Tipo 4	28280	Sem correspondência
Adenovírus Tipo 5	Tipo 5	28285	Sem correspondência
Adenovírus Tipo 7A	Tipo 7A	85755	Sem correspondência
Adenovírus Tipo 14	Tipo 14	10521	Sem correspondência
Adenovírus Tipo 31	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
Enterovírus	Tipo 68	42789	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 27. (Continuação da página anterior)

Agentes patogênicos	Estirpe/tipo	ID de taxonomia	Resultados de PCR <i>in silico</i>
<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
Metapneumovírus 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
<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 $\geq 80\%$ 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 10^6 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 avaliada *in vitro* num painel de agentes patogênicos recomendados (Tabela 28). Foram preparadas amostras através da adição de um máximo de cinco agentes patogênicos — a 10^5 TCID₅₀/ml para alvos virais, 10^6 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 $2,87 \times$ limite de detecção (Limit of Detection, LoD). Os painéis NATrol™ e o SARS-CoV-1 foram enriquecidos diretamente com partículas de SARS-CoV-2 inativadas (Zeptomatrix) a $2,87 \times$ limite de detecção (Limit of Detection, LoD). Os resultados para cada pool de microrganismos testado e as respectivas concentrações estão resumidos abaixo.

A Tabela 28 apresenta a lista de agentes patogênicos analisados na interferência microbiana.

Tabela 28. Lista de agentes patogênicos 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	TCID ₅₀ /ml	
	Coronavírus humano OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5.86E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Coronavírus humano NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2.84E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Adenovírus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1.43E+05	TCID ₅₀ /ml	
	Vírus parainfluenza 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9.14E+06	TCID ₅₀ /ml	
Pool 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/ml	Sem interferência
	Adenovírus T3 1	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1.67E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Vírus parainfluenza 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4.29E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1.43E+05	TCID ₅₀ /ml	
	Rinovírus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2.86E+04	TCID ₅₀ /ml	

(continuação na página seguinte)

Tabela 28 (continuação da página anterior)

ID do pool/ID da amostra	Microrganismo	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 California	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 28 (continuação da página anterior)

ID do pool/ID da amostra	Microrganismo	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> (CVL029), <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

Amostras de esfregaços nasais, orofaríngeos e nasofaríngeos

O efeito de substâncias interferentes putativas (para as substâncias indicadas na Tabela 29) foi avaliado para 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 Green e Red foram comparadas entre o teste e as suas amostras de controlo correspondentes. Na ausência de interferência, o teste e as suas respectivas amostras de controlo apresentam a mesma taxa de incidência.

A Tabela 29 mostra que nenhuma das substâncias testadas interfere com o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit no canal de fluorescência Green.

Tabela 29. Lista de substâncias interferentes e as taxas de incidência obtidas no canal Green.

Substâncias interferentes	Função	Concentração testada	Resultados da taxa de incidência num esfregaço nasofaríngeo negativo	Resultados da taxa de incidência num esfregaço nasofaríngeo positivo (4x limite de detecção [Limit of Detection, LoD])
Tobramicina	Antibiótico sistémico	1 mg/ml	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Mupirocina	Pomada nasal antibiótica	6,6 mg/ml	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Fluticasona	Corticosteroide nasal	5% (v/v)	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Mentol (pastilhas para a garganta)	Anestésico e analgésico oral	0,5 mg/ml	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Oximetazolina	Pulverizador nasal	10% (v/v)	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Oseltamivir	Fármaco antiviral	3,3 mg/ml	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Mucina (glândula submandibular bovina, tipo I-S)		2,5 mg/ml	Sem interferência 0/15	Sem interferência 15/15
Sangue total		4% (v/v)	Sem interferência 1/15*	Sem interferência 15/15

* Foi detetada uma amplificação correspondente a um artefacto.

Amostras de saliva pura

O efeito de oito substâncias interferentes putativas (para as substâncias indicadas na Tabela 30) foi avaliado para o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Foram realizados testes em 1 pool de amostras de saliva pura negativas, o qual foi dividido ao meio para efetuar dois níveis de diluição: (1) amostras de saliva pura negativas e (2) amostras de saliva pura positivas artificiais (obtidas através da adição de 3x limite de detecção [Limit of Detection, LoD] [3600 cp/ml]) com partículas virais de SARS-CoV-2 inativadas [Zeptomatrix] no pool negativo). As amostras de saliva pura foram analisadas com a plataforma cobas z 480 por 3 operadores utilizando um kit comercial.

Para cada substância interferente, os duplicados de amostra foram divididos 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 Green, Red e Yellow 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.

Em termos de análise qualitativa (estado da amostra), as oito substâncias interferentes testadas (consulte a Tabela 30) não tiveram qualquer impacto nos resultados do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit em amostras de saliva positivas e negativas.

A Tabela 30 mostra que nenhuma das substâncias testadas interfere com o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit no canal de fluorescência Green.

Tabela 30. Lista de substâncias interferentes e as taxas de incidência obtidas no canal Green.

Substância interferente*	Função	Concentração testada	Resultados de taxa de incidência em amostras de saliva pura negativas	Resultados da taxa de incidência em amostras de saliva pura positivas (3 a 5x limite de detecção [Limit of Detection, LoD])
Sangue total	Substâncias endógenas: ADNg humano, leucócitos, eritrócitos	1% v/v	Sem interferência* 0/8	Sem interferência* 8/8
Altoids®	Rebuçado	2% p/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Aspirina	Fármaco anti-inflamatório	1% p/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Listerine®	Elixir oral antisséptico	1% v/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Ricola®	Rebuçado	1% p/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Pasta dentífrica Colgate® Total SF Whitening™	Pasta dentífrica branqueadora	0,1% p/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Xarope Tussidane®	Fármaco antitússico	1% v/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8
Pulmofluide®	Fármaco mucolítico	1% v/v	Sem interferência 0/8	Sem interferência 8/8

*Para o sangue total, foi observado um efeito interferente para a detecção do IC no canal Red (10–40% de inibição) sem afetar a validade da amostra. No canal Green, o estado da amostra não foi afetado pelo sangue total, mas foi observado um ligeiro desvio de Ct (em média 1,35 Ct posteriormente com sangue total em comparação com a amostra de controlo).

Para evitar o risco de obter um falso-negativo no caso de uma amostra clínica fracamente positiva analisada se forem observados vestígios de sangue no tubo, tal deve ser registado e se a amostra tiver um resultado negativo utilizando o *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*, deve ser novamente colhida saliva pura do paciente e a amostra deve ser analisada novamente com o *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*.

Estudo de estabilidade da amostra

O estudo de estabilidade da amostra foi realizado para avaliar o impacto de diferentes condições de armazenamento de amostras nos resultados qualitativos (análise da taxa de incidência) e quantitativos (análise do desvio de Ct) dos *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kits. Foram realizadas experiências analisando dois níveis de diluição: (1) amostras negativas e (2) amostras positivas artificiais obtidas através da adição de partículas virais de SARS-CoV-2 inativadas (Zeptomatrix). Para confirmar a estabilidade das amostras (saliva e esfregaço nasofaríngeo [Nasopharyngeal Swab, NPS]) foi necessário que $\geq 95\%$ dos duplicados tivessem a mesma taxa de incidência e um desvio de Ct $\leq 10\%$ do momento 0 para cada condição de estabilidade ocorrida.

Amostras nasais, orofaríngeas e nasofaríngeas:

As diferentes condições de estabilidade analisadas estão listadas na Tabela 31. Foram realizados testes utilizando 3 pools de amostras. Através da plataforma ABI 7500 Fast Dx, foram analisadas amostras de NPS negativas, 5x limite de detecção (Limit of Detection, LoD) (4750 cp/ml) de amostras de NPS positivas artificiais e três lotes de amostras de libertação do lote BRS1 (sequência N2, 1000 cp/10 μ l), BRS2 (gblock de RNase P, 1000 cp/10 μ l) e BRS3 (sequência N1, 1000 cp/10 μ l).

Com base nos resultados da análise qualitativa e quantitativa, as condições de armazenamento de amostras NPS analisadas não afetaram a taxa de incidência (foi detectado o mesmo estado, tal como esperado) e não levaram a desvios de Ct significativos dos resultados do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Assim, o desempenho do kit foi estável apesar de todas as diferentes condições de armazenamento das amostras de NPS analisadas (consulte a Tabela 31).

A Tabela 31 apresenta as condições de estabilidades das amostras nasofaríngeas

Tabela 31. Condições de estabilidade da amostra nasofaríngea.

Condições	Alegação da estabilidade da amostra
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C a 8 °C)	72 h
-70 °C	2 semanas

Amostras de saliva pura

As diferentes condições de estabilidade analisadas estão listadas nas Tabela 32. Foram realizados testes utilizando 2 pools de amostras. Foram analisadas amostras de saliva pura negativas e 3x limite de detecção (Limit of Detection, LoD) (3600 cp/ml) de amostras de saliva pura positivas artificiais utilizando a plataforma ABI 7500 Fast Dx.

Com base nos resultados da análise qualitativa e quantitativa, as condições de armazenamento analisadas não afetaram a taxa de incidência (foi detetado o mesmo estado, tal como esperado) e não levaram a desvios de Ct significativos dos resultados do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Assim, o desempenho do kit foi estável apesar das diferentes condições de armazenamento das amostras de saliva pura analisadas.

A Tabela 32 apresenta as condições de estabilidades da saliva pura.

Tabela 32. Condição de estabilidade da amostra de saliva pura

Condições	Alegação da estabilidade da amostra
F/T	3 F/T
Temperatura ambiente (18 °C a 26 °C)	72 h
4 °C (2 °C a 8 °C)	72 h
Condição combinada: (6 h à temperatura ambiente combinado com 72 h a 4 °C (2 a 8 °C) combinado com 8 dias a -20 °C (-30 °C a -15 °C)	6 h à temperatura ambiente seguido de 72 h a 4 °C (2 a 8 °C) e, em seguida, 7 dias a -20 °C (-30 °C a -15 °C)
-20 °C (-30 °C a -15 °C)	1 mês (30,5 dias)

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 Green, Yellow e Red. A Tabela 33 mostra que o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit tem uma precisão geral de 0,63 SD (2,03% CV) no canal Green, 0,54 SD (2,22% CV) no canal Yellow e de 1,28 SD (4,10% CV) no canal Red.

Tabela 33. 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 Canal Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
NPS negativo Canal Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
NPS enriquecido Canal Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
NPS enriquecido Canal Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
NPS enriquecido Canal Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Desempenho clínico

Esfregaços nasofaríngeos

O desempenho clínico do ensaio *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp foi avaliado utilizando espécimes de esfregaço nasofaríngeo retrospectivos em meio de transporte, consistindo em 150 espécimes clínicos.

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 34 apresenta o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a um método de referência.

Tabela 34. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a um método de referência.

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativos	98	5,1 (5/98)	-	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 apresentados na Tabela 35.

Tabela 35. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit após análise de resultados discordantes.

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	–
Negativos	98	5,1 (5/98)	–	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%)

Esfregaços nasofaríngeos incluindo indivíduos assintomáticos

O desempenho clínico do ensaio *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp foi avaliado utilizando espécimes de esfregaço nasofaríngeo retrospectivos em meio de transporte, consistindo em 153 espécimes clínicos.

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 23).

A Tabela 36 compara o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a 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 36. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a um método de referência

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	36,0 (18/50)	–
Negativos	87	1,15 (1/87)	–	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 apresentados na Tabela 37.

Tabela 37. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit após análise de resultados discordantes.

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	-
Negativos	105	0,95 (1/105)	-	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%)

Amostras de saliva pura

O desempenho clínico do ensaio *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp foi avaliado utilizando espécimes de saliva pura, consistindo em 142 espécimes de saliva.

Todos os espécimes foram colhidos de pacientes com sinais e sintomas de infeção por COVID-19. A validação clínica foi realizada no ABI 7500 Fast Dx. Doze amostras foram excluídas da análise após a testagem com o *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit e o método de referência devido ao facto de ambos os testes produzirem um estado inválido de acordo com os critérios de validade de amostras.

A Tabela 38 apresenta o desempenho do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a um método de referência.

Tabela 38. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit face a um método de referência.

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	-
Negativos	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68–100,00

Foram avaliados três 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 apresentados na Tabela 39.

Tabela 39. Desempenho clínico do *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit após análise de resultados discordantes.

Estado da amostra	N	% de positivos	IC de 95%	% de negativos	IC de 95%
Positivos	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	-
Negativos	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77–100,00

Dois resultados falso-negativos foram reclassificados como verdadeiros negativos, enquanto um resultado falso-negativo permaneceu falso-negativo.

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): $42/43 = 97,67\%$ (IC de 95%: 87,94%–99,59%)

Concordância na percentagem de negativos

(Negative Percent Agreement, NPA): $87/87 = 100,00\%$ (IC de 95%: 95,77%–100,00%)

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 (Green) para os alvos de RT-PCR analíticos de SARS-CoV-2, o canal de fluorescência HEX/VIC/JOE (Yellow) para o controlo de amostragem e Cy5/Atto (Red) 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 real time RT-PCR durante a configuração de dados. | Aplique as configurações recomendadas relacionadas com a sua plataforma de real time RT-PCR 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 real time RT-PCR durante a configuração de dados.
- Aplique as configurações recomendadas relacionadas com a sua plataforma de real time RT-PCR 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.
- Cumpra as 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 real-time RT-PCR durante a configuração de dados.
- Aplique as configurações relacionadas com a sua plataforma de real time RT-PCR 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
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
REF	Número de catálogo
LOT	Número de lote
COMP	Componentes
CONT	Conteúdo
NUM	Número
GTIN	Número global de item comercial
R_n	R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão
	Limitação de temperatura

Símbolo	Definição do símbolo
	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 for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Para utilização com rotor de 72 poços, tubos de tiras e tampas	981103
Rotor-Gene Q software	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
72-Well Rotor	Para conter Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, com volumes de reação de 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Para bloquear Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, no 72-Well Rotor	9018904

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. A utilização prevista foi atualizada para incluir indivíduos sem sintomas ou outros motivos para se suspeitar de infecção por COVID-19. Foi adicionada uma seção sobre desempenho clínico incluindo indivíduos assintomáticos aos dados de desempenho.
R3, setembro de 2021	Extensão da alegação: <ol style="list-style-type: none">1. Adição de testagem utilizando espécimes de saliva.2. Modificação do fluxo de trabalho.3. Para utilização com três plataformas adicionais e o respectivo software: CFX96 Dx com CFX Manager Dx, versão do software 3.1.3090.1022 (ou superior), cobas z 480 com LightCycler 480 SW UDF versão 2.0.0 (ou superior) e QuantStudio 5 Dx com QuantStudio 5 Dx IVD, versão do software 1.0.1 (ou superior).4. O limite de detecção de três plataformas adicionais (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) foi adicionado à seção de desempenho para amostras de esfregaço nasofaríngeo, nasal e orofaríngeo.5. A seção de características de desempenho foi atualizada.6. Foram mantidos apenas canais de fluorescência (Green, Red, Yellow) para os instrumentos RGQ (os nomes do corante entre parênteses foram eliminados).7. Foram mantidos nomes dos corantes apenas para o CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 e QuantStudio 5 Dx.8. Para o ABI7500 Fast Dx, os filtros de fluorescência A/1, B/2 e E/5 foram eliminados. Apenas foram mantidos os nomes de corantes (Fam, Vic, and Cy5).9. Alterações nas Tabelas 34–37 na seção de desempenho clínico para clarificar a apresentação.
R4, janeiro de 2022	Correção de erro de impressão na Tabela 39.

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, reconicionados 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*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); Pulmofluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricola® (Ricola Group); cobas®, LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific or its Subsidiaries); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Os nomes registrados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

01/2022 R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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