

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (IVD)

Ensaio qualitativo para utilização em
instrumentos de RT-PCR em tempo real

Instruções de Utilização

EUA: Apenas para Rx



REF 12015534

SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (1 cada)

Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (1 cada)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard (2 cada)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative (2 cada)



Bio-Rad Laboratories, Inc.
4000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA USA 94547



FRANCE, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette,

Traduções

Os documentos relativos ao produto podem ser fornecidos noutras línguas em suporte eletrónico.

Dicionário de símbolos

 Conformidade Europeia	 Fabricante	 Representante autorizado na União Europeia
 Número do lote	 Utilizar até	 Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
 Limite de temperatura	 Número de catálogo	 Consulte as instruções de utilização
 Número de testes	 Para utilizar com	 Número de série
Rx Only Sujeito a receita médica	 Identificação Única do Dispositivo – Identificador do Dispositivo	 Contém látex
 Apenas para utilização em investigação	 Apenas para utilização única	 Risco biológico

Avisos legais

Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida ou transmitida sob qualquer forma ou por qualquer meio, eletrónico ou mecânico, inclusive fotocópia, gravação ou qualquer sistema de armazenamento ou recuperação de informações, sem autorização por escrito da Bio-Rad Laboratories.

A Bio-Rad reserva-se o direito de modificar os seus produtos e serviços a qualquer momento. Este manual de instruções está sujeito a alterações sem aviso prévio. Embora preparado para garantir a exatidão, a Bio-Rad não se responsabiliza por erros, ou por qualquer dano resultante da aplicação ou utilização desta informação.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

BIO-RAD, HARD-SHELL e MICROSEAL são marcas registadas da Bio-Rad Laboratories, Inc. Em determinadas jurisdições.

As placas Hard-Shell estão protegidas por uma ou mais das seguintes patentes dos EUA ou suas homólogas estrangeiras detidas pela Eppendorf AG: EUA Números de patentes 7,347,977; 6,340,589; e 6,528,302.

Todas as marcas registadas utilizadas neste documento são propriedade dos seus respetivos titulares.

Este produto e/ou a sua utilização estão abrangidos(as) por reivindicações de patentes norte-americanas e/ou por pedidos de patente pendentes nos EUA ou em outros países, detidas por ou sob licença para a Bio-Rad Laboratories, Inc. A compra do produto inclui um direito limitado, não transferível, ao abrigo dessa propriedade intelectual, para utilização do produto exclusivamente para fins de investigação interna e diagnóstico. Apenas para efeitos da COVID-19, a Bio-Rad concede os direitos de utilização do produto para aplicações comerciais de qualquer tipo, incluindo, mas não se limitando a, fabrico, controlo de qualidade ou serviços comerciais, tais como serviços contratuais ou taxas de serviços. As informações relativas a uma licença para essas utilizações podem ser obtidas junto da Bio-Rad Laboratories. Para qualquer finalidade além dos testes COVID-19, é da responsabilidade do comprador/utilizador final adquirir quaisquer direitos de propriedade intelectual adicionais que possam ser necessários.

Avisos e precauções do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Para utilização por profissionais de saúde.

Este kit de teste deve ser manuseado apenas por pessoal qualificado, com formação em procedimentos laboratoriais e familiarizado com os seus riscos potenciais. Utilize vestuário de proteção, luvas e proteção ocular/facial adequados e manuseie adequadamente de acordo com as Boas Práticas de Laboratório exigidas.

Equipamento de proteção individual (EPI)

Recomenda-se a utilização adequada de luvas ao utilizar componentes e placas de amostra. As luvas com capacidade de proteção reduzida devem ser eliminadas e substituídas. Considere a toxicidade dos produtos químicos e fatores como a duração da exposição, o armazenamento e a temperatura ao decidir reutilizar luvas expostas quimicamente. Recursos para auxiliar na seleção de luvas para o manuseamento de máquinas, ensaios, óleos e solventes de limpeza:

- As luvas de butilo são feitas de borracha sintética e protegem contra peróxido, ácido fluorídrico, bases fortes, álcoois, aldeídos e cetonas.
- As luvas de borracha (látex) natural são confortáveis de utilizar e apresentam excelente resistência à tração, elasticidade e resistência à temperatura.
- As luvas de neopreno são feitas de borracha sintética e oferecem boa maleabilidade, destreza dos dedos, alta densidade e resistência ao rasgo; conferem proteção contra álcoois, ácidos orgânicos e alcalinos.
- As luvas de nitrilo são feitas de um copolímero e conferem proteção contra solventes clorados,

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

como o tricloroetileno e o tetracloroetileno; oferecem proteção ao trabalhar com óleos, gorduras, ácidos e substâncias cáusticas.

Índice

Traduções.....	2
Dicionário de símbolos.....	2
Avisos legais	2
Avisos e precauções do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit.....	3
Equipamento de proteção individual (EPI)	3
Utilização prevista.....	7
Resumo e Princípio	7
Fluxo de trabalho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	8
Reagentes e instrumentos	8
Materiais fornecidos	8
Materiais necessários, mas não fornecidos.....	9
Precauções e avisos gerais.....	10
Colheita, manuseamento e armazenamento de amostras	11
Utilização de materiais de controlo	12
Manuseamento e armazenamento dos reagentes.....	12
Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit.....	12
Áreas de trabalho.....	12
Manuseamento geral.....	13
Protocolo do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit.....	13
Visão geral.....	13
Extração de ácidos nucleicos	14
Preparação da reação RT-PCR numa etapa	14
Configuração do instrumento Bio-Rad CFX96 Dx	15
Executar a placa de RT-PCR no sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx.....	17
Análise de dados no sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx.....	17
Configuração do instrumento AB7500 Fast Dx.....	18
Análise de dados no sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx.....	19
Interpretação de resultados	20
Controlos do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit – NTC, Positivo e Negativo	20
Exame e interpretação dos resultados das amostras do paciente	20
Limitações	22
Características de desempenho analítico	23
Sensibilidade analítica.....	23

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Inclusividade	25
Especificidade analítica (reatividade cruzada)	25
Avaliação clínica	27
Referências.....	28
Anexo A: Protocolo de qualificação do instrumento	29

Utilização prevista

O kit de ensaio de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) do SARS-CoV-2 Reliance da Bio-Rad destina-se à detecção qualitativa dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 em amostras de exsudado nasofaríngeo de indivíduos suspeitos de COVID-19 pelo seu profissional de saúde. Os resultados destinam-se à identificação do RNA do SARS-CoV-2, que é geralmente detetável em amostras do trato respiratório superior durante a fase aguda da infeção. Os resultados positivos são indicativos da presença de RNA do SARS-CoV-2; é necessária a correlação clínica com a história do paciente e outra informação de diagnóstico para determinar o estado de infeção do paciente. Os resultados positivos não excluem infeção bacteriana ou coinfeção com outros vírus. Os resultados negativos não excluem a infeção por SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como a única base para decisões sobre o tratamento do paciente. Os resultados negativos devem ser combinados com as observações clínicas, a história do paciente e informações epidemiológicas.

O Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit destina-se a ser utilizado por pessoal clínico qualificado, especificamente treinado e instruído em técnicas RT-PCR e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

Resumo e Princípio

Um surto de pneumonia causado por um novo coronavírus (SARS-CoV-2) na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, foi identificado e notificado à Organização Mundial da Saúde (OMS) em 31 de dezembro de 2019. A rápida disseminação do SARS-CoV-2 para várias áreas em todo o mundo exige preparação e resposta nas instalações de saúde e laboratórios. A disponibilidade de ensaios específicos e sensíveis para detecção do vírus é essencial para o diagnóstico preciso dos casos, a avaliação da extensão do surto, a monitorização das estratégias de intervenção e os estudos de vigilância.

O Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit é um teste de diagnóstico molecular *in vitro* que contém os reagentes necessários para realizar um teste de RT-PCR. Os conjuntos de iniciador e sonda foram concebidos para a detecção de RNA do vírus SARS-CoV-2 em amostras de exsudado nasofaríngeo de pacientes com suspeita de COVID-19. Devem ser realizados testes e procedimentos de confirmação adicionais em consulta com as autoridades de saúde pública e/ou outras autoridades às quais é exigido reportar. Os resultados dos testes devem também ser comunicados de acordo com os requisitos regulamentares. O desempenho é desconhecido em pacientes assintomáticos.

Os iniciadores e as sondas de oligonucleótidos para detecção do SARS-CoV-2 são os mesmos que os comunicados pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA e foram selecionados a partir de regiões do gene do nucleocapsídeo (N1 e N2) do vírus. O painel foi concebido para a detecção específica do SARS-CoV-2 (dois conjuntos de iniciador/sonda). No painel é também incluído um conjunto de iniciador/sonda adicional para detecção do gene da RNase P (RP) humana em amostras de controlo e amostras clínicas. Para realizar um teste, o RNA é isolado e purificado a partir de amostras de controlo e de amostras clínicas, sendo em seguida adicionado a uma mistura-mestre feita utilizando o Bio-Rad Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. A mistura-mestre inclui uma transcriptase reversa que transcreve RNA em cDNA e uma DNA polimerase que amplifica os fragmentos de cDNA que partilham homologia com os conjuntos de iniciador/sonda. A amplificação de alvos específicos é monitorizada pela alteração na intensidade de fluorescência em comprimentos de onda de excitação/emissão específicos utilizando um instrumento de PCR em tempo real.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

O Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit pode ser utilizado com o sistema CFX96 Dx da Bio-Rad e o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx da Thermo Fisher Scientific, Inc. (Tabela 1). O fluxo de trabalho consiste em quatro etapas (Tabela 2).

Tabela 1. Instrumentos necessários

Número de catálogo	Nome do produto	Software
1845097-IVD 1841000-IVD	CFX96 Dx ORM Termociclador C1000 Dx	Software CFX Manager Dx, v 3.1 e superior
4406985 ou 4406984	Sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx	Software SDS v1.4.1 e superior

Fluxo de trabalho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Tabela 2. Fluxo de trabalho do Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Fluxo de trabalho	
Etapa 1	Isolamento de RNA viral de amostras de exsudado nasofaríngeo
Etapa 2	Configuração da placa de RT-PCR
Etapa 3	Transcrição reversa e PCR numa etapa
Etapa 4	Análise

Reagentes e instrumentos

Materiais fornecidos

O Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit contém reagentes suficientes para processar um total de 200 reações (Tabela 3).

Tabela 3. Materiais necessários incluídos no kit para o Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Nome do produto	Número de referência	QTD (Tubos)	Volume (µl)	Condições de armazenamento, °C
4x Reliance One-Step Multiplex Supermix	12010177	1	1000	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	16008441	2	300	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	16008440	2	300	-20 °C
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	12014116	1	300	-20 °C

Nota: As Fichas de Dados de Segurança (SDS) estão disponíveis em bio-rad.com

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Materiais necessários, mas não fornecidos

Reagentes e consumíveis:

Reagentes para purificação de RNA

O Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Catálogo #A48310, #A42352) e o QIAGEN QIAamp Viral Mini Kit (Catálogo #52906, #52904) são validados para utilizar com o Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit de acordo com as instruções do fabricante.

Nota: A extração automatizada (no QIAcube ou no Kingfisher) utilizando estes kits é suportada pelos fabricantes e requer validação.

Reagentes e consumíveis genéricos para PCR em tempo real

É necessário tampão fosfato salino, pH 7.4 (Catálogo Thermo Fisher # 10010023, ou equivalente) para a preparação dos controles. Os materiais adicionais necessários, mas não fornecidos, para a execução do Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit nos sistemas de PCR em tempo real Bio-Rad e Thermo Fisher Scientific estão listados em Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4. Materiais necessários, mas não fornecidos, para a execução no sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx

Catálogo Bio-Rad #	Nome	QTD (cada)	Condições de armazenamento
MSB1001	Película de selagem para placas de PCR Microseal 'B', adesiva, ótica	100	15 °C a 30°C
HSP9955 ou equivalente*	HSP9955, placas de PCR Hard-Shell de 96 poços, baixo perfil, parede fina, com contorno, branco/branco	50	15 °C a 30°C

* Consulte a brochura 5496 de Placas de PCR Hard-Shell da Bio-Rad para outras placas de PCR de 96 poços de revestimento a cores/poços brancos

Tabela 5. Materiais necessários, mas não fornecidos, para a execução no sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx

Catálogo Thermo Fisher Scientific #	Nome do produto	QTD (cada)	Condições de armazenamento
4311971	Película adesiva ótica MicroAmp	100	15 °C a 30°C
4346906	Placa de reação de 96 poços MicroAmp Fast Optical com código de barras, 0,1 ml	20	15 °C a 30°C

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Instrumentação, software e equipamento geral de laboratório:

O equipamento geral de laboratório necessário, mas não fornecido, para a execução do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit está listado na Tabela 6.

Tabela 6. Equipamento geral de laboratório necessário, mas não fornecido

Descrição	Fonte
Pipetas ajustáveis multicanal e monocanal (1,00 µl a 1.000 µl)	Rainin ou Eppendorf
Microcentrífuga	Vários fornecedores
Centrífuga para microplacas, com rotor que acomoda microplacas padrão	Vários fornecedores
Misturador de laboratório, agitador vórtex ou equivalente	Vários fornecedores
Congeladores de laboratório • -30 °C a -10 °C • ≤ -70 °C	Vários fornecedores
Bloco frio ou gelo de 96 poços	Vários fornecedores
Tubos de microcentrífuga livres de RNase, não aderentes (1,5 ml e 2,0 ml)	Vários fornecedores
Pontas de pipeta com filtro de barreira contra aerossóis, estéreis	Vários fornecedores

Precauções e avisos gerais

1. Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro* (IVD).
2. Apenas para utilização por profissionais.
3. Os resultados positivos são indicativos da presença de RNA de SARS-CoV-2.
4. Todas as amostras biológicas devem ser tratadas como se pudessem transmitir agentes infecciosos. Utilize procedimentos laboratoriais seguros.
5. Limpe e desinfete minuciosamente todas as superfícies de trabalho com uma solução recém-preparada de hipoclorito de sódio a 0,5 % (lixívia a 10 %) em água desionizada ou destilada, seguida de álcool a 70 %.
6. Para minimizar a contaminação por ácidos nucleicos, descontamine rotineiramente o espaço da bancada, pipetadores e equipamentos, e separe a amostra e a área de manipulação de RNA/DNA da área de preparação do ensaio.
7. Otimize o fluxo de trabalho e o espaço para minimizar o risco de contaminação residual de reações de PCR concluídas.
8. Certifique-se de que o sistema de PCR em tempo real e o sistema de automação tenham um espaço dedicado em áreas separadas para evitar a contaminação com amplicons.
9. Realize a configuração do ensaio e a adição do modelo em locais diferentes com pipetadores dedicados.
10. Utilize procedimentos de segurança laboratorial adequados para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras.
11. Troque de luvas com frequência ao transportar e trabalhar com reagentes diferentes.
12. O não cumprimento dos procedimentos e condições descritos neste documento pode causar resultados incorretos e efeitos adversos.
13. Não substitua os reagentes do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit por outros reagentes.
14. A configuração e a adição do modelo devem ser realizadas em condições livres de RNase/DNase.
15. Recomenda-se que os instrumentos sejam devidamente verificados antes de serem utilizados com o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit, utilizando protocolos de teste estabelecidos. Consulte o protocolo de qualificação do instrumento fornecido no Anexo A.

16. Certifique-se de que a manutenção e calibração regulares são realizadas em todos os equipamentos de acordo com as recomendações do fabricante.
17. Utilize pontas e reagentes livres de nuclease e limpe os pipetadores rotineiramente.
18. Certifique-se que é utilizado apenas o protocolo de ciclagem térmica recomendado.
19. Não utilize água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para amplificação de PCR.
20. Siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos para garantir que o teste é realizado corretamente. Qualquer desvio dos procedimentos e diretrizes pode afetar o desempenho ideal do teste.
21. Podem ocorrer resultados falso-positivos se a contaminação cruzada não for adequadamente controlada durante o manuseamento e processamento da amostra.

Colheita, manuseamento e armazenamento de amostras

A colheita, armazenamento e o transporte adequados e apropriados das amostras são importantes para obter resultados de teste sensíveis e precisos. Recomenda-se fortemente a formação em procedimentos corretos de colheita de amostras, a fim de garantir amostras e resultados de boa qualidade. A norma MM13-Ed2 (agosto de 2020) do CLSI pode ser referenciada como um recurso apropriado.

1. Critérios de aceitação da amostra
 - As amostras devem ser colhidas em tubos estéreis e etiquetados, e enviadas de acordo com os requisitos do laboratório de testes.
2. Critérios de rejeição de amostras
 - As amostras que não foram pré-aprovadas para teste e as amostras etiquetadas incorretamente não serão testadas até que as informações necessárias sejam obtidas.
3. Colheita da amostra
 - Consulte as diretrizes do CDC ou da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a Colheita, Manuseamento e Testagem de Amostras Clínicas de Pessoas sob Investigação para a Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) (Collection, Handling and Testing of Clinical Specimens from persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)).
 - Siga as instruções do fabricante para uma utilização adequada dos dispositivos de colheita de amostras
 - As amostras de exsudado devem ser colhidas apenas com zaragatoas com ponta sintética, como nylon ou Dacron®, e uma haste de alumínio ou plástico. As zaragatoas de aluminato de cálcio não são aceitáveis e não se recomenda a utilização de zaragatoas de algodão com hastes de madeira. Coloque as zaragatoas imediatamente em tubos estéreis contendo 2-3 ml de meio de transporte viral ou meio de transporte universal
4. Transporte das amostras
 - As amostras devem ser embaladas, enviadas e transportadas de acordo com a edição atual do Regulamento de Mercadorias Perigosas da International Air Transport Association (IATA). Siga os regulamentos de envio segundo o N.º 3373 da ONU — Matéria Biológica, Categoria B, ao enviar potenciais amostras de 2019-nCoV para o laboratório de testes
 - Armazene as amostras entre 2-8 °C e proceda ao envio durante a noite para o laboratório de testes numa bolsa de gelo. Se uma amostra for congelada a -70 °C ou menos, proceda ao envio durante a noite para o laboratório de testes em gelo seco.

5. Armazenamento das amostras

- As amostras podem ser armazenadas a 2-8 °C durante até 72 horas após a colheita
- Se for esperado um atraso na extração, armazene as amostras a -70 °C ou menos
- Os ácidos nucleicos extraídos devem ser armazenados a 4 °C se se destinarem a ser utilizados no período de 4 horas, ou a -70 °C ou menos se armazenados por mais de 4 horas

Utilização de materiais de controlo

Controlos a serem utilizados com o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit:

- É necessário um controlo sem modelo (NTC) para detetar a contaminação do reagente e/ou ambiental. Um NTC utiliza água livre de RNase/DNase em vez de uma amostra clínica com, no mínimo, um poço por placa de reação.
- É necessário um controlo positivo para detetar uma transcriptase reversa e/ou falha do reagente substancial, incluindo a integridade do iniciador e da sonda. O teste utiliza o Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard, que é fabricado com transcritos de RNA sintético contendo cinco alvos genéticos: Genes *E*, *N*, *ORF1ab*, *RdRP*, e *S* do SARS-CoV-2, cada quantificado em 200.000 cópias/ml juntamente com base de DNA genómico humano. Este material de controlo é adicionado a uma matriz semelhante à amostra para atingir uma concentração final de 1.000 cópias/ml e os ácidos nucleicos são extraídos. Deve ser incluído um controlo positivo por lote de amostras extraídas, com um mínimo de um poço de controlo positivo por placa de reação.
- É necessário um controlo negativo para detetar falhas na etapa de extração ou contaminação do reagente/ambiente. O teste utiliza o Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative Control, que é fabricado com DNA e RNA genómico humano. Este material de controlo é adicionado a uma matriz semelhante à amostra e os ácidos nucleicos são extraídos. Deve ser incluído um controlo negativo por lote de amostras extraídas, com um mínimo de um poço de controlo negativo por placa de reação.

Manuseamento e armazenamento dos reagentes

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

- O kit contém *supermix* RT-PCR, oligos de ensaio, padrão e controlo negativo
- Recomenda-se o armazenamento a -20 °C, com ciclos mínimos de congelamento-descongelamento

Áreas de trabalho

Devem ser tomadas todas as precauções de segurança necessárias de acordo com as boas diretrizes laboratoriais. Devem também ser tomadas precauções para evitar a contaminação cruzada das amostras.

Devem ser utilizadas áreas de trabalho separadas para:

- Extração de ácidos nucleicos
- Preparação de reagentes (por ex., preparação da mistura-mestre)
 - Não devem ser trazidas reações amplificadas, soluções-alvo amostras clínicas para a área de preparação de reagentes. Depois de trabalhar nesta área, a bata e as luvas de laboratório devem ser trocadas antes de passar para a área de adição de ácidos nucleicos.

- Adição de ácidos nucleicos
- Instrumentação (por ex., termocicladores)

Manuseamento geral

Deve utilizar-se sempre uma técnica asséptica adequada ao trabalhar com RNA. As mãos e as partículas de pó podem transportar bactérias e fungos e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Utilize sempre luvas de látex, vinil ou nitrilo sem pó durante o manuseamento de reagentes, tubos e amostras de RNA para evitar a contaminação da superfície da pele ou do equipamento de laboratório por RNase. Troque de luvas com frequência e mantenha os tubos fechados. Durante o procedimento, trabalhe rapidamente e mantenha tudo em blocos frios quando possível para evitar a degradação do RNA por RNases endógenas ou residuais. Limpe as superfícies de trabalho, pipetas, etc. com lixívia a 10 % ou outras soluções que possam destruir ácidos nucleicos e RNases. Para eliminar a deterioração acelerada de quaisquer plásticos e metais, limpe com etanol a 70 % após utilizar lixívia a 10 %. Certifique-se de que toda a lixívia é removida para eliminar possíveis reações químicas entre a lixívia e o tiocianato de guanidina, que está presente nos reagentes de extração.

Protocolo do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Visão geral

O Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit destina-se à deteção qualitativa de RNA do SARS-CoV-2 em amostras de exsudado nasofaríngeo. O ensaio deteta duas regiões do gene do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (*denominado N1 e N2*) e um gene *RP* humano expresso constitutivamente, todos numa reação. A deteção de RNA viral não só auxilia no diagnóstico da doença, como também fornece informações epidemiológicas e de vigilância.

O teste é composto por duas etapas principais: (1) extração de RNA de amostras do paciente e (2) transcrição reversa e amplificação da reação em cadeia da polimerase de uma etapa e deteção dos alvos específicos *N1 e N2* do SARS-CoV-2, que detetam a infeção viral, e o ensaio *RP* que deteta fundo dos ácidos nucleicos humanos na amostra do paciente.

Descrição das etapas do teste

Os ácidos nucleicos são isolados e purificados a partir de amostras do trato respiratório superior utilizando o Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit ou o QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante. Os ácidos nucleicos purificados são reversamente transcritos e amplificados utilizando o Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. O SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos contém uma mistura *de* iniciadores e sondas para alvos de SARS-CoV-2 (*N1 e N2*) e o gene *RP* humano para permitir a deteção multiplex dos alvos.

Extração de ácidos nucleicos

O desempenho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit depende da quantidade e da qualidade do modelo de RNA purificado a partir de amostras humanas. Os kits de extração comerciais e procedimentos seguintes foram qualificados e validados para recuperação e pureza do RNA para utilizar com o teste:

- Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Catálogo # A48310, # A42352)
- QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (Catálogo #52906, #52904)

Siga os procedimentos recomendados pelo fabricante para a extração da amostra. Devem ser incluídos um controlo positivo e um controlo negativo em cada lote de extração.

Nota: A extração automatizada (no QIAcube ou no Kingfisher) utilizando estes kits é suportada pelos fabricantes e requer validação

Preparação dos controlos

Controlo positivo: Adicione 5 µl de Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard num tubo contendo 995 µl de tampão fosfato salino (PBS). Trate como uma amostra do paciente e processe a extração de ácidos nucleicos juntamente com outras amostras de acordo com as instruções do fabricante.

Controlo negativo: Adicione 5 µl de Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative Control num tubo contendo 995 µl de PBS. Trate como uma amostra do paciente e processe a extração de ácidos nucleicos juntamente com outras amostras de acordo com as instruções do fabricante.

Preparação da reação RT-PCR numa etapa

1. Certifique-se que a(s) amostra(s) de RNA extraída(s) é(são) descongeladas em gelo.

Nota: Não agite as amostras de RNA em vórtex. As amostras de RNA podem ser misturadas sacudindo os tubos, seguindo-se uma breve centrifugação para recolher o conteúdo para o fundo dos tubos.

2. Descongele todos os componentes do kit no gelo.
3. Misture bem agitando brevemente cada tubo em vórtex para garantir a homogeneidade e, em seguida, centrifugue de forma intermitente (*pulse centrifuge*) para recolher o conteúdo no fundo de cada tubo.

Nota: O Reliance One-Step Multiplex Supermix é viscoso. É fundamental agitar em vórtex antes de iniciar a preparação da mistura de ensaio.

4. Preparação da mistura-mestre de RT-PCR:
 - a. Prepare uma mistura-mestre de acordo com o número de amostras do paciente e controlos a serem testados mais 10 % adicional de volume (Tabela 7) quando for testada mais de 1 amostra.
 - b. Agite brevemente a mistura-mestre em vórtex e centrifugue de forma intermitente (*pulse centrifuge*) para recolher o conteúdo até ao fundo do tubo.

Tabela 7. Volumes dos componentes da mistura-mestre de RT-PCR

Componente	Volume para 1 amostra (µl)	Volume para 96 amostras (µl)	Volume para N amostras (µl)
Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix	5,0	528	(5,0 x N) x 1,1
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	1,5	158	(1,5 x N) x 1,1

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Água livre de RNase/DNase	3,5	370	(3,5 x N) x 1,1
Volume por reação	10,0	1056	(10,0 x N) x 1,1

5. Dispense 10 µl da mistura-mestre nos poços apropriados da placa de RT-PCR.
6. Adicione 10 µl de água livre de RNase/DNase a um poço para um NTC.
7. Adicione 10 µl de material de controlo negativo a um poço para um Controlo Negativo.
8. Adicione 10 µl de material de controlo positivo a um poço para um Controlo Positivo.
9. Para os poços restantes, adicione 10 µl de amostra de RNA extraída por poço.
10. Sele a placa com Película de selagem para placas de PCR Microseal 'B' ou Película adesiva ótica MicroAmp.
11. Agite a placa em vórtex durante 30 segundos em alta velocidade.
12. Centrifugue a placa de reação RT-PCR durante 30 segundos a 1000 RCF para remover quaisquer bolhas de ar e permitir que a reação RT-PCR assente no fundo dos poços. Se as bolhas permanecerem, gire a placa novamente.
13. Prossiga com o carregamento da placa de reação RT-PCR para um instrumento de PCR em tempo real CFX96 Dx ou AB7500 Fast Dx.

Configuração do instrumento Bio-Rad CFX96 Dx

As instruções a seguir destinam-se à execução do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit num sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx controlado por computador. Para informações mais detalhadas, consulte o manual do instrumento.

Utilizando o software Bio-Rad CFX Manager Dx, existem três etapas para uma corrida de RT-PCR:

1. Configuração do protocolo
2. Configuração da placa
3. Executar a reação RT-PCR

Configuração do protocolo de ciclagem para o sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx

1. Clique em **File** (Ficheiro) -> **New** (Novo) -> **Protocol** (Protocolo) na barra de menu para abrir o Protocol Editor (Editor de Protocolos)
2. Altere o Sample Volume (Volume de amostra) para 20 µl
3. Modifique o Cycling Protocol (Protocolo de ciclagem) para as diretrizes em Tabela 8 abaixo:

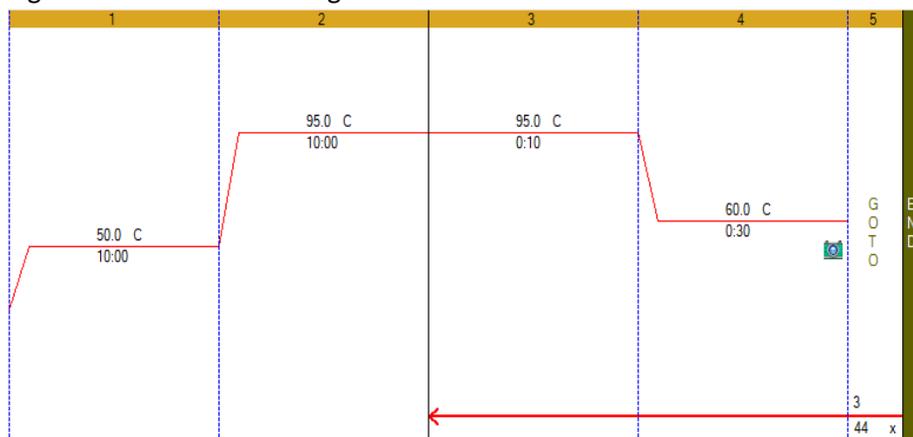
Tabela 8. Protocolo de ciclagem térmica

Step Number (Número da etapa)	Cycling Step (Etapa de ciclagem)	Temperature (°C) (Temperatura (°C))	Time (Tempo)	Cycles (Ciclos)
1	Transcrição reversa	50	10 minutos	1
2	Ativação enzimática	95	10 minutos	1
3	Desnaturação	95	10 segundos	45
4	Hibridação/extensão/ leitura da placa	60	30 segundos	
5	Ir para a etapa 3 e repetir 44 vezes	--	--	

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

4. Confirme se a etapa 4 inclui uma leitura de placa, conforme indicado por um símbolo de câmara na etapa
5. Para adicionar uma leitura de placa à etapa 4, clique na etapa para destacar e clique em **Add Plate Read to Step** (Adicionar leitura de placa à etapa)

Figura1 : Protocolo de ciclagem final



6. Guarde o protocolo clicando em **File** (Ficheiro) -> **Save As** (Guardar como)
7. Nomeie o ficheiro de protocolo como **“Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol”**
8. Clique em Ok para sair do ecrã Protocol Editor (Editor de protocolo).

Configuração da placa para o sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx

1. Clique em **File** (Ficheiro) -> **New** (Novo) -> **New Plate** (Nova placa) na barra de menu para abrir o Plate Editor (Editor de placa)
2. Selecione **Settings** (Configurações) -> **Plate Size** -> (Tamanho da placa) > selecione 96 poços
3. Selecione **Settings** (Configurações) -> **Plate Size** (Tipo de placa) -> selecione BR White (BR branco)
4. Expanda o menu suspenso à direita do **Scan Mode** (Modo de leitura) e selecione **All Channels** (Todos os canais)
5. Destaque os poços onde as amostras e os controlos estarão na placa. Para destacar todos os poços, clique no canto superior esquerdo do gráfico da placa.
6. Clique em **Select Fluorophores** (Selecionar fluoróforos) e selecione FAM, HEX e Texas Red marcando a caixa Selected (Selecionado) à direita do fluoróforo (desmarque SYBR). Clique em OK para aplicar as alterações.
7. Defina o tipo de amostra para cada poço destacando os poços; em seguida, escolha o identificador apropriado no menu suspenso Sample Type (Tipo de amostra)
8. Aplique **target names and fluorophores** (nomes-alvo e fluoróforos) a todos os poços, destacando os poços e marcando a caixa Load (Carregar) à esquerda de cada um dos fluoróforos listados na secção Target Name (Nome do alvo). Para incluir o nome do alvo, substitua <none> na caixa de texto aberta à direita do fluoróforo pelo seguinte:
 - FAM – SARS-CoV-2 (N1)
 - HEX – SARS-CoV-2 (N2)
 - Texas – RNase PSugestão: Clique em Enter após alterar o nome de cada alvo para aplicar ao layout da placa

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

9. Guarde o ficheiro clicando em **File** (Ficheiro) -> **Save As** (Guardar como)
10. Nomeie o ficheiro de placa como “**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Plate Setup**”
11. Clique em **Save** (Guardar) para aplicar
12. Feche o ficheiro clicando em **File** (Ficheiro) -> **Close** (Fechar)

Executar a placa de RT-PCR no sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx

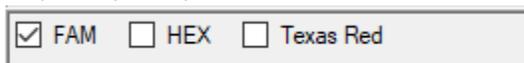
1. Selecione o instrumento no menu suspenso Select Instrument (Selecionar instrumento) no Startup Wizard (Assistente de arranque)
2. Clique em User-defined (Definida pelo utilizador) na secção Select Run Type (Selecionar tipo de corrida) do Startup Wizard (Assistente de arranque). Será aberto o painel Run Setup (Configuração da corrida).
3. Clique em **Select Existing** (Selecionar existente) no separador Protocol (Protocolo)
4. Selecione o ficheiro de protocolo de ciclagem “**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol.prcl**”
5. Clique em Open (Abrir) para aplicar
6. Confirme se o protocolo de ciclagem é o indicado na Tabela 8
7. Clique no separador Plate (Placa) no painel Run Setup (Configuração da corrida)
8. Clique em **Select Existing** (Selecionar existente)
9. Selecione o ficheiro de configuração da placa “**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-qPCR Plate Setup.pltd**”
10. Clique em Open (Abrir) para aplicar
11. Clique no separador **Start Run** (Iniciar corrida) no painel Run Setup (Configuração da corrida)
12. Selecione o instrumento na secção Start Run on Selected Blocks (Iniciar corrida nos blocos selecionados) marcando a caixa à esquerda do nome do instrumento
13. Carregue a placa para o instrumento
14. Clique em **Start Run** (Iniciar corrida)
15. Defina um nome de ficheiro para o ficheiro da corrida e clique em Save (Guardar) para iniciar a corrida

Análise de dados no sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx

O ficheiro de dados da corrida será aberto automaticamente após a conclusão da corrida. Para abrir um ficheiro que foi fechado, clique em **File** (Ficheiro) -> **Open** (Abrir) -> **Data File** (Ficheiro de dados) -> Selecione o ficheiro de dados no menu.

Para analisar os dados, ajuste os valores da linha de base e limiar para cada fluoróforo no separador Quantification (Quantificação).

1. Clique em Settings (Configurações) -> Cycles to Analyze (Ciclos a analisar) -> insira "5" na primeira célula para substituir a configuração padrão de "1". Clique em Ok para aplicar.
2. Desmarque os fluoróforos HEX e Texas Red, desmarcando as caixas correspondentes no gráfico de amplificação. Apenas a caixa FAM deve estar selecionada.



3. Selecione Log Scale (Escala logarítmica) marcando a caixa no canto inferior direito do gráfico de amplificação
 Log Scale

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

4. Inspeção visualmente os traçados. Qualquer poço com amplificação no canal FAM deve apresentar um aumento exponencial nos valores de RFU até ao patamar da reação.
5. Poderá ser necessário o ajuste manual da linha de base se os traçados de amplificação não forem exponenciais. Para definir manualmente a linha de base, selecione **Settings** (Configurações) -> **Baseline Threshold** (Limiar da linha de base). Destaque o poço a ser ajustado, insira 2 na célula **Baseline Begin** (Início da linha de base), insira um número de ciclo que seja 2 ciclos antes de o traçado de amplificação começar a aumentar na célula **Baseline End** (Fim da linha de base). Clique em **OK** para aplicar.
6. Defina o limiar de FAM no gráfico de amplificação clicando e arrastando a linha de limiar até que esteja dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo.
7. Confirme a linha de base e defina o limiar para os canais HEX e Texas Red, selecionando o fluoróforo apropriado na Etapa 2 e repetindo o processo definido acima.

Configuração do instrumento AB7500 Fast Dx

As instruções a seguir são essenciais para executar o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit num sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx. Para informações mais detalhadas sobre a configuração da placa e do protocolo de ciclagem, consulte o manual do instrumento de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx.

1. Inicie o software 7500
2. Selecione **File** (Ficheiro) -> **New** (Novo) na barra de menu
3. Defina o seguinte
 - a. **Assay (Ensaio) – Standard Curve (Absolute Quantitation) (Curva Padrão (Quantificação Absoluta))**
 - b. **Container (Recipiente) – 96-Well Clear (96 Poços Transparente)**
 - c. **Template (Modelo) – Documento em Branco**
 - d. **Run Mode (Modo de Corrida) – Standard 7500**
4. Atribua o corante repórter conforme definido na Tabela 9

Tabela 9: Corantes repórter necessários

Corante repórter	Detetor
FAM	N1
HEX	N2
TEXAS RED	RP

Nota: Para o ensaio N2, o canal VIC é aplicável para detetar este alvo.

5. Selecione **Passive Reference** (Referência Passiva) -> **None** (Nenhuma)
6. Defina o protocolo de ciclagem utilizando os valores listados na Tabela 10

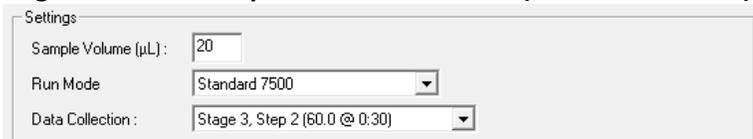
Tabela 10. Protocolo de ciclagem térmica para o AB7500 Fast Dx

Cycling Step (Etapa de ciclagem)	Temperature (°C) (Temperatura (°C))	Time (Tempo)	Number of Cycles (Número de ciclos)
Transcrição reversa	50	10 minutos	1
Ativação enzimática	95	10 minutos	1
Desnaturação	95	10 segundos	45
Annealing/extension (Hibridação/extensão)	60	30 segundos	

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

7. Defina a etapa de recolha de dados selecionando Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30) a partir do menu suspenso Data Collection (Recolha de dados), selecione Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30), consulte a Figura 2.

Figura 2 : Menu suspenso Data Collection (Recolha de dados)



The image shows a software settings window titled "Settings". It contains three fields: "Sample Volume (µL)" with a text input field containing "20"; "Run Mode" with a dropdown menu showing "Standard 7500"; and "Data Collection" with a dropdown menu showing "Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30)".

Análise de dados no sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx

As instruções a seguir são essenciais para analisar os resultados obtidos utilizando o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit com o sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx. Para informações mais detalhadas sobre a análise de dados, consulte o manual do instrumento de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx.

Definir valores de linha de base e limiares

1. Selecione **File** (Ficheiro) -> **Open** (Abrir) -> Selecione o ficheiro de dados a ser analisado.
2. Selecione o separador **Result** (Resultado) no canto superior esquerdo do software.
3. Clique no separador **Amplification Plot** (Gráfico de amplificação).
4. Destaque todas as amostras da corrida para visualizar todas as curvas de amplificação.
5. Defina **Data** (Dados) para **Delta Rn vs. Cycle** (Delta Rn vs. Ciclo) no lado direito do painel.
6. Defina **Detector** (Detetor) para **N1**.
7. Defina **Line Color** (Cor da linha) para **Detector Color** (Cor do detetor).
8. Selecione **Manual Ct** (Ct manual) e **Manual Baseline** (Linha de base manual) em **Analysis Settings** (Configurações de análise). Não altere os números predefinidos em Manual Baseline (Linha de base manual).
9. Clique e arraste a linha de limiar até que esteja dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo.
10. Clique no botão **Analyze** (Analisar) no canto inferior direito da janela. O limiar vermelho ficará verde, indicando que os dados foram analisados.
11. Repita as etapas 6 a 10 para analisar os resultados de cada conjunto de marcadores.

Interpretação de resultados

O NTC, o controlo positivo e o controlo negativo devem ser examinados antes da interpretação dos resultados do paciente. Se os controlos não forem válidos, os resultados do paciente não podem ser interpretados.

Controlos do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit – NTC, Positivo e Negativo

No Template Control (NTC) (Sem controlo de modelo (NTC))

As reações de NTC para a mistura de oligos SARS-CoV-2 RT-PCR não devem exibir sinais positivos em nenhum canal (FAM, HEX ou Texas Red) para qualquer dos três alvos testados, *N1*, *N2* ou *RP*. Se alguma uma das reações de NTC exibir positividade, pode ter ocorrido contaminação da amostra. Invalide a corrida e repita o ensaio com os ácidos nucleicos extraídos residuais respeitando estritamente as diretrizes. Se o resultado do teste repetido for positivo, volte a extrair e teste novamente todas as amostras incluídas nesse lote.

Positive Control (Controlo positivo)

O controlo positivo produzirá resultados positivos ($Cq < 40$) para a deteção de conjuntos de iniciador e sondas *N1*, *N2*, e *RP*.

Negative Control (Controlo negativo)

O controlo negativo deve produzir um resultado positivo com o conjunto de iniciador e sonda *RP* ($Cq < 40$) e resultados negativos com todos os alvos *N1* e *N2* do SARS-CoV-2.

Exame e interpretação dos resultados das amostras do paciente

A avaliação dos resultados dos testes de amostras clínicas deve ser realizada após os controlos positivo e negativo terem sido examinados e determinados como válidos e aceitáveis. O desempenho esperado dos controlos do ensaio Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Desempenho esperado do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Tipo de controlo	Nome do controlo externo	Utilizado para monitorizar	SARS-CoV-2		Controlo interno RP	Cq esperado		
			N1	N2		N1	N2	RP
NTC	Água livre de RNase/DNase	Contaminação de reagente e/ou ambiental	Negativo	Negativo	Negativo	Cq \geq 40 ou N/A		
Negativo	SARS-CoV-2 Negativo	Contaminação de reagente e/ou ambiente	Negativo	Negativo	Positivo	Cq \geq 40 ou N/A	Cq \geq 40 ou N/A	< 40
Positivo	SARS-CoV-2 Standard	Falha substancial do reagente, incluindo a integridade do iniciador e da sonda	Positivo	Positivo	Positivo	< 40	< 40	< 40

Se algum dos controlos não satisfizer estes critérios, o teste pode ter configuração ou execução inadequada, ou mau funcionamento ou falha do reagente ou do equipamento. Invalide a corrida e repita o teste.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

RP (Controlo Interno)

Todas as amostras clínicas devem exibir sinais positivos com os iniciadores e a sonda *RP* ($Cq < 40$), indicando assim a presença de RNA *RP* humano. A falha na deteção do *RP* em qualquer amostra clínica pode indicar:

- Extração inadequada de ácidos nucleicos dos materiais clínicos, resultando em perda de RNA e/ou degradação de RNA
- Ausência de material celular humano suficiente devido à colheita inadequada ou perda de integridade da amostra
- Configuração e execução inadequada do ensaio
- Mau funcionamento do reagente ou do equipamento

Se o ensaio *RP* não produzir um resultado positivo para uma amostra clínica humana, interprete como se segue:

- Se o SARS-CoV-2 *N1* e *N2* forem positivos, mesmo na ausência de um *RP* positivo, o resultado deve ser considerado válido. É possível que algumas amostras não exibam *RP* como positivo ($Cq < 40$) devido ao baixo número de células na amostra clínica original. Um sinal *RP* negativo não exclui a presença de RNA do vírus SARS-CoV-2 numa amostra clínica.
- Se todos os marcadores SARS-CoV-2 e *RP* forem negativos para a amostra, o resultado deve ser considerado inválido para a amostra. Se estiver disponível uma amostra residual, repita o procedimento de extração e repita o teste. Se todos os marcadores permanecerem negativos após a repetição do teste, comunique os resultados como inválidos, devendo ser colhida uma nova amostra.

Marcadores SARS-CoV-2 (*N1* e *N2*)

- O SARS-CoV-2 é detetado quando todos os controlos exibem o desempenho esperado e as curvas de amplificação dos marcadores SARS-CoV-2 (*N1* e *N2*) cruzam a linha de limiar em 40 ciclos. O *RP* pode ou não ser positivo conforme descrito acima, mas o resultado do SARS-CoV2 ainda é válido.
- O SARS-CoV-2 não é detetado quando todos os controlos exibem o desempenho esperado e todas as curvas de amplificação dos marcadores SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) NÃO cruzam a linha de limiar em 40 ciclos E a curva de amplificação de RNase P CRUZA a linha de limiar em 40 ciclos.
- O resultado é inconclusivo quando todos os controlos exibem o desempenho esperado e as curvas de amplificação para qualquer um dos marcadores SARS-CoV-2 (*N1* ou *N2*, mas não ambos os marcadores) cruzam o limiar do ciclo em 40 ciclos. O RNA extraído deve ser testado novamente. Se não estiver disponível RNA residual, extraia novamente o RNA da amostra residual e repita o teste. Se for obtido o mesmo resultado, comunique o resultado inconclusivo.
- O resultado é inválido quando todos os controlos exibem o desempenho esperado e as curvas de amplificação para os marcadores SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) E o marcador *RP* NÃO CRUZAM o limiar do ciclo em 40 ciclos. O RNA extraído da amostra deve ser testado novamente. Se não estiver disponível RNA residual, extraia novamente o RNA da amostra residual e repita o teste. Se a amostra novamente testada for negativa para todos os marcadores e *RP*, o resultado é inválido, devendo ser considerada a colheita de uma nova amostra do doente.

Para facilitar a interpretação, consulte as diretrizes na Tabela 12.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabela 12. Guia de Interpretação de Resultados do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

SARS-CoV-2 Resultado N1	SARS-CoV-2 Resultado N2	Controlo interno Resultado RP	Interpretação	Ações
Positivo (Cq < 40)	Positivo (Cq < 40)	Positivo ou Negativo	SARS-CoV-2 detetado	Armazene as amostras a -70 °C, conforme necessário, e comunique os resultados à autoridade de saúde pública apropriada
Se apenas um dos dois alvos for positivo (Cq < 40)		Positivo ou negativo	Inconclusivo	Repita o teste de ácidos nucleicos e/ou extraia novamente e repita a RT-PCR. Se o resultado repetido permanecer inconclusivo, entre em contacto com a autoridade de saúde pública apropriada para obter instruções para a transferência da amostra ou outras orientações.
Negativo (Cq ≥ 40 ou N/A)	Negativo (Cq ≥ 40 ou N/A)	Positivo (Cq < 40)	SARS-CoV-2 não detetado	Comunique os resultados à autoridade de saúde pública apropriada
Negativo (Cq ≥ 40 ou N/A)	Negativo (Cq ≥ 40 ou N/A)	Negativo (Cq ≥ 40 ou N/A)	Resultado Inválido	Repita a extração e a RT-PCR. Se o resultado repetido permanecer inválido, considere a colheita de uma nova amostra do paciente.

Limitações

1. O Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit foi avaliado apenas para utilização nos sistemas de PCR em tempo real CFX96 Dx e AB7500 Fast Dx.
2. O desempenho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit foi estabelecido em amostras de exsudado nasofaríngeo. A utilização do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit com outros tipos de amostras não foi avaliada e as características de desempenho são desconhecidas.
3. Os resultados fiáveis dependem de procedimentos adequados de colheita, armazenamento e manuseamento de amostras.
4. Este teste é utilizado para a deteção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório superior colhidas num meio de transporte universal (UTM) ou num sistema de transporte viral universal (UVT). A testagem de outros tipos de amostras com o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit pode resultar em resultados imprecisos.
5. A deteção do RNA do SARS-CoV-2 pode ser afetada por métodos de colheita da amostra, fatores relacionados com o paciente (por ex., presença de sintomas) e/ou fase da infeção.
6. O resultado do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit é uma avaliação qualitativa de amostras de pacientes que são positivas para o SARS-CoV-2. O utilizador avalia os resultados de RT-PCR para controlos e amostras do paciente para fazer uma chamada qualitativa de SARS-CoV-2 detetado ou não detetado. Os valores reportados não devem ser utilizados ou interpretados como quantitativos.
7. Tal como acontece com qualquer teste molecular, as mutações nas regiões alvo do Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit podem afetar a ligação do iniciador e/ou da sonda, resultando na falha de deteção da presença de um vírus.

8. Devido às diferenças inerentes entre as tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para a outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos no seu laboratório para qualificar as diferenças de tecnologia. Não se deve esperar concordância de cem por cento entre os resultados devido às diferenças acima mencionadas entre as tecnologias. Os utilizadores devem seguir as suas próprias políticas/procedimentos específicos.

Características de desempenho analítico

Sensibilidade analítica

Foram realizados estudos de limite de deteção (LoD) para determinar a menor concentração detetável de SARS-CoV-2 na qual 95 % ou mais de todas as réplicas (verdadeiros positivos) testam positivo utilizando o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit. Os estudos de LoD foram realizados utilizando amostras simuladas de pacientes compostas pelo vírus SARS-CoV-2 sintético (AccuPlex SARS-COV-2, Seracare, Cat# 0505-0126) titulado num fundo de matriz de exsudado nasofaríngeo negativo SARS-CoV-2 agrupado antes da purificação de ácidos nucleicos. Foi testada uma série de diluição de 2 vezes variando entre 31,5 a 500 cópias por ml. Foram extraídas vinte réplicas para cada concentração utilizando o QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit ou o Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit. As amostras de ácidos nucleicos extraídas foram subsequentemente testadas com o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit no CFX96 Dx e no AB7500 Fast Dx. O LoD foi determinado como a menor quantidade de vírus detetada com pelo menos 19 réplicas com resultados positivos para os ensaios N1 e N2.

Os resultados do LoD do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit na deteção de SARS-CoV-2 de amostras extraídas utilizando o QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit são apresentados nas Tabelas 13 e 14. No CFX96 Dx, o LoD é de 125 cópias virais/ml (Tabela 13). No AB7500 Fast Dx, o LoD é de 250 cópias virais/ml (Tabela 14). Os resultados do LoD do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit na deteção de SARS-CoV-2 de amostras extraídas utilizando o Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit são apresentados nas Tabelas 15 e 16. No CFX96 Dx e no AB7500 Fast Dx, o LoD é de 125 cópias virais/ml. Em resumo, o intervalo do LoD é 125-250 cópias virais/ml em ambos os instrumentos, independentemente do método de purificação dos ácidos nucleicos (Tabela 17).

Tabela 13. Resultados do LoD do CFX96 Dx para amostras extraídas com o QIAamp Viral RNA Mini Kit

Cópias/ml SARS-CoV-2	Sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx			
	Ensaio N1		Ensaio N2	
	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas
500	N/A	N/A	N/A	N/A
250	20/20	31,25	20/20	32,88
125	19/20	32,4	20/20	34,6
62,5	19/20	32,86	18/20	35,57
31,25	15/20	33,49	15/20	36,36

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabela 14. Resultados do LoD do AB7500 Fast Dx para amostras extraídas com o QIAamp Viral RNA Mini Kit

Cópias/ml SARS-CoV-2	Sistema de PCR em tempo real AB7500 Dx			
	Ensaio N1		Ensaio N2	
	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas
500	20/20	33,06	20/20	34,36
250	20/20	34,61	20/20	36,04
125	19/20	36,07	15/20	37,95
62,5	18/20	35,84	17/20	37,38
31,25	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabela 15. Resultados do LoD do CFX96 Dx para amostras extraídas com o MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

Cópias/ml SARS-CoV-2	Sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx			
	Ensaio N1		Ensaio N2	
	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas
500	20/20	33,31	20/20	33,53
250	19/20	33,45	20/20	33,63
125	19/20	34,48	20/20	35,07
62,5	18/20	35,56	15/20	37,47
31,25	11/20	36,14	10/20	38,06

Tabela 16. Resultados do LoD do AB7500 Dx para amostras extraídas com o MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

Cópias/ml SARS-CoV-2	Sistema de PCR em tempo real AB7500 Dx			
	Ensaio N1		Ensaio N2	
	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas	Réplicas positivas/ Réplicas totais	Média de cq de réplicas positivas
500	20/20	33,72	20/20	35,44
250	20/20	34,29	20/20	35,94
125	20/20	35,34	20/20	37,04
62,5	13/20	36,76	12/20	38,2
31,25	6/20	37,47	9/20	39,17

Tabela 17. Resumo do LoD do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

	QIAamp Viral RNA Mini Kit	MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
CFX96 Dx	125 cópias/ml	125 cópias/ml
AB7500 Dx	250 cópias/ml	125 cópias/ml

Inclusividade

As sequências do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (iniciadores e sondas) para N1, N2, e RP foram desenvolvidas pelo CDC. O CDC realizou um alinhamento com as sequências de sondas e iniciadores de oligonucleótidos do Painel de diagnóstico por RT-PCR em tempo real do nCoV 2019 do CDC com todas as sequências de ácidos nucleicos publicamente disponíveis para o SARS-CoV-2 na base de dados da Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, <https://www.gisaid.org>) de 20 de junho de 2020 para demonstrar a inclusividade prevista do Painel de diagnóstico por RT-PCR em tempo real do nCoV 2019 do CDC. Foi utilizada neste estudo uma avaliação de 31.623 sequências de SARS-CoV-2 disponíveis no GISAID. À exceção de uma não correspondência de nucleótidos com frequência > 1 % (2,00 %) na terceira posição da sonda N1, a frequência de todas as não correspondências foi < 1 %, indicando que a prevalência das não correspondências era esporádica. Apenas uma sequência (0,0032 %) tinha duas não correspondências de nucleótidos na sonda N1, e uma outra sequência de um isolado diferente (0,0032%) tinha duas não correspondências de nucleótidos no iniciador reverso N1. Não foram observadas quaisquer sequências com mais de uma não correspondência em qualquer região do iniciador/sonda N2.

O risco de uma única não correspondência resultar numa perda significativa de reatividade, e num resultado falso-negativo, é baixo devido ao *design* dos iniciadores e das sondas com temperaturas de fusão > 60 °C e condições de corrida do ensaio com uma temperatura de hibridação a 55 °C para tolerar uma ou duas não correspondências.

Especificidade analítica (reatividade cruzada)

A análise *in silico* para os agentes patogênicos listados na Tabela 18 foi realizada descarregando uma sequência de referência do GenBank por genoma para cada um dos organismos. As sequências de referência foram comparadas com os alvos Bio-Rad SARS-CoV-2, N1 e N2 para todas as combinações possíveis (iniciador direto, iniciador reverso, sonda e complementos reversos para todos estes) para determinar a percentagem de homologia. Se qualquer uma destas combinações de iniciador foi mapeada para uma sequência em fitas opostas com uma homologia de >80 % no mesmo alvo dentro de uma distância curta (≤ 100 bp), as amplificações potenciais foram sinalizadas. Não se espera qualquer potencial reatividade cruzada não intencional com base nesta análise *in silico*, exceto para o SARS-coronavírus (SARS-CoV) com o alvo N2.

A análise *in-silico* para o conjunto de iniciador/sonda N1 mostrou uma alta homologia de sequência da sonda N1 com genoma de coronavírus semelhante a SARS de morcego e SARS-CoV. No entanto, os iniciadores direto e reverso não mostraram homologia de sequência com genoma de coronavírus semelhante a SARS-CoV e SARS de morcego. Combinando os resultados de iniciadores e sondas, não se verificou homologia significativa com o genoma humano, outros coronavírus ou microflora humana que pudesse prever potenciais resultados falso-positivos de RT-PCR.

Tabela 18. Análise *in silico* para SARS-CoV-2

Agentes patogênicos testados <i>in-silico</i>	Reatividade cruzada não intencional para N1	Reatividade cruzada não intencional para N2
SARS-CoV	Nenhuma detetada	Homologia correspondente a 92 %*
MERS-coronavírus	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano A	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano B1	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Agentes patogénicos testados <i>in-silico</i>	Reatividade cruzada não intencional para N1	Reatividade cruzada não intencional para N2
Adenovírus humano B2	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano C	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano D	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano E	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Adenovírus humano F	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Metapneumovírus humano (hMPV)	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Vírus parainfluenza 1	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Vírus parainfluenza 2	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Vírus parainfluenza 3	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Vírus parainfluenza 4	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Influenza A H3N2	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Influenza A H2N2	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Influenza A H7N9	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Influenza A H1N1	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Influenza B	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus humano A	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus humano B	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus E, Enterovírus bovino	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus F	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus G, Enterovírus 9 suíno	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus H, Enterovírus A símio	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus J, estirpe 1631	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus J, estirpe N203	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Vírus sincicial respiratório	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Rinovírus A, Rinovírus humano 89	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Rinovírus A, Rinovírus humano 1 estirpe ATCC VR-1559	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Rinovírus B	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Rinovírus C, Rinovírus C humano	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Rinovírus C, Rinovírus NAT001 humano	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Haemophilus influenzae</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Legionella pneumophila</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
Enterovírus (por ex., EV68)	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Nenhuma detetada	Nenhuma detetada

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

* A análise do iniciador direto do alvo N2 mostrou elevada homologia com coronavírus semelhantes a SARS de morcego. No entanto, as sequências de iniciador reverso e sonda não mostraram homologia significativa com o genoma humano, outros coronavírus ou microflora humana que pudessem prever potenciais resultados falso-positivos de RT-PCR. Combinando os resultados dos iniciadores e da sonda, não há previsão de potenciais resultados falso-positivos de RT-PCR.

Além da análise *in silico*, o CDC comunicou especificidade e exclusividade analítica, demonstrando que são obtidos resultados esperados para cada organismo observado na Tabela 19, para demonstrar que os resultados finais não são afetados por estes vírus.

Tabela 19. Especificidade/exclusividade reportada pelo CDC

Vírus	Estirpe	Fonte	2019-nCoV_ N1	2019-nCoV_ N2	Resultado final
Coronavírus humano	229E	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Coronavírus humano	OC43	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Coronavírus humano	NL63	Amostra clínica	0/3	0/3	Neg.
Coronavírus humano	HKU1	Amostra clínica	0/3	0/3	Neg.
MERS-coronavírus		Isolado	0/3	0/3	Neg.
SARS-coronavírus		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Bocavírus		Amostra clínica	0/3	0/3	Neg.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Isolado	0/3	0/3	Neg.
<i>Streptococcus</i>		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Influenza A(H1N1)		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Influenza A (H3N2)		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Influenza B		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Adenovírus humano, tipo 1	Ad71	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Metapneumovírus humano		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Vírus sincicial respiratório	Long A	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Rinovírus		Isolado	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 1	C35	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 2	Greer	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 3	C-43	Isolado	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 4	M-25	Isolado	0/3	0/3	Neg.

Avaliação clínica

O desempenho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit com amostras clínicas de exsudado nasofaríngeo foi avaliado utilizando 34 amostras clínicas negativas individuais e 34 amostras clínicas positivas confirmadas. As amostras obtidas por iSpecimen foram colhidas de pacientes com sinais e sintomas de infecção respiratória superior. As amostras foram colhidas por pessoal qualificado de acordo com o folheto informativo do dispositivo de colheita e armazenadas congeladas a -80 °C. As amostras positivas representaram uma ampla gama de carga viral e incluíram amostras baixo positivo. As amostras foram fornecidas com resultados obtidos utilizando um ensaio comparador molecular de alta sensibilidade.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Os ácidos nucleicos foram purificados a partir de 68 amostras clínicas utilizando o Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, um volume de amostra de 200 µl e um volume de eluição de 100 µl. As amostras foram aleatorizadas, ocultadas e avaliadas com o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit utilizando o sistema de PCR em tempo real CFX96 Dx da Bio-Rad, que tem um LoD semelhante ao do sistema de PCR em tempo real AB7500 Fast Dx. Foi utilizado o MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit para o estudo de avaliação clínica porque o LoD estava dentro 2x do LoD estabelecido com o método de extração QIAamp Viral RNA Mini em ambos os instrumentos. Os resultados obtidos a partir de amostras testadas utilizando o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit foram comparados com os resultados obtidos num ensaio comparador molecular.

Os resultados do estudo clínico (Tabela 20) mostram um acordo percentual positivo (PPA) de 97,1 % com um intervalo de confiança de 95 % de 85,1 %-99,5 % e um acordo percentual negativo (NPA) de 100 % com um intervalo de confiança de 95 % de 89,9 %-100 %.

Tabela 20. PPA e NPA do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit contra comparador

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	Teste Comparador Positivo	Teste Comparador Negativo	Total	PPA [IC 95 %]	NPA [IC 95 %]
Teste positivo	33	0	34	97,1 % [85,1 %-99,5 %]	100 % [89,9 %-100 %]
Inconclusivo	1	0	0		
Teste negativo	0	34	34		
Total	34	34	68		

Houve dois resultados discordantes (Amostras 37 e 65) no teste inicial; o Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit foi inconclusivo e o ensaio comparador molecular foi positivo. A repetição do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit na amostra 37 resolveu o resultado inconclusivo e confirmou que a amostra é positiva. A amostra residual insuficiente impediu testar novamente a amostra 65.

Referências

1. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5.ª edição. EUA Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revisto em dezembro de 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Fourth Edition. Documento CLSI M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods. Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document MM13-Ed2. Wayne, PA; CLSI, 2020.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

4. World Health Organization. Laboratory Testing for Coronavirus Disease (COVID-19) in Suspected Human Cases: Interim Guidance. March 19, 2020, World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501> (acedido em 2020-05-08)
5. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel services (Revision:05). Centers for Disease Control and Prevention 2020, Atlanta, GA. <https://www.fda.gov/media/134922/download>.

Anexo A: Protocolo de qualificação do instrumento

Finalidade

Este anexo tem como objetivo fornecer uma recomendação sobre como preparar um painel de amostras simuladas para utilização na verificação do desempenho do Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit pelo utilizador final.

Materiais necessários

Descrição	Quantidade	Incluído no kit
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	1 frasco	Sim
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	1 frasco	Sim
Tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4)	3 ml*	Não

*A quantidade indicada destina-se à preparação de um conjunto de amostras simuladas

Precauções

O controlo positivo fornecido com o Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit é composto de RNA transcrito que codifica os genes N1 e N2 do SARS-CoV-2 e DNA genómico humano para a amplificação do gene RP. Este controlo não é infeccioso. Os controlos Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard e Negative destinam-se a utilização única; não voltar a congelar. O Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit deve ser manuseado de acordo com as Boas Práticas de Laboratório.

Os materiais de controlo e os outros componentes do kit devem ser armazenados em temperaturas apropriadas, conforme descrito nas Instruções de Utilização (IDU), e devem ser mantidos no gelo depois de descongelados. As amostras de RNA extraídas devem ser mantidas frias durante a preparação e utilização.

Instruções para a preparação de amostras simuladas antes da extração com o QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit

1. Prepare tampão AVL (com RNA transportador) suficiente para 9 amostras, de acordo com as instruções do fabricante.
2. Etiquete três tubos de 1,5 ml livres de RNase como A, B e C. Etiquete nove tubos de 1,5 ml como 1-9.
3. Aliquote 995 µl de PBS para o tubo “A” e, em seguida, adicione 5 µl de Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard. Misture bem.
4. Aliquote 900 µl de PBS para o tubo “B” e, em seguida, adicione 100 µl do tubo “A”. Misture bem.
5. Aliquote 995 µl de PBS para o tubo “C” e, em seguida, adicione 5 µl de Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative. Misture bem.
6. Aliquote 560 µl de Tampão AVL contendo RNA transportador para cada um dos nove tubos etiquetados de 1-9.
7. Adicione 140 µl do tubo A em cada um dos tubos 1-3.
8. Adicione 140 µl do tubo B em cada um dos tubos 4-6.
9. Adicione 140 µl do tubo C em cada um dos tubos 7-9.
10. Extraia as amostras utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit seguindo as instruções do fabricante, eluindo as amostras em 60 µl de AVE.

Instruções para a preparação de amostras simuladas antes da extração com o Thermo Fisher MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

1. Etiquete três tubos de 1,5 ml livres de RNase como A, B e C.
2. Aliquote 995 µl de PBS para o tubo “A” e, em seguida, adicione 5 µl de Padrão Exact Diagnostics SARS-CoV-2. Misture bem.
3. Aliquote 900 µl de PBS para o tubo “B” e, em seguida, adicione 100 µl do tubo “A”. Misture bem.
4. Aliquote 995 µl de PBS para o tubo “C” e, em seguida, adicione 5 µl de Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative.
5. Aliquote 10 µl de Proteinase K do MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit em cada um dos nove poços, designados 1-9, de uma placa de 96 poços profundos.
6. Adicione 200 µl do tubo A em cada um dos poços 1-3.
7. Adicione 200 µl do tubo B em cada um dos poços 4-6.
8. Adicione 200 µl do tubo C em cada um dos poços 7-9.
9. Extraia as amostras utilizando o MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit seguindo as instruções do fabricante, eluindo as amostras em 100 µl de solução de eluição.

Teste das amostras extraídas

Siga as IDU do Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Kit para testar cada uma das amostras de concentração moderada, concentração baixa e negativas pelo menos uma vez.

Resultados esperados

Os tubos 1-3 e os poços 1-3 contêm uma concentração moderada de SARS-CoV-2 e devem ser positivos para N1, N2 e RP.

Os tubos 4-6 e os poços 4-6 contêm uma concentração baixa de SARS-CoV-2 e devem ser positivos para N1, N2 e RP.

Os tubos 7-9 e os poços 7-9 são amostras negativas e devem ser negativos para N1 e N2, mas positivos para RP.

Critérios de aceitação

Amostras negativas (tubos 7-9): 100 % (3/3) deve estar de acordo com os resultados esperados.

Amostras moderadas (tubos 1-3): 100 % (3/3) deve estar de acordo com os resultados esperados.

Amostras de baixo positivo (tubos 4-6): Pelo menos 66% (2/3) deve estar de acordo com os resultados esperados.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Entre em contacto com o seu escritório regional da Bio-Rad. Para informações de contacto, consulte www.bio-rad.com.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

**For further information, please contact the Bio-Rad office nearest
you or visit our website at www.bio-rad.com**

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-6373
www.bio-rad.com

Australia, Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Level 5, 446 Victoria Road, Gladesville, New South Wales 2111 • Phone +61 (2) 9914 2800 • Fax +61 (2) 9914 2888
Austria, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna • Phone +43 (0) 1 877 89 01 9 • Fax +43 (0) 1 876 56 29
Belgium, Bio-Rad Laboratories N.V., Winninglaan 3, BE-9140 Temse • Phone +32 (0) 3 710 53 00 • Fax +32 (0) 3 710 53 01
Brazil, Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, Avenida Doutor Churci Zaidan, 1.240 cj 1902 e 1904 Morumbi Corporate Santo Amaro, São Paulo, SP CEP 04711-130 • Phone +55 11 3065 7550
Canada, Bio-Rad Laboratories Ltd., 2403 Guénette Street, Montréal, Québec H4R 2E9 • Phone +1 514 334 4372 • Fax +1 514 334 0872
China, Bio-Rad Laboratories (Shanghai) Co., Ltd. Room 601, Allian Plaza, No. 168 Jingzhou Road, Yangpu District, Shanghai 200082 • Phone +86 21 6169 8500 • Fax +86 21 6169 8599
Czech Republic, Bio-Rad spol. s r.o., Ptkrtova 1737/1a, 14000 Prague 4 • Phone +420 241 431 660
Denmark, Bio-Rad Laboratories, Symbion Science Park, Fruebjergvej 3, DK-2100 Copenhagen East • Phone +45 44 52 10 00 • Fax +45 44 52 10 01
Finland, Bio-Rad Finland Oy, Kutomotte 16 FI-00380, Helsinki • Phone +358 9 804 22 00
France, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette • Phone +33 (0) 1 47 95 60 00 • Fax +33 (0) 1 47 41 91 33
Germany, Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstraße 12, D-85622 Feldkirchen, Munich • Phone +49 (0) 89 31884 393 • Fax +49 (0) 89 31884 136
Greece, Bio-Rad Laboratories M.E.P.E., 2-4 Mesogion Ave. (Athens Tower) 11527 Ampelokipi, Athens • Phone +30 210 7774396 • Fax +30 210 7774376
Hong Kong, Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone +85 2 2789 3300 • Fax +85 2 2789 1257
Hungary, Bio-Rad Hungary Ltd., Futó utca 47-53, 1082, Budapest • Phone +36 1 459 6190 • Fax +36 1 459 6101
India, Bio-Rad Laboratories India Pvt. Ltd., EMAAR Digital Greens, 9th Floor, Tower A- Sector 61 Gurugram-122 102, Haryana 122 015 • Phone +91 124 4029300 • Fax +91 124 2398115
Israel, Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75150 • Phone +972 3 963 6025 • Fax +972 3 951 4129
Italy, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan • Phone +39 02 94 86 600 • Fax +39 02 21609399
Japan, Bio-Rad Laboratories K.K., Tennoz Central Tower 20F, 2-2-24 Higashi-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002 • Phone +81 3 6361 7070 • Fax +81 3 5463 8481
Korea, Bio-Rad Korea Ltd., 10th Floor, Hyunjuk Building, 832-41, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 • Phone +82 080 007 7373 • Fax +82 (2) 3472 7003
Mexico, Bio-Rad, S.A., Avenida Eugenia 197, Piso 10-A, Colonia Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03020 Mexico, D.F. • Phone +52 (55) 5488 7670 • Fax +52 (55) 1107 7246
The Netherlands, Bio-Rad Laboratories B.V., Postbus 222, 3900 AE Veenendaal • Phone +31 (0) 318 540 666 • Fax +31 (0) 318 542 216
New Zealand, Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road Rosedale, Auckland • Phone +64 (9) 415 2280 • Fax +64 (9) 415 2284
Norway, Bio-Rad Laboratories, Nydalsveien 33, 0481 Oslo • Phone +47 23 38 41 30 • Fax +47 23 38 41 39
Poland, Bio-Rad Patska Sp. z o.o., Przykopywa 33, Level 4, Building A, 01-208, Warsaw • Phone +48 22 331 99 99 • Fax +48 22 331 99 88
Portugal, Bio-Rad Laboratories, Lda., Edifício Prime, Ave. Quinta Grande, 53 – Fração 3B Alfragide 26114-521, Amadora • Phone +351 21 47 27 700 • Fax +351 21 47 27 777
Russia, Bio-Rad Laboratori, 117105, Russian Federation, Moscow, Varshavskoe sh., 9, Bldg., 1B • Phone +7 495 721 1404 • Fax +7 495 721 1412
Singapore, Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 3A International Business Park Road, #11-10/16, ICON @ IBP Tower B, Singapore 609935 • Phone +65 6415 3170 • Fax +65 6415 3189
South Africa, Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Ave, Rosebank, Johannesburg • Phone +27 11 442 8506 • Fax +27 11 442 8525
Spain, Bio-Rad Laboratories, S.A., C/ Caléndula, 95, Edificio M. Miriparc II, El Soto de la Moraleja, 28109 Alcobendas • Phone +34 91 490 6580 • Fax +34 91 590 5211
Sweden, Bio-Rad Laboratories A.B., Solna Strandväg 3, SE-171 54 Solna, P.O. Box 1097, SE-172 22 Sundbyberg • Phone +46 844 98053 • Fax +46 8 55 51 27 80
Switzerland, Bio-Rad Laboratories AG, Pra Rond 23, CH-1785 Cressier • Phone +41 (0) 61 717 9555 • Fax +41 (0) 61 717 9550
Taiwan, Bio-Rad Laboratories Taiwan Ltd., 14th F B, No. 126, Sec. 4, Nan-King East Road, Taipei 10546 Taiwan, R.O.C. • Phone +886 (2) 2578 7189 • Fax +886 (2) 2578 6890
Thailand, Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Road., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone (662)651 8311 • Fax (662) 651 8312
United Kingdom, Bio-Rad Laboratories Ltd., The Junction Station Road, Watford, Hertfordshire, WD17 1ET • Phone +44 (0) 1923 471301 • Fax +44 (0) 1923 471340