

Instructions for use

InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G

INVITEK
diagnostics

ALS Life Sciences Portugal, S.A.
Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6,
3460-070 Adiga - Tondela, Portugal

Phone: +351 232 817 817
info@invitek.com
invitek.com

UDI 5600236235105
REF 6010002200

100 testes

-15 °C
-25 °C

IVD

1. Finalidade prevista

O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G é um dispositivo de diagnóstico in vitro baseado na tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real (RT-PCR), para a deteção de RNA de SARS-CoV-2 isolado de exsudados nasais, nasofaríngeos e orofaríngeos obtidos de indivíduos com suspeita de COVID-19. Em conjunto com outros dados clínicos e epidemiológicos relevantes, os resultados da deteção do RNA viral em amostras humanas servem de auxílio ao diagnóstico da COVID-19 por parte de profissionais de saúde habilitados para o efeito. O kit e os seus componentes devem ser primariamente utilizados por profissionais de saúde e técnicos de laboratório devidamente treinados e com formação específica em procedimentos de diagnóstico in vitro, em laboratórios de análises clínicas. Pode também ser utilizado de modo secundário por profissionais de saúde (médicos) em ambiente hospitalar/clínico que utilizam o resultado teste de diagnóstico in vitro como suporte à decisão sobre o tratamento médico adequado.

2. Princípio do método

A técnica de RT-PCR é uma forma de reação de PCR que utiliza a enzima transcriptase reversa (RT) para converter RNA em DNA complementar (cDNA), sendo que a amplificação dessa sequência de cDNA é depois monitorizada em tempo real através do uso de sondas de hidrólise (sondas Taqman). Durante a fase de extensão do ciclo de PCR, a atividade nuclease 5' da Taq polimerase degrada as sondas Taqman, levando à separação do fluoróforo do seu quencher respetivo, com consequente aumento do sinal de fluorescência. Este sinal de fluorescência é monitorizado a cada ciclo de PCR pelo instrumento de RT-PCR (termociclador em tempo real). Um aumento do número de cópias do gene alvo durante a reação de PCR conduz, por conseguinte, a um aumento na intensidade de fluorescência, medida a cada ciclo.

O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi desenvolvido para detetar especificamente regiões altamente conservadas do genoma do SARS-CoV-2 correspondentes a dois genes específicos: a poliproteína ORF1ab e fosfoproteína da nucleocápside (N). Mais ainda, o kit permite também a deteção da proteína estrutural do envelope (E) específica do subgénero Sarbecovírus. As regiões genómicas utilizadas como alvos, bem como as sequências dos primers e sondas Taqman, foram baseadas nas recomendações fornecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Centro de Controlo de Doenças (CDC) e Direção Geral de Saúde (DGS). Adicionalmente, o kit disponibiliza primers e sonda de hidrólise para detetar o gene da Ribonuclease P (RNase P) humana que serve como um controlo endógeno do procedimento de extração de ácidos nucleicos, do processo de amplificação, da integridade dos reagentes do kit e da amostra (em caso de degradação de RNA viral). A deteção dos fragmentos de DNA amplificados é conseguida recorrendo a diferentes canais de fluorescência (FAM, HEX, Cal Red 610 e Cy5) disponíveis nos termocicladores em tempo real.

3. Conteúdo do kit

REF.	COMPONENTES	COLOR DA TAMPA	QUANTIDADES
COV05	Primer/Probe Mix	●	1 tubo, 500 µl
COV06	Enzyme Mix	●	1 tubo, 1000 µl
COV07	Negative Control	○	1 tubo, 100 µl
COV08	Positive Control	●	1 tubo, 100 µl

4. Armazenamento

Os reagentes devem ser armazenados selados a -20 ± 5°C e podem ser utilizados até à data de validade indicada no rótulo da embalagem. Do estudo das condições de estabilidade do kit considera-se que o kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G na sua embalagem original, cumprindo as especificações recomendadas

para armazenamento, uso e transporte, é estável até à data de validade especificada na embalagem e esta não deverá ser excedida. Os reagentes Primer/Probe Mix e Enzyme Mix devem ser armazenados no escuro. Manusear todos os reagentes em refrigeração e evitar ciclos de congelação/descongelação (>3x) correndo o risco de comprometer a sensibilidade do ensaio.

5. Equipamento e material necessários (não fornecidos)

- Kit de extração de RNA Viral
- Termociclador em tempo real
- Placas e/ou tubos para RT-PCR
- Tubos de microcentrifuga 1,5 mL
- Cabine PCR
- Micropipetas (10, 200 e 1000 µL) e pontas com filtro
- Vortex
- Microcentrifuga

6. Advertências e/ou precauções a adotar

- Ler cuidadosamente as instruções de utilização antes de usar o kit. Este produto é um dispositivo médico destinado ao diagnóstico in vitro.
- O ensaio deve ser realizado por pessoal competente, qualificado em técnicas laboratoriais de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico.
- O teste InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G destina-se à deteção de RNA viral de SARS-CoV-2, e não se destina a ser utilizado para a deteção de quaisquer outros vírus ou organismos.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como se fossem infecciosas, seguindo as devidas precauções de biossegurança de acordo com os requisitos e/ou da legislação aplicável.
- O kit deve ser utilizado de acordo com as Boas Práticas de Laboratório.
- Não utilizar o kit nem nenhum dos seus componentes após a data de validade.
- O kit deve ser transportado e armazenado a -20 ± 5°C. Antes do uso, os componentes do kit devem ser totalmente descongelados, agitados e centrifugados. Evitar congelar e descongelar repetidamente os reagentes do kit.
- Evitar a contaminação microbiana e/ou com DNase/RNase das amostras e dos reagentes do kit.
- Recomenda-se preparar a mistura reacional cuidadosamente em ambiente controlado, de preferência em zona livre de ácidos nucleicos. A adição do controlo positivo e do RNA da amostra deve ser realizada preferencialmente em sala separada.
- Preparar as misturas reacionais em gelo ou sob refrigeração.
- Utilizar sempre luvas e pontas estéreis com filtro.
- Evitar a formação aerossóis.
- Não usar componentes de outros lotes.
- Descartar placas imediatamente após término do teste. As placas devem ser sempre descartadas em recipiente de risco biológico adequado após o uso.
- Descartar as amostras e restos de reagentes de acordo com as diretivas de segurança locais e legislação aplicável.

7. Tipo de Amostra, Colheita, Armazenamento e Transporte

O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi validado para utilização com RNA extraído de amostras colhidas do trato respiratório superior humano, e de acordo com as instruções fornecidas pela DGS (Orientação nº 15/2020). As amostras devem ser colhidas em tubos estéreis, extraídas imediatamente ou refrigeradas a -2-8 °C (se extraídas em 24h). É da responsabilidade do utilizador do kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G garantir o cumprimento dos requisitos de colheita e transporte de amostras, de modo a não comprometer a sensibilidade do teste. A extração de RNA das amostras deverá ser

Instructions for use

InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G

INVITEK
diagnostics

realizada usando uma metodologia ou kit comercial apropriados para o efeito. A escolha do kit de extração de RNA viral é da responsabilidade do utilizador, devendo ser previamente validado pelo utilizador.

8. Procedimento de Ensaio

a. Preparação da reação de PCR

Permitir que todos os reagentes descongelem à temperatura ambiente e centrifugar brevemente para evitar retenção de gotículas na tampa do tubo. Para cada reação, preparar a mistura reacional em gelo de acordo com a tabela abaixo:

REAGENTE	VOLUME
Enzyme Mix	10 µL
Primer/Probe Mix	5 µL
Volume Total	15 µL

1) Homogeneizar a mistura reacional e pipetar 15 µL da mistura resultante para poços individuais de acordo com a configuração da placa de PCR prevista;

2) Adicionar 5 µL do extrato de RNA viral a cada poço; Pelo menos uma reação de controlo positivo e uma reação de controlo negativo devem ser incluídas no planeamento da análise de PCR, substituindo nestes poços a amostra por 5 µL de Controlo Positivo e 5 µL de Controlo Negativo, respetivamente. É recomendado preparar a mistura reacional cuidadosamente em ambiente controlado, de preferência em zona livre de ácidos nucleicos. A adição do controlo positivo e do RNA da amostra deve ser realizada preferencialmente em sala separada.

b. Protocolo de amplificação

As condições de amplificação são as seguintes:

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
1 Transcrição reversa	50 °C	5 min	1
2 Ativação enzimática	95 °C	30 seg	1
3 Desnaturação	95 °C	5 seg	45
4 Hibridização/extensão leitura de placa*	58 °C	30 seg	

* Os dados de fluorescência devem ser obtidos durante esta etapa através dos canais FAM (gene ORF1ab), HEX (gene N), Cal Red 610 (gene E) e Cy5 (gene RNase P).

c. Interpretação de Resultados

Um resultado é considerado positivo quando Ct ≤ 40.

RESULTADO	Gene ORF1a (FAM)	Gene N (HEX)	Gene E (Cal Red610)	RNase P (Cy5)	Ações
Positivo	+	+	+	+/-	---
	+	+	-	+/-	
	+	-	+	+/-	
	-	+	+	+/-	
Positivo presuntivo	+	-	-	+/-	Repetir o PCR: se repetir resultado, teste Positivo.
Negativo	-	-	-	+	---
	-	+	-	+	
	-	-	+	+	
Inconclusivo	-	-	-	-	Teste inválido. Recomenda-se repetir a extração de RNA ou diluir a amostra 1:5. Se repetir resultado, recomendar nova colheita.

Sensibilidade analítica: 2,5 cópias/µL

Nota: A sensibilidade analítica depende do volume da amostra, volume de eluição, método de extração do RNA viral e outros fatores.

9. Controlo de Qualidade

O ensaio apenas pode ser considerado válido nas seguintes condições de controlo:

CONTROLOS	Gene ORF1ab (FAM)	Gene N (HEX)	Gene E (Cal Red610)	RNase P (Cy5)
Controlo Positivo	+	+	+	+
Controlo Negativo	-	-	-	+/-

O controlo negativo e o controlo positivo servem de calibrador do kit e devem ser utilizados em todos os ensaios. Caso não se verifiquem todos os critérios acima, o teste é considerado inválido.

Neste caso, as condições dos equipamentos, reagentes e protocolo devem ser verificados e o ensaio repetido.

10. Limitações ao Método

a. As características de desempenho só foram estabelecidas com os tipos de amostra descritos na secção "Finalidade Prevista". As amostras devem ser colhidas, transportadas e processadas corretamente.

b. Os resultados do teste são apenas para referência clínica, não podendo ser usados como único critério para o diagnóstico ou exclusão de casos. O diagnóstico clínico e o tratamento dos pacientes devem ser combinados com os seus sintomas, sinais, histórico médico, exames laboratoriais, entre outros.

c. Os resultados negativos indicam apenas que a quantidade de material genético viral na amostra é inferior ao limite de deteção. É possível que um resultado de teste negativo ocorra numa fase inicial de infeção, devido a baixas cargas virais. No caso de agravamento de sintomas deverá ser realizado novo teste.

d. O teste permite a deteção da presença de RNA do vírus SARS-CoV-2 até um limite de 2,5 cópias/µL. Os resultados positivos não excluem infeção por outros agentes bacterianos ou virais. Os resultados negativos não excluem a presença de infeção por SARS-CoV-2 tendo em conta a janela temporal em que o material genético do vírus é detetável, e deve ser combinado com outras informações clínicas e epidemiológicas do paciente para auxiliar o diagnóstico.

11. Características de Desempenho

Precisão: A precisão do kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi determinada com base na variabilidade intra-ensaio (variabilidade de amostras com a mesma concentração num ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade devida à utilização de diversos equipamentos e operadores do mesmo laboratório) e na variabilidade inter-lote (variabilidade devida à utilização de diferentes lotes). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises. Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base nos valores de Ct. Foram realizados pelo menos seis replicados por amostra quanto às variabilidades intra-ensaio, inter-ensaio e inter-lote, utilizando diluições sucessivas do material de referência para concentrações finais de 100000 e 2,5 cópias/µL. Uma análise global aos resultados demonstra que os coeficientes de variação médios globais dos valores de Ct para as três variabilidades analisadas são inferiores 5%.

Exatidão: O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi comparado com outro kit comercialmente disponível para a determinação da presença de SARS-CoV-2 em amostras clínicas. Foram realizadas 94 análises e os resultados demonstraram a especificidade metodológica do kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G uma vez que detetou 45/45 positivos e 49/49 negativos clínicos.

Reatividade cruzada (exclusividade): A especificidade do InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G é, em primeiro lugar, garantida através da seleção dos primers e das sondas de hidrólise, assim como da otimização das condições reacionais. A exclusividade analítica foi avaliada por análise in silico usando sequências depositadas no GenBank de organismos patógenos evolutivamente próximos do SARS-CoV-2 e de patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes ao SARS-CoV-2. Nenhuma reatividade cruzada in silico foi encontrada para os organismos da lista recomendada tais como Coronavírus humano 229E, Adenovírus (e.g. C1 Ad. 71), Coronavírus humano OC43, Metapneumovírus humano (hMPV), Coronavírus humano HKU1, Vírus Parainfluenza 1-4, Coronavírus humano NL63, Gripe A, B & C, SARS-coronavírus, Enterovírus (e.g. EV68), MERS-coronavírus, Rhinovírus, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Bordetella pertussis, Mycoplasma pneumoniae, Pneumocystis jirovecii (PJP), Candida albicans,

Instructions for use

InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G

INVITEK
diagnostics

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e *Legionella pneumophila*. Paralelamente, foi realizada uma avaliação in vitro para a determinação da especificidade do InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G com um grupo controle de patógenos (não detetados pelo kit) que podem estar associados a amostras respiratórias clínicas. Nenhum dos agentes patógenos testados com o kit apresentou reatividade cruzada, tais como Infectious Bronchitis Virus (D388 strain), Infectious Bronchitis Virus (1/96 strain), Avian Orthoreovirus, Porcine circovirus 2, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (DV strain), Porcine reproductive and respiratory syndrome (Leystad Virus - EU strain), Porcine reproductive and respiratory syndrome (VR-2332 - US strain), Infectious Bursal disease Virus (D78 strain), Infectious Bursal disease Virus (W2512 strain), Avian rhinotracheitis (ART), Infectious laryngotracheitis (ILT), Adenovirus, *Escherichia coli* (NCTC 9001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Legionella pneumophila* (ATCC 33152), *Klebsiella pneumoniae* (MR35 isolate), Hepatovirus A (HAV) e Norovirus do Grupo I e II.

Especificidade analítica (inclusividade): O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi desenhado para a detecção de sequências de RNA viral de SARS-CoV-2. O alinhamento das regiões genômicas utilizadas como alvos (ORF1ab, N e E), bem como as sequências dos primers e sondas de hidrólise, foi efetuado com todas as sequências de isolados clínicos de SARS-CoV-2 disponíveis na base de dados GISAID (836419) à data de 27 de Abril de 2021, usando a ferramenta PrimerChecker (<https://www.epicov.org/epi3/>) de maneira a demonstrar a inclusividade estimada da detecção pelo InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G. Para o gene alvo ORF1ab, obteve-se 99.4% de correspondência para todas as sequências testadas, sendo que apenas 0.063% das mutações foram encontradas na extremidade 3', reconhecida como sendo crítica para o correto emparelhamento dos primers e sondas. Para o gene alvo N, obteve-se 95.54% de correspondência com todas as sequências, sendo que apenas 0.353% das mutações foram encontradas na extremidade 3'. No caso do gene alvo E, obteve-se 99.65% de correspondência com todas as sequências, sendo que apenas 0.031% das mutações foram encontradas na extremidade 3'. Como tal, com esta combinação de primers e sondas, não é previsto que qualquer das incompatibilidades encontradas tenha impacto significativo no desempenho analítico do kit, dada a localização das mutações nas regiões da sonda de hidrólise e primers das variantes. Não há previsão de que essas mutações afetem adversamente a ligação da sonda de hidrólise e do primers às sequências e/ou reduzam a eficiência do kit. Adicionalmente foram testadas in vitro estirpes de referência das variantes de preocupação Alfa, Beta, Gamma, Delta e Omicron. O kit detetou ambos os genes virais (ORF1ab, N e E) em todas as estirpes testadas.

Sensibilidade analítica e limite de detecção: Os estudos de sensibilidade analítica determinam a menor concentração detetável de SARS-CoV-2 em que $\geq 95\%$ de todos os replicados testam positivo (limite de detecção). O limite de detecção (LoD) foi determinado utilizando diluições sucessivas do material de referência preparado como descrito acima no ponto a. O material de referência positivo (quantificado por ddPCR) foi diluído sucessivamente (mínimo de três diluições sucessivas, geralmente de base 10), de tal forma que na diluição mais baixa (concentração mais alta, 100000 cópias/ μ L) todos os resultados sejam positivos (para todos os genes alvo) e na diluição seguinte possam existir resultados positivos e resultados negativos. Na última diluição (concentração mais baixa, 1 cópia/ μ L) é esperado que todos os resultados ou grande parte tenham resultados negativos. A determinação do LoD estimado foi realizada com três lotes de reagentes distinto sem pelo menos 20 replicados independentes de cada diluição. A concentração com taxas de detecção iguais ou superiores a 95% no estudo de determinação do LoD foi de 2.5 cópias/ μ L para os alvos ORF1ab, N, E e RNaseP.

Intervalo de medição: O kit InviScreen® SARS-CoV-2 RT-PCR 4G foi desenhado para efetuar a determinação qualitativa da presença do vírus SARS-CoV-2. Neste sentido, verifica-se que a quantidade mínima de cópias/ μ L de vírus possível de ser detetada com 95% de confiança é de 2.5 cópias/ μ L (correspondente ao LoD do método) por reação de PCR, tendo sido testado um máximo de 100000 cópias/ μ L de genes alvo. Ainda assim, não se exclui a possibilidade de o kit detetar um valor acima à concentração máxima testada.

Reprodutibilidade: Para avaliar a reprodutibilidade foram realizados 2 replicados da diluição do material de referência interno positivo numa concentração de 100000 cópias/ μ L durante 2 dias consecutivos, em 4 equipamentos diferentes, com 2 lotes distintos e realizados por 2 operadores diferentes, num total de 32 observações obtendo-se um coeficiente de variação médio global igual a 2.86% que demonstra a reprodutibilidade do kit.

Rastreabilidade metrológica dos valores de calibradores e materiais de controlo: De acordo com a ISO 17511:2020, o material de referência disponibilizado com o kit não carece de rastreabilidade metrológica uma vez que se destina a ser usado apenas para fins de controlo de qualidade interno em laboratórios médicos e é fornecido com intervalos de valores aceitáveis sugeridos que não são metrologicamente rastreáveis a componentes do sistema de referência de ordem superior.

12. Referências

- [1] Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Disponível online em <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>
- [2] Norma 15/2020 da Direção Geral de Saúde. Disponível online em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0152020-de-24072020-pdf.aspx>
- [3] Comunicação da Comissão Europeia – Orientações sobre os testes de diagnóstico in vitro para a COVID-19 e respetivo desempenho (2020/C 122 1/01)
- [4] World Health Organization (WHO) - Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Disponível online em <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
- [5] Avaliação rápida dos riscos: Pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19): aumento da transmissão na UE/EEE e UK – oitava atualização. Disponível online em <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019-covid-19-pandemic-eighth-update>

13. Tabela de Símbolos

	Identificador único do dispositivo
	Dispositivo de diagnóstico médico in vitro
	Número de catálogo
	Código de lote
	Manter seco
	Controlo positivo
	Controlo negativo
	Limite de temperatura
	Consultar instruções para utilização
	Fabricante
	Usar até
	Suficiente para
	Marcação CE
	Manter fora do alcance da luz solar (Primer/Probe Mix)