

Allplex™

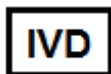
SARS-CoV-2 Assay

(Cat. Nº RV10247Y)

Sistema RT-PCR multiplex em tempo real para detecção de SARS-CoV-2 oriundo de aspirado nasofaríngeo, amostra nasofaríngea por zaragatoa, lavado broncoalveolar, zaragatoa orofaríngeo (garganta) e expectoração.

Para uso com

1. CFX96™ Real-time PCR System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)
2. CFX96™ Dx System (CFX Manager™ Dx Software v3.1)
3. Applied Biosystems™ 7500 (SDS software v2.0.5)



Somente para uso de diagnóstico *in vitro*



Seegene Inc.,
Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Germany

Não disponível nos EUA

ÍNDICE

AVISOS	3
USO PRETENDIDO	4
VISÃO GERAL DOS PRINCÍPIOS E PROCEDIMENTOS	5
INFORMAÇÕES DE REFERÊNCIA	6
REAGENTES	7
ARMAZENAMENTO E MANUSEIO	8
MATERIAIS EXIGIDOS MAS NÃO FORNECIDOS	8
PROTOCOLO	9
CONFIGURAÇÃO DO INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE RESULTADOS	17
CFX96™ Real-time PCR System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)	17
CFX96™ Dx System (CFX Manager™ Dx Software v3.1)	27
Applied Biosystems™ 7500 (SDS software v2.0.5)	37
RESULTADOS	46
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	50
DESEMPENHO	52
REFERÊNCIAS	57
SÍMBOLOS	59
INFORMAÇÕES DE PEDIDO	60

AVISOS

- Somente para uso de diagnóstico *in vitro*
- O Allplex™ SARS-CoV-2 Assay deve ser realizado por pessoal qualificado e treinado.
- A fiabilidade dos resultados depende de um processo adequado de coleta, armazenamento, transporte e processamento da amostra.
- **Este teste foi validado para os seguintes tipos de amostras: aspirado nasofaríngeo, amostra nasofaríngea por zaragatoa, lavado broncoalveolar, zaragatoa orofaríngeo (garganta) e expectoração.** Este teste não foi validado para quaisquer outros tipos de amostragem.
- **Armazenar as amostras de RNA a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ até o uso e manter em gelo durante o uso.**
- A sensibilidade do ensaio pode diminuir caso as amostras sejam repetidamente congeladas/descongeladas ou armazenadas por um período de tempo mais longo.
- O fluxo de trabalho em laboratório deve prosseguir de forma unidirecional.
- Usar luvas descartáveis e trocá-las antes de adentrar em diferentes áreas. Trocar luvas imediatamente caso sejam contaminadas ou tratá-las com reagente descontaminante de DNA.
- Os suprimentos e equipamentos devem ser dedicados às áreas de trabalho e não devem ser movidos de uma área para outra.
- Não pipetar pela boca.
- Não comer, beber ou fumar nas áreas de trabalho laboratorial. Usar luvas descartáveis sem pó, revestimentos de laboratório e proteção para os olhos quando manusear amostras e reagentes. Lavar as mãos cuidadosamente depois de manusear as amostras e reagentes de teste.
- Evitar a contaminação dos reagentes ao retirar alíquotas dos tubos de reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas descartáveis estéreis e resistentes à contaminação por aerossol para pipetas descartáveis.
- Não reunir reagentes de lotes diferentes ou de tubos diferentes do mesmo lote.
- Não utilizar o produto após seu prazo de validade.
- Não reutilizar todos os itens descartáveis.
- Utilizar tubos roscados e evitar quaisquer salpicos ou contaminação cruzada das amostras durante a preparação.
- Tomar todo o cuidado para não contaminar os reagentes com ácidos nucleicos extraídos, produtos de PCR e controlos positivos. Para evitar a contaminação dos reagentes, recomenda-se a utilização de filtros.
- Usar áreas de trabalho separadas e segregadas para cada experimento.
- Para evitar a contaminação das áreas de trabalho com produtos amplificados, abrir os

tubos ou tiras de reação de PCR somente nas áreas de trabalho designadas após a amplificação.

- Armazenar materiais positivos separados dos reagentes do kit.
- Procedimentos de segurança laboratorial (consultar Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos e Documentos do CLSI - Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais) devem ser tomados ao manusear amostras. Limpar e desinfetar completamente todas as superfícies de trabalho com hipoclorito de sódio a 0,5% (em água deionizada ou destilada). Os componentes do produto (resíduos do produto e embalagens) podem ser considerados resíduos de laboratório. Eliminar reagentes e resíduos não utilizados de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais aplicáveis.
- O prazo de validade é de 13 meses a partir da data de fabricação se mantido a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Favor consultar rótulo para visualizar o prazo de validade.
- A correlação clínica com o histórico do paciente e demais informações de diagnóstico é necessária para determinar o status da infecção do paciente.
- O nome da marca de “CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” foi alterado para “CFX96™ Dx System”. Como não há alterações de hardware nos sistemas, espera-se obter os mesmos resultados de ambos os sistemas.
- “CFX Manager™ Dx Software v3.1” é uma versão atualizada de “CFX Manager™ Software-IVD v1.6”. O software atualizado inclui aprimoramentos no menu “Run (Execução)”. Esses aprimoramentos não afetam os resultados da análise de dados; portanto, os resultados serão os mesmos.
- Este kit é um teste qualitativo *in vitro* para a detecção única ou múltipla de 4 tipos de gene (E gene, RdRP gene, S gene, e N gene).

USO PRETENDIDO

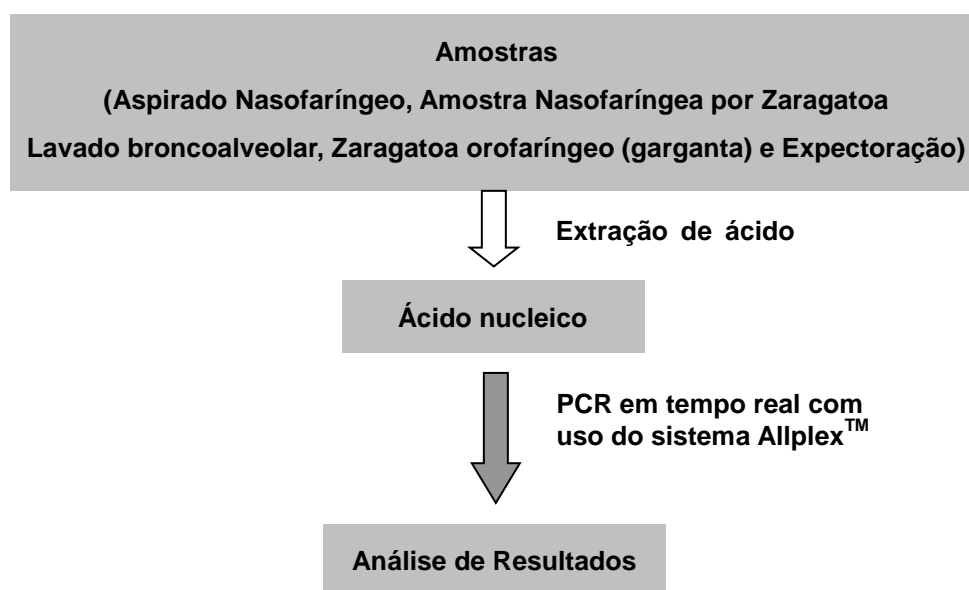
O Allplex™ SARS-CoV-2 Assay é um dispositivo de diagnóstico médico *in vitro* projetado para detecção qualitativa de SARS-CoV-2 com PCR de transcrição reversa em tempo real de aspirado nasofaríngeo, amostra nasofaríngea por zaragatoa, lavado broncoalveolar, zaragatoa orofaríngeo (garganta) e expectoração.

VISÃO GERAL DOS PRINCÍPIOS E PROCEDIMENTOS**1. Princípios**

O Allplex™ SARS-CoV-2 Assay é um ensaio de PCR multiplexado em tempo real que permite amplificação e detecção simultâneas de ácidos nucleicos alvos de E gene, RdRP gene, S gene, and N gene com Controlo Interno (IC). A presença de sequências específicas de genes na reação é relatada como um valor de Ct através do software de análise Seegene Viewer.

Um gene humano exógeno é usado como Controlo Interno (IC) para monitoração de todo o processo desde a coleta de amostras, a extração de ácido nucleico e, também, para verificar qualquer possível inibição de PCR.

Para evitar que o produto de amplificação aja como um dos contaminantes potenciais, o sistema Uracil-DNA glicosilase (UDG)-dUTP é empregado no Allplex™ SARS-CoV-2 Assay. O sistema UDG-dUTP é comumente usado quando se executa a PCR para eliminar o acúmulo de amplicons por meio de UDG a excisar resíduos de uracilo do DNA com clivagem de ligação N-glicosídica.

2. Visão Geral do Procedimento

< Visão geral de procedimentos do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay >

INFORMAÇÕES DE REFERÊNCIA

1. Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2)


O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), anteriormente conhecido pelo nome provisório novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV), é a causa da doença respiratória por coronavírus datada de 2019 (COVID-19). Taxonomicamente, é uma cepa do coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARSr-CoV), um vírus de RNA de filamento único de sentido positivo. Trata-se de uma cepa contagiosa em humanos. A Organização Mundial de Saúde (WHO) designou a pandemia em curso do COVID-19 como uma Emergência em Saúde Pública de Interesse Internacional.

Acredita-se que o SARS-CoV-2 deva ter origens zoonóticas. Possui similaridade genética próxima aos coronavírus de morcego, o que sugere que tenha surgido de um vírus transmitido por morcegos. Pensa-se também que um reservatório intermediário de animais, como um pangolim, esteja envolvido em sua introdução aos seres humanos. Cientistas chineses isolaram o SARS-CoV-2 pela primeira vez em 7 de janeiro de 2020, amostras oriundas de pacientes em Wuhan, China, os quais tiveram pneumonia de causa desconhecida em dezembro de 2019.

REAGENTES

Os reagentes contidos num kit são suficientes para 50 reações.

Informações de pedido (**REF** Cat. N° RV10247Y)

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay			
Símbolo	Conteúdos	Volume	Descrição
PRIMER	SARS2 MOM	250 µL	Oligo Mix - Reagente de amplificação e deteção
PREMIX	EM8	250 µL	- RTase - DNA polimerase - Uracil-DNA glicosilase (UDG) - Tampão contendo dNTPs
CONTROL +	SARS2 PC	25 µL	Controlo Positivo (PC): - Mistura de clones de patógenos e IC
CONTROL IC	RP-V IC 2	500 µL	Controlo Interno Exógeno (IC)
WATER	RNase-free Water	1.000 µL	Qualidade ultrapura, grau de PCR
	Manual do usuário		

ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

Todos os componentes do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay devem ser armazenados a ≤ -20°C. Todos os componentes são estáveis nas condições de conservação recomendadas até o prazo de validade indicado no rótulo. O desempenho dos componentes do kit não é afetado por até 5 processos de congelamento e descongelamento. Caso os reagentes forem ser utilizados apenas de forma intermitente, os mesmo devem ser armazenados em alíquotas.

MATERIAIS EXIGIDOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Luvas descartáveis sem pó (látex ou nitrilo)
 - Pipetas (ajustáveis) e pontas de pipeta Estéreis
 - Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
 - Sistema de Extração de Ácido Nucleico (vide Extração de Ácido Nucleico)
 - Bancada limpa
 - Fabriqueta de gelo
 - Centrífuga de mesa
 - Misturador de vórtex
 - Sistema de Detecção por PCR em Tempo Real CFX96™ (Bio-Rad)
 - CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
 - Applied Biosystems™ 7500 (Thermo Fisher Scientific)
 - 8 Tiras de Tubo de Perfil Baixo com 0,2 mL sem Tampas (cor branca, Cat. N° TLS0851, Bio-Rad)*
 - 8-Tiras Ópticas Planas com Tampa (Cat. N° TCS0803, Bio-Rad)*
 - Microplacas de PCR 96 poços Hard-Shell®, baixo perfil, parede fina, com borda, branco/branco (Cat. N° HSP9655, Bio-Rad)*
 - Microplacas de PCR 96 poços Hard-Shell®, baixo perfil, parede fina, com borda, branco/branco, com código de barras (Cat. N° HSP9955, Bio-Rad)*
 - Vedação Térmica Transparente Permanente (Cat. N° 1814035, Bio-Rad)* §
 - Selador de placa PCR PX1 (auto selagem, Cat. N° 181-4000, Bio-Rad)* §
 - Tira de 8 tubos com 0,1 mL UE, LP, W, altamente robusta (Cat. N.º B72719, BIOplastics)*
 - Tira ótica placa de 8 tampas UE (Cat. N.º B57801, BIOplastics)*
 - 96 x placa de 0,1 mL, LP, W, FULL, placa de 96 poços (Cat. N.º B70679, BIOplastics)*
 - Folha de selagem ótica Opti-Seal (Cat. N.º 157300, BIOplastics)*
 - Placa de reação ótica com 96 poços MicroAmp® (Cat. N° N8010560, Thermo Fisher Scientific)**
 - Placa de reação ótica com 96 poços MicroAmp™ com código de barras (Cat. N° 4306737, Thermo Fisher Scientific)**
 - Tampas óticas adesivas (Cat. N° 4360954, Thermo Fisher Scientific)**
 - 8 tiras de tubo óticas MicroAmp™, 0,2 mL (Cat. N° 4316567, Thermo Fisher Scientific)**
 - 8 tiras óticas com tampa MicroAmp™ (Cat. N° 4323032, Thermo Fisher Scientific)**
- * Produtos para CFX96™ Real-time PCR Detection e CFX96™ Dx System
** Produtos pra Applied Biosystems™ 7500
§ Certificar-se de usar vedação térmica e o selador de placas listados acima juntos.

PROTOCOLO
1. Coleta, Armazenamento e Transporte de Amostras

Observação: Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso. Só serão permitidos materiais de amostra que forem recolhidos, armazenados e transportados com estrito respeito às seguintes regras e instruções.

Observação: Para garantir alta qualidade da amostragem, as amostras devem ser transportadas o mais rápido possível e nas temperaturas indicadas.

A. Coleta de Amostras
Aspirado Nasofaríngeo, Amostra Nasofaríngeo por Zaragatoa, Lavado Broncoalveolar, Zaragatoa orofaríngeo (garganta)

- As amostras de aspirado nasofaríngeo, amostra nasofaríngeo por zaragatoa, lavado broncoalveolar e zaragatoa orofaríngeo (garganta) são rotineiramente examinadas em busca de patógenos respiratórios comuns.
- A obtenção de amostras respiratórias pode ser difícil em alguns pacientes. Em tais casos, as amostras por zaragatoas nasofaríngeas podem ser colhidas de forma simples e eficiente, basta utilizar novas zaragatoas de nylon flocado (COPAN, Itália) e Meio de Suporte Universal (UTM).

Expectoração

- Dar instruções claras aos pacientes ao coletar amostras de expectoração. Os pacientes devem coletar amostras ao ar livre ou longe de outras pessoas. Os pacientes não devem coletar amostras em espaços confinados, como banheiros.
- Enxaguar a boca com água antes de coletar a expectoração. O paciente deve tossir profundamente e expectorar o escarro diretamente no recipiente.
- A amostra de expectoração deve ter um volume de 3~5 mL.

Fabricante	Dispositivo de coleta de amostra	Cat. Nº.
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR** (APLICADOR PERINASAL ENAT PM 2ML**)	606CS01P*
COPAN	UTM with Flocked Swabs UTM com Zaragatoas de Pontas Flocadas	360C / 305C
DIAGNOSTIC HYBRIDS	UTM with Flexible Minitip Flocked Swab UTM com Zaragatoas Flexíveis de Minipontas Flocadas	403C / 406C
COPAN	MSwab® kit (Kit MSwab®)	6E012N / 6E013N
COPAN	MSwab® bulk (MSwab® a granel)	6E011N
Noble Biosciences	CTM (Clinical Virus Transport Medium (Meio de Transporte de Vírus Clínico))	UTNFS-3B-2- N1P / UTNFS-3B-2

SG Medical	GeneTM Set (GTS2)**	T5001
SG Medical	GeneTM Set (GTS1)**	T5002
SG Medical	ALLTM Set (ATS 1)	T5004
SG Medical	ALLTM Set (ATS 2)	T5003
SG Medical	ALLTM Medium	T5103

*Utilize os números de catálogo indicados acima para adquirir produtos da Seegene Inc.

** ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR, GeneTM Set (GTS2) e GeneTM Set (GTS1) não se aplicam ao método sem extração.

B. Armazenamento e Transporte de Amostras

Amostra	Armazenamento e Transporte		Observação
	Temp.	Duração*	
Aspirado nasofaríngeo	2~8°C	3 dias	- O desempenho pode ser afetado pelo armazenamento prolongado de espécimes. - As amostras devem também respeitar as instruções locais e nacionais para transporte de materiais patogênicos.
Amostra nasofaríngeo por zaragatoa			
Lavado broncoalveolar			
Zaragatoa orofaríngeo (garganta)			
Expectoração			

* Duração: O período de tempo desde a coleta da amostra até o teste final (inclui transporte e armazenamento das amostras antes dos testes).

2. Extração de ácido nucleico

[Métodos de extração em diferentes amostras]

Observação: Utilize os kits manuais ou o sistema de extração automatizada de acordo com a amostra, como indicado na tabela seguinte.

Espécime	Kits manuais		Sistema de extração automatizada							Sem extração ***§
	QIAamp® DSP Virus Spin Kit	Ribo_ spin vRD	NucliSENS® easyMAG®	SGprep 32	SEEPREP32		KingFisher Flex*	MagNA Pure 96*	Maelstrom ™ 9600**	
					STARMag 96 ProPrep	STARMag 96 ProPrep C***				
Aspiração nasofaríngea	O	O	O	O	O	X	O	O	X	X
Esfregaço nasofaríngeo	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Lavagem broncoalveolar	O	O	O	O	O	X	X	X	X	X
Esfregaço orofaríngeo (garganta)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Escarro	O	O	O	O	O	X	O	O	O	X

* O lavado broncoalveolar não foi validado com KingFisher Flex e MagNA Pure 96.

** O lavado broncoalveolar e o aspirado nasofaríngeo não foram validados com Maelstrom™ 9600.

*** O aspirado nasofaríngeo, o lavado broncoalveolar e a expectoração não foram validados com o STARMag 96 ProPrep C e método sem extração.

§ As amostras utilizando ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR, Gene™ Set (GTS2) e Gene™ Set (GTS1) não se aplicam ao método sem extração.

2-1. Extração padrão

A. Pré-tratamento de amostra

Observação: O processo de pré-tratamento para extrair o ácido nucleico é o mesmo entre os kits manuais e o sistema de extração automatizado (NucliSENS® easyMAG®, SGprep32, SEEPREP32, KingFisher Flex, MagNA Pure 96, Maelstrom™ 9600).

Expectoração

- Adicionar 2 volumes de 1X PBS ou solução salina à amostra de 1 volume no tubo cônico de 15 mL e agitar cuidadosamente para dispersar a amostra.
- Transferir o volume recomendado (Vide Vol. Recomendado de 2-C, 2-D) de amostra para um novo tubo.
- Seguir o protocolo do kit de extração.

Observação: No caso de amostras sem viscosidade, o passo de pré-tratamento NÃO é necessário.

B. Controlo Interno

Observação: O IC incluído no kit permite aos usuários confirmar não apenas o procedimento de extração de ácido nucleico, mas também identificar qualquer inibição de PCR.

- 10 µL de RP-V IC 2 deve ser adicionado a cada amostra antes da extração de ácido nucleico.
- O IC pode ser adicionado tanto diretamente ao tampão de lise ou à mistura da amostra e do tampão de lise.

C. Kits de Extração Manual de Ácido Nucleico

Observação: Utilizar os volumes de amostra e a eluição recomendados conforme indicado abaixo. Para as demais questões, consultar o protocolo do fabricante.

Kit de Extração	Fabricante	Cat. Nº	Vol. Recomendado
QIAamp® DSP Virus Spin Kit	QIAGEN	61704	Amostra: 190 µL Eluição: 40 µL
Ribo_spin vRD (Kit de Extração Viral de RNA/DNA)	GeneAll	302-150 SG1701*	Amostra: 290 µL Eluição: 40 µL

*Usar os números de catálogo mostrados acima para adquirir produtos da Seegene Inc.

D. Sistema Automatizado de Extração de Ácido Nucleico

Observação: Utilizar a amostra recomendada e os volumes de eluição conforme indicados abaixo. Para todas as demais, consultar o protocolo do fabricante.

D-1. NucliSENS® easyMAG®

- Proceder ao processo de extração com uso de '**generic protocol**'.

Sistema de Extração Automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. Recomendado
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL

D-2. SGprep32

- Proceder ao processo de extração com uso de '**Uni-Protocol A**'.

Sistema de Extração Automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. Recomendado
SGprep32	hanwoolTPC	SGprep32-180701*	-
STARMag 96 UniPlate	Seegene	EX00003P	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL
STARMag 96 UniTube	Seegene	EX00004T	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL

*Usar os números de catálogo mostrados acima para adquirir produtos da Seegene Inc.

D-3. SEEPREP32

- Proceder ao processo de extração com uso de '**Pro-Protocol A**'.

Sistema de Extração Automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. Recomendado
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Tipo de Placa)	Seegene	EX00009P	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL
STARMag 96 ProPrep (Tipo de Tubo)	Seegene	EX00009T	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL
STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)*	Seegene	EX00017P	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL
STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)*	Seegene	EX00017T	Amostra: 200 µL Eluição: 100 µL

* O aspirado nasofaríngeo, o lavado broncoalveolar e a expetoração não foram validados com o STARMag 96 ProPrep C.

D-4. KingFisher™ Flex Purification System, KingFisher with 96 Deep-well Head

Observação: Consulte o manual de instruções do **KingFisher Flex**.

Sistema de extração automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. recomendado
KingFisher™ Flex Purification System, KingFisher with 96 Deep-well Head	Thermo Fisher Scientific	5400630	-
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	A42352	Amostra: 200µL Eluição: 80µL

O lavado broncoalveolar não foi validado com KingFisher Flex.

D-5. MagNA Pure 96

Observação: Consulte o manual de instruções do **MagNA Pure 96**.

Sistema de extração automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. recomendado
MagNA Pure 96	Roche Diagnostics	06541089001	-
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Roche Diagnostics	06543588001	Amostra: 200µL Eluição: 100µL

O lavado broncoalveolar não foi validado com MagNA Pure 96.

D-6. Maelstrom™ 9600

- Execute o processo de extração utilizando o protocolo '**665-Rapid**'

Sistema de extração automatizada	Fabricante	Cat. Nº	Vol. recomendado
Maelstrom™ 9600	Taiwan Advanced Nanotech Inc.	M9600	-
TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Auto Tube	Taiwan Advanced Nanotech Inc.	W665S66	Amostra: 300 µL Eluição: 80 µL
TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Auto Plate	Taiwan Advanced Nanotech Inc.	W665A46	Amostra: 300 µL Eluição: 80 µL
TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Bulk Plate	Taiwan Advanced Nanotech Inc.	W665A10	Amostra: 300 µL Eluição: 80 µL

O lavado broncoalveolar e o aspirado nasofaríngeo não foram validados com Maelstrom™ 9600.

2-2. Método sem extração

Observação: O RP-V IC 2 deve ser adicionado à mistura inicial para PCR. Ver *Preparação para RT-PCR de etapa única em tempo real* (página 15) para mais informações.

- 1) Coloque alíquotas de 45 µL de água livre de nuclease nos tubos de PCR
- 2) Adicione 15 µL de cada amostra no tubo contendo a alíquota da água livre de nuclease
- 3) Feche a tampa, agite em vórtice rapidamente e centrifugue brevemente
- 4) Incube a 98 °C por 3 min*
- 5) Arrefeça até 4 °C por 5 min*

*Observação: É recomendada a realização dos passos 4) a 5) em instrumento de PCR com as tampas individuais de tubo PCR

Observação: Se necessitar de fazer novamente o ensaio, comece com a amostra inicial e não o lisado.

3. Preparação para RT-PCR Monofásica em Tempo Real

Observação: Os tubos e tampas corretos devem ser usados (vide MATERIAIS EXIGIDOS MAS NÃO FORNECIDOS).

Observação: As pontas de filtro resistentes ao aerossol e luvas apertadas devem ser usadas quando se preparam as reações monofásicas de RT-PCR. Ter cuidado extremo para evitar a contaminação cruzada.

Observação: Descongelar completamente todos os reagentes congelados.

Observação: Centrifugar rapidamente os tubos de reagentes para coletar gotículas residuais da parte interna da tampa.

A. Preparar o Mastermix de Reação.

A-1 Extração padrão

5 µL	SARS2 MOM
5 µL	EM8
5 µL	RNase-free Water
15 µL	Volume Total do Mastermix

A-2 Método sem extração

5 µL	SARS2 MOM
5 µL	EM8
4 µL	RNase-free Water
1 µL	RP-V IC 2
15 µL	Volume total da mistura inicial

Observação: Calcular a quantidade total de cada reagente necessário com base no número de reações junto com as amostras e os controles.

B. Misturar por meio de vórtice rápido e centrifugar rapidamente.

C. Dividir em alíquotas µL do Mastermix de Reação nos tubos de PCR.

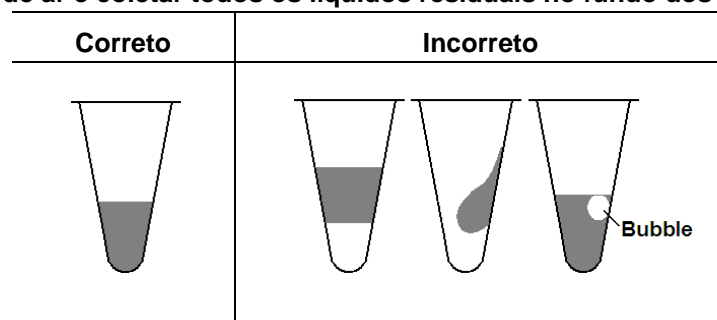
D. Adicionar 5 µL dos ácidos nucleicos de cada amostra no tubo que contenha o Mastermix de Reação.

15 µL	Mastermix de Reação
5 µL	Ácido nucleico da amostra
20 µL	Volume total de reação

E. Fechar a tampa e centrifugar brevemente os tubos de PCR.

F. Verificar se o líquido que contém todos os componentes de PCR está na parte inferior de cada tubo de PCR. Caso negativo, centrifugar novamente a uma rotação mais elevada e durante mais tempo.

Observação: Recomenda-se centrifugar os tubos de PCR antes de processar a PCR para eliminar bolhas de ar e coletar todos os líquidos residuais no fundo dos tubos.



Observação: Usar ponta de pipeta estéril nova para cada amostra.

Observação: Para **Controlo Negativo (NC)**, usar 5 µL de “RNase-free Water” em vez do ácido nucleico da amostra.

Observação: Para **Controlo Positivo (PC)**, usar 5 µL de “SARS2 PC” em vez do ácido nucleico da amostra.

Observação: Ter cuidado para não causar contaminação cruzada no Mastermix PCR e nas amostras com Controlo Positivo.

Observação: Não rotular o tubo de reação em cima de sua tampa. A fluorescência é detetada a partir da parte superior de cada tubo de reação.

CONFIGURAÇÃO DO INSTRUMENTO DE PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE RESULTADOS

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Configuração do Instrumento de PCR em Tempo Real

Observação: A configuração do experimento do CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) pode ser dividida em três passos: Protocol Setup (Configuração do Protocolo), Plate Setup (Configuração da Placa) e Start run (Iniciar execução).

A. Protocol Setup (Configuração do Protocolo)

1) No menu principal, selecionar “File” (Ficheiro) →, “New” (Novo) → “Protocol” (Protocolo) para abrir o “Protocol Editor” (Editor de Protocolo).

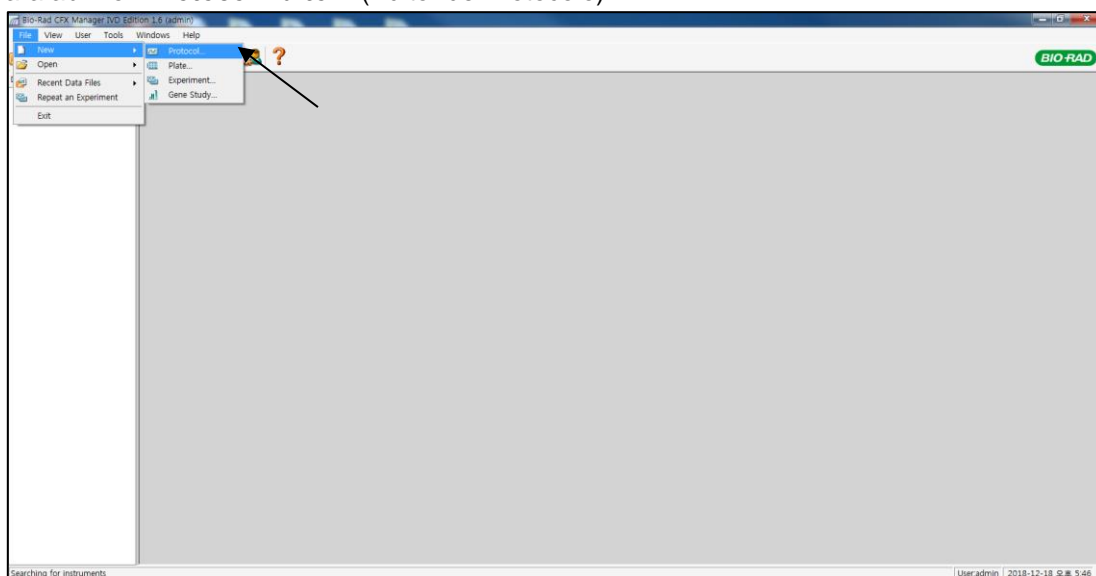


Fig. 1. Protocol Setup (Configuração do Protocolo)

2) Em “**Protocol Editor**” (Editor de Protocolo), defina o perfil térmico conforme a seguir:

Passo	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 seg
4*		60°C	15 seg
5*		72°C	10 seg

Observação*: Leitura da placa na Etapa 4 e 5. A fluorescência é detetada a 60°C e a 72°C.

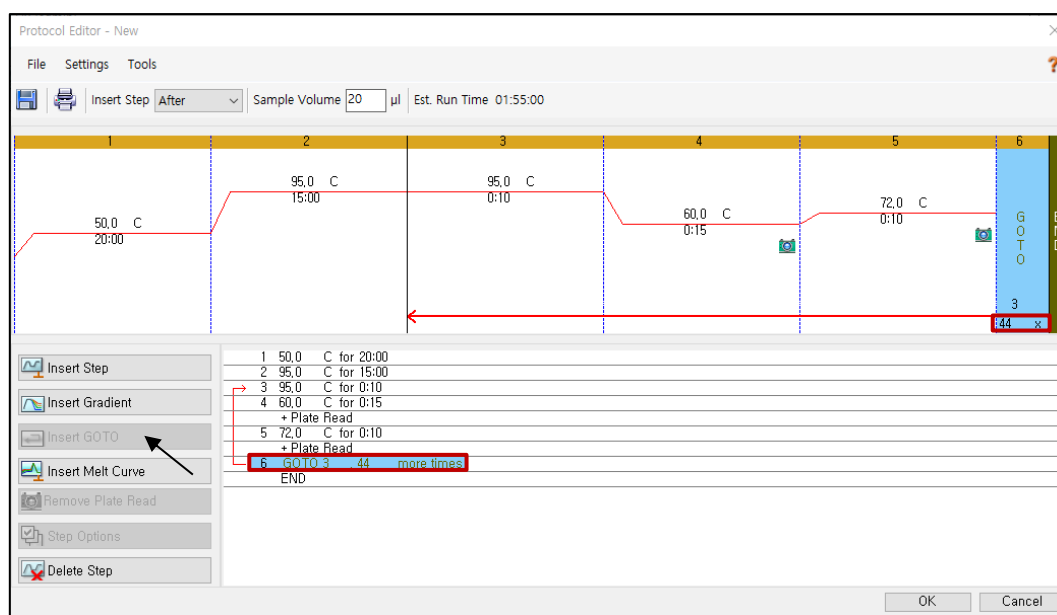


Fig. 2. Protocol Editor (Editor de Protocolo)

Observação: Clique em “**Insert GOTO (Inserir GOTO)**” e digite “**GOTO 3, 44 more times (GOTO Etapa 3, mais 44 vezes)**” na Etapa 6.

3) Clicar na caixa próxima ao “**Sample Volume**” (Volume de Amostra) para inserir 20 µL diretamente.

- 4) Clicar em **“OK”** e guardar o protocolo para abrir a janela **“Experiment Setup”** (Configuração de Experimento).

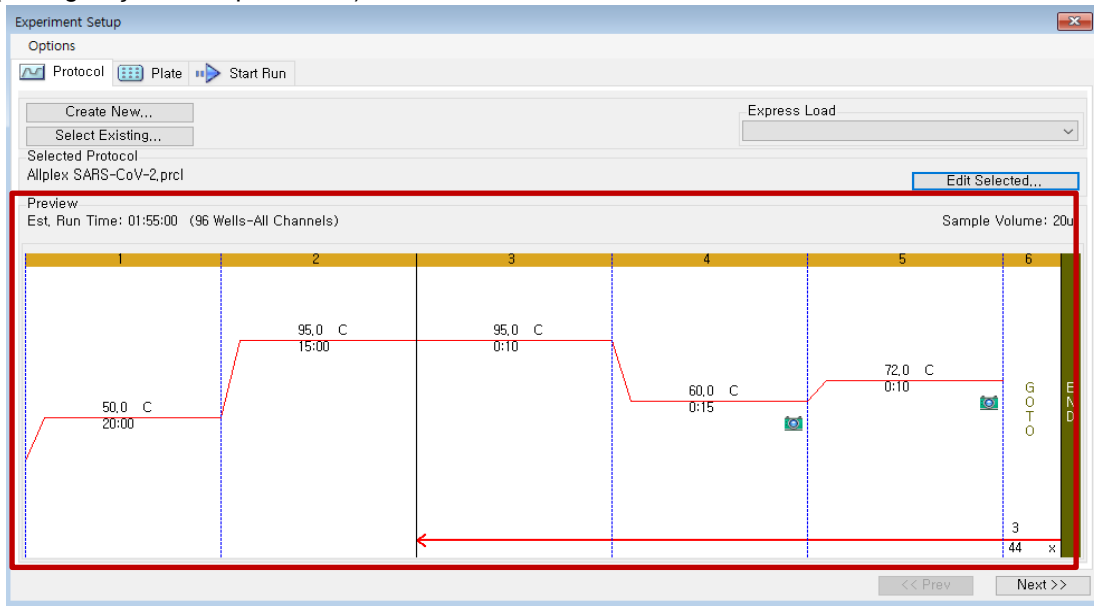


Fig. 3. Experiment Setup: Protocol (Configuração do Experimento: Protocolo)

B. Plate Setup (Configuração da Placa)

- 1) A partir da aba **“Plate”** (Placa) em **“Experiment Setup”** (Configuração de Experimento), clicar em **“Create New”** (Criar Novo) para abrir a janela **“Plate Editor”** (Editor de Placa).

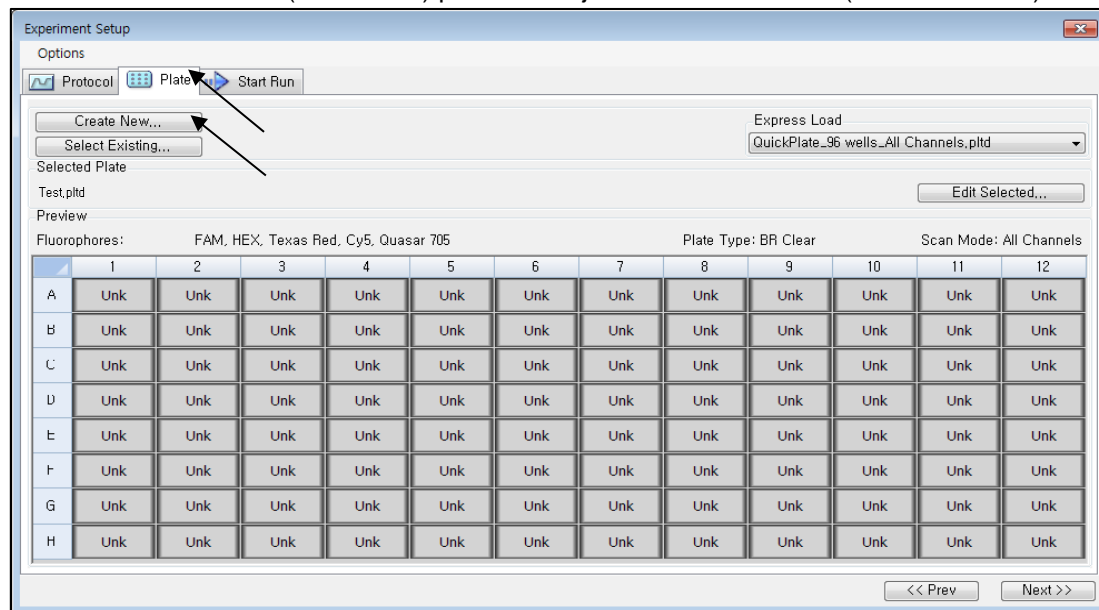


Fig. 4. Plate Editor (Editor de Placa)

2) Clicar em **“Select Fluorophores”** (Selecionar Fluoróforos) para indicar os fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670**) que serão usados e, em seguida, em **“OK”**.

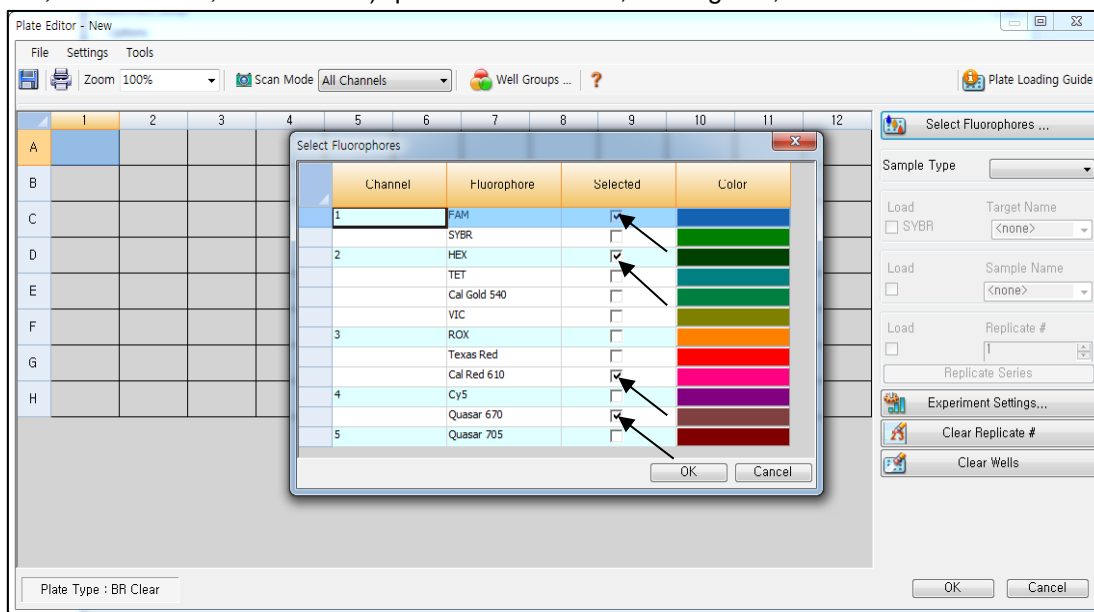


Fig. 5. Select Fluorophores (Selecionar Fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610, e Quasar 670)

3) Selecionar os poços em que o tubo de PCR será colocado e selecionar seus tipos de amostras no menu de seleção em **“Sample Type”** (Tipo de Amostra).

- **Desconhecido: Amostras clínicas**
- **Controlo Negativo**
- **Controlo Positivo**

4) Clicar nas caixas de seleção apropriadas (**FAM, HEX, Cal Red 610, e Quasar 670**) para especificar os fluoróforos a serem detetados nos poços selecionados.

5) Inserir **“Sample Name”** (Nome de Amostra) e pressionar a tecla enter.

- 6) Em “Settings” (Configurações) do menu principal do “Plate Editor” (Editor de Placa), escolher “Plate Size” (96 wells) (Tamanho de placa (96 poços)) e “Plate Type” (BR White) (Tipo de placa (BR branca)).

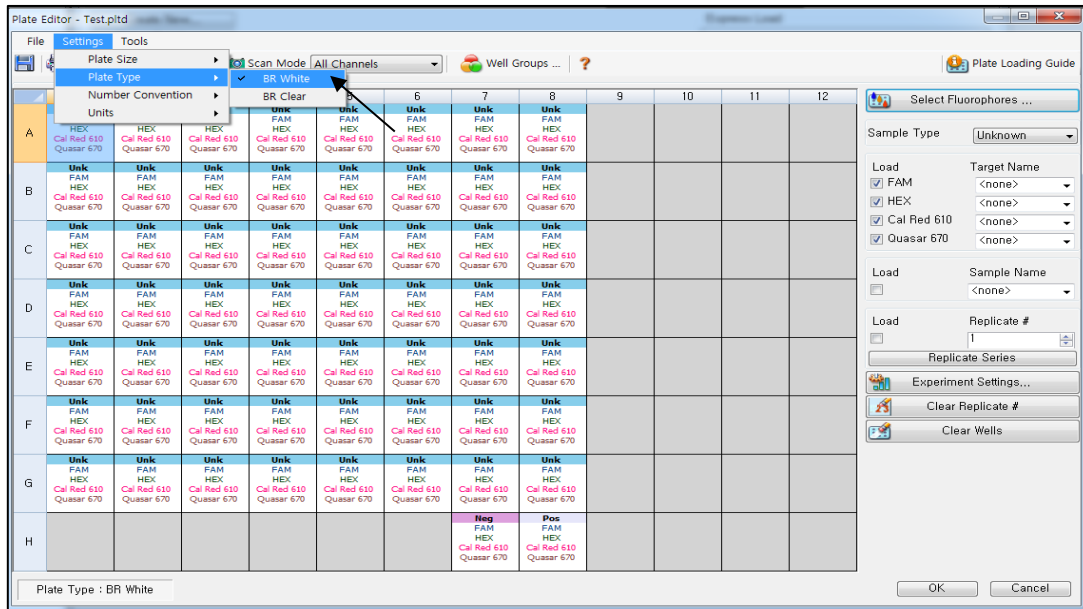


Fig. 6. Plate Setup (Configuração da Placa)

- 7) Clicar em “OK” para salvar a nova placa.
- 8) Tu retornarás à janela “Experiment Setup” (Configuração de Experimento).

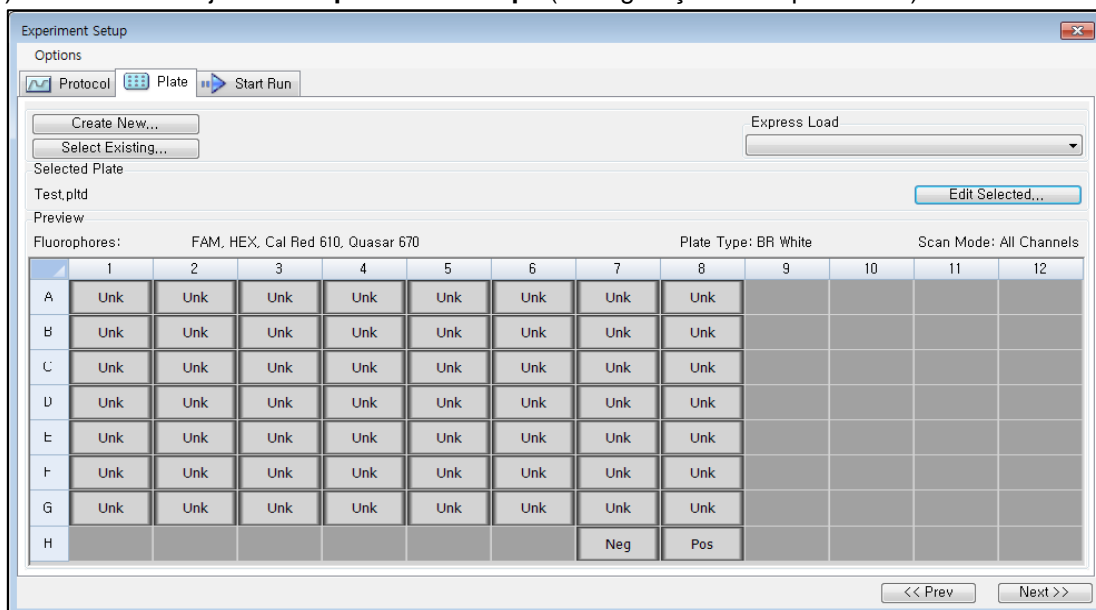


Fig. 7. Experiment Setup: Plate (Configuração do Experimento: Plate)

- 9) Clicar em “Next” (Próximo) para Iniciar Execução.

C. Start Run (Iniciar Execução)

1) A partir da aba **“Start Run”** (Iniciar Execução) em **“Experiment Setup”** (Configuração de Experimento), clicar em **“Close Lid”** (Fechar Tampa) para fechar a tampa do instrumento.

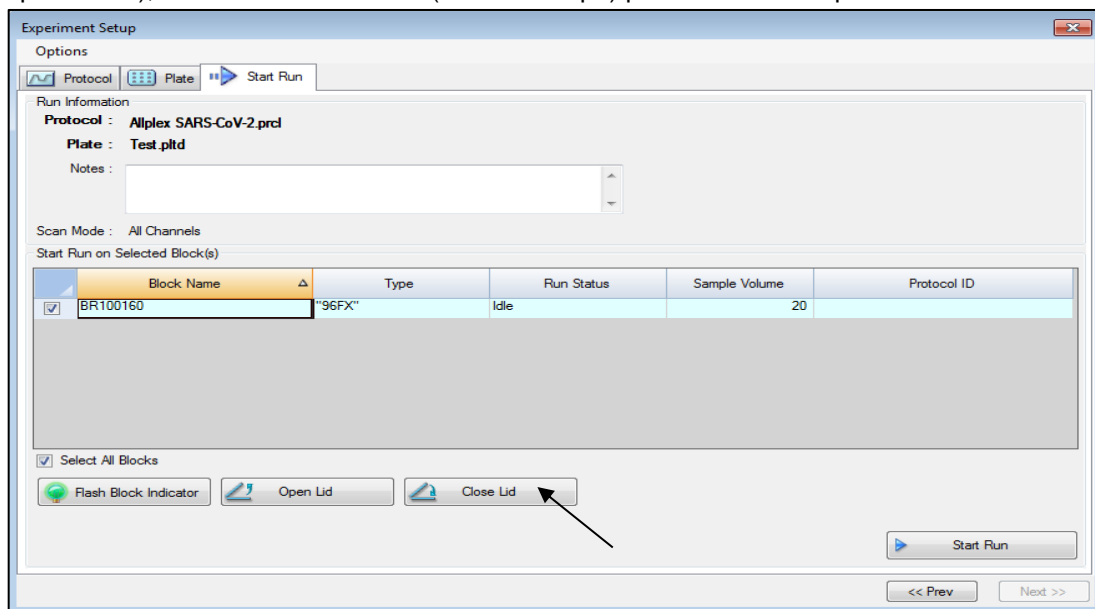


Fig. 8. **Close Lid (Fechar Tampa)**

2) Clicar em **“Start Run”** (Iniciar Execução) .
 3) Armazenar o ficheiro de execução em Meus Documentos ou em uma pasta designada. Introduzir o nome do ficheiro, clicar em **”SAVE”** (Guardar), e a execução iniciará.

1.2. Análise de Dados

A. Criar pastas para exportação de dados

1) Para guardar dados de todas as etapas de deteção da curva de amplificação a partir do ficheiro de resultados, crie uma pasta.
 2) O nome da pasta deve ser conforme o desejo do usuário (Para função ‘Seegene Export’, as Pastas “QuantStep4” e “QuantStep5” são criadas automaticamente para salvar cada dado da curva de amplificação na pasta criada pelo usuário).

B. Pré-configurações para Análise de Dados em CFX96™

1) Após o teste, clicar na aba **“Quantitation”** (Quantificação) para ver os resultados da curva de amplificação.

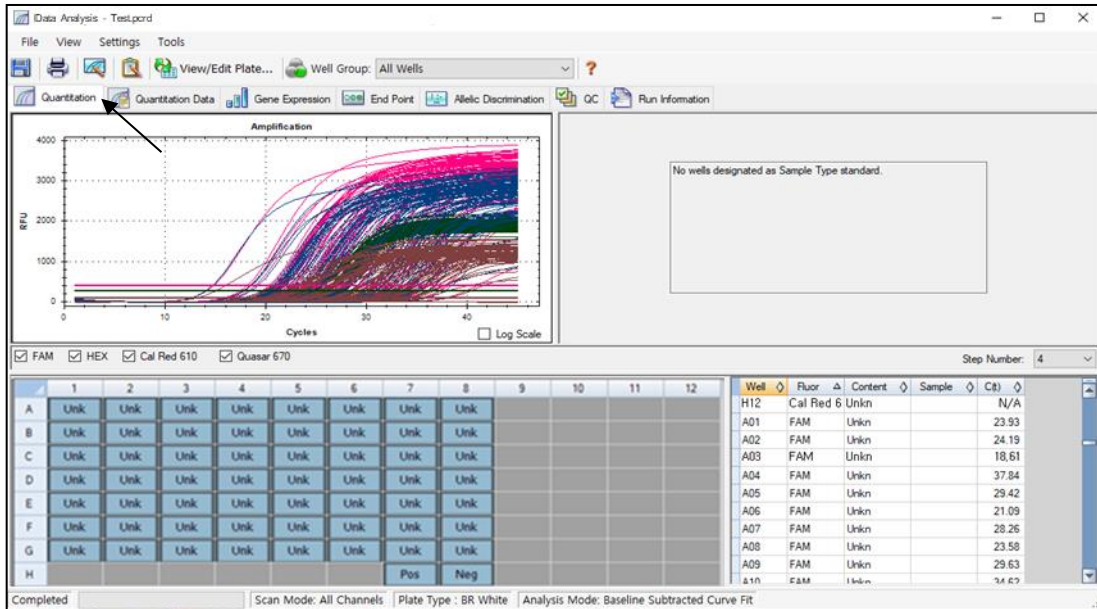


Fig. 9. Resultados da curva de amplificação

2) Selecionar **“No Baseline Subtraction”** (Sem Subtração de Linha de Base) no Modo de Análise do menu de Configurações.

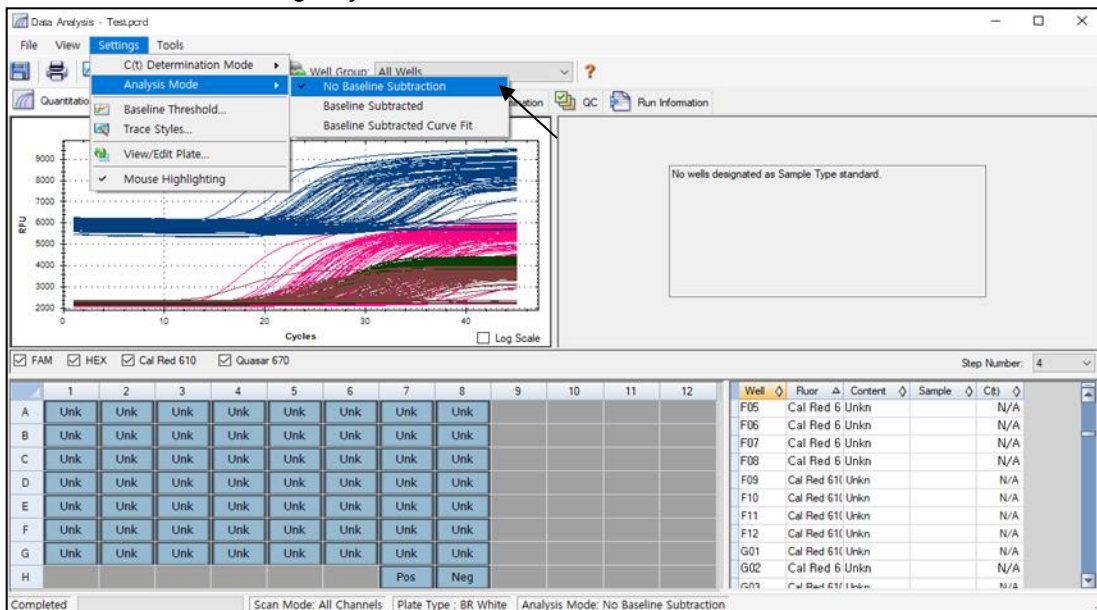


Fig. 10. No Baseline Subtraction (Sem Subtração de Linha de Base)

3) Selecionar **“Seegene Export”** (Exportação da Seegene) a partir do menu Tools (Ferramentas).

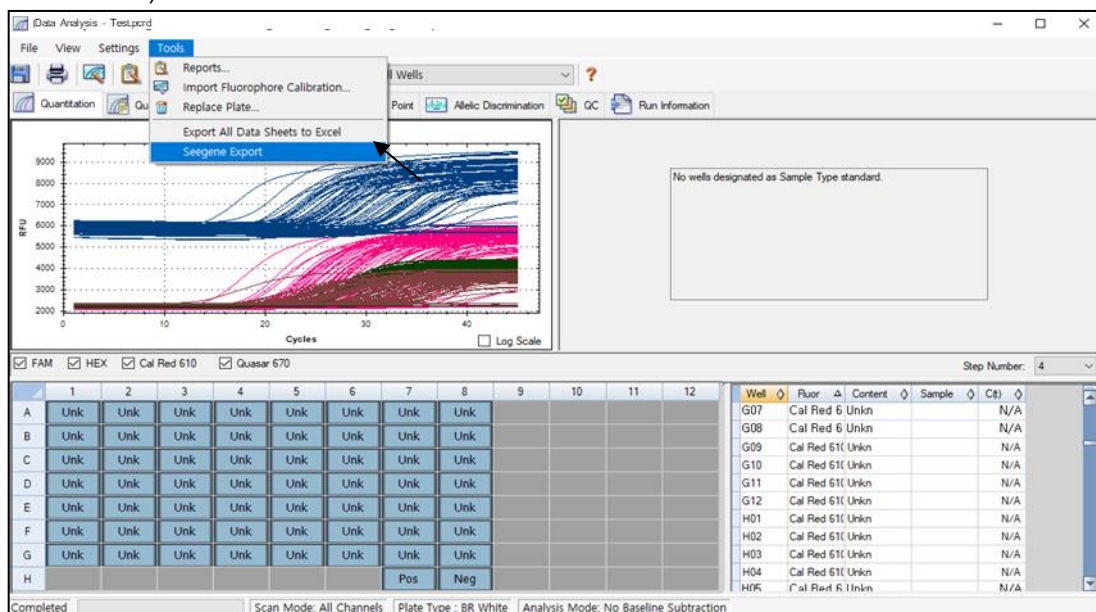


Fig. 11. Seegene Export (Exportação da Seegene)

4) Escolher um local para guardar os dados e clicar em **“OK”**.

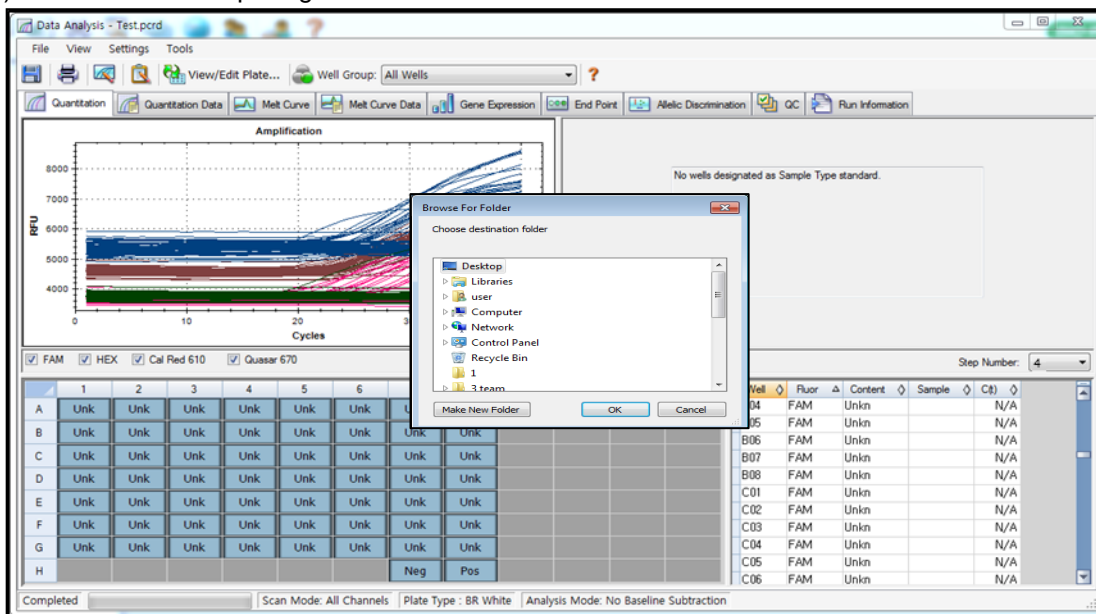


Fig. 12. Exportação da Seegene para a pasta designada

C. Configurações para Análise de Dados no Seegene Viewer

1) Abrir o programa Seegene Viewer e clicar em “**Option**” (Opções) para selecionar **CFX96** ou **CFX96 Dx** no “**Instrument**” (Instrumento).

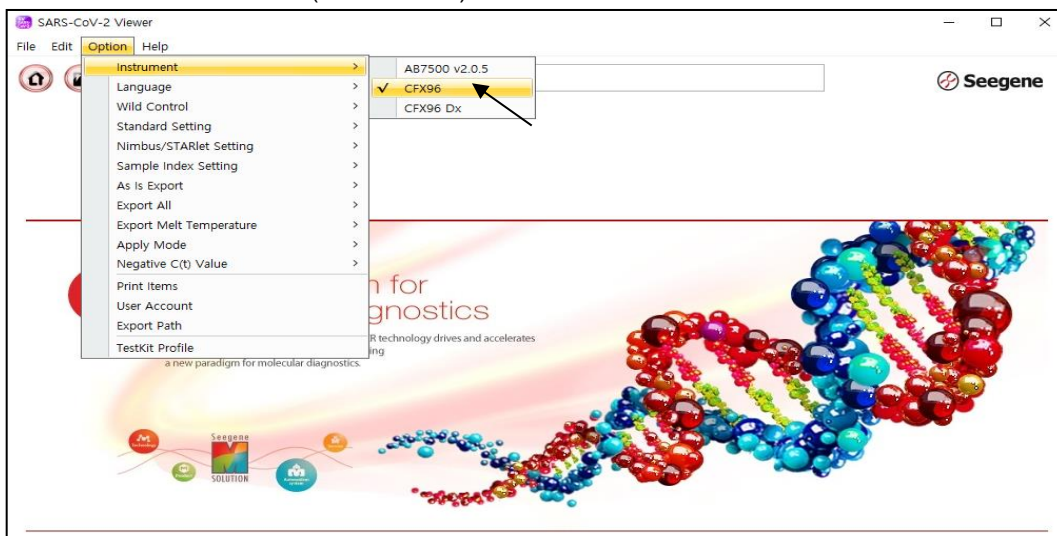


Fig. 13. Seegene Viewer

2) Clicar em “**Open**” (Abrir) para encontrar o ficheiro guardado na pasta “QuantStep4”, abrir o ficheiro de resultados e selecionar o kit de teste no menu “**PRODUCT**” (PRODUTOS).

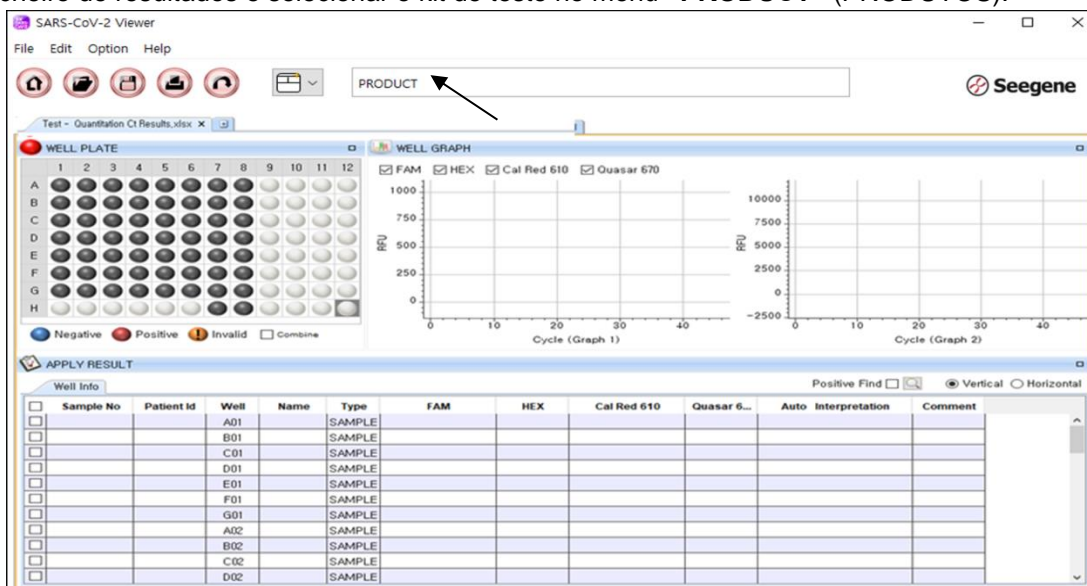
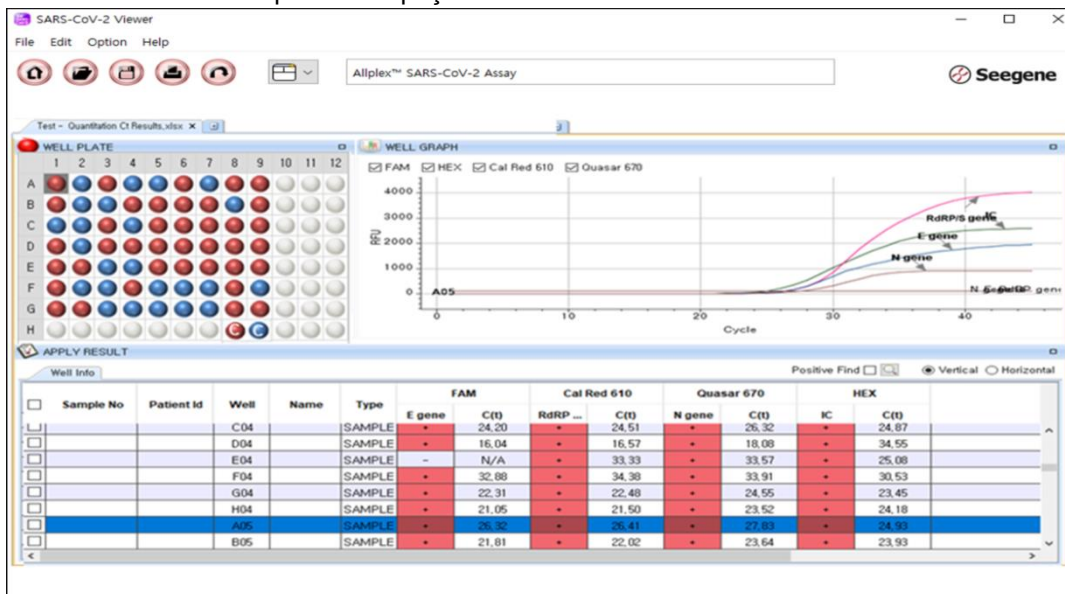


Fig. 14. Configurações para Análise de Dados no Seegene Viewer

Observação: Caso se aplique o método sem extração, selecione “Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (extraction-free method)” no menu do PRODUTO.

3) Verificar os resultados para cada poço.

Fig. 15. Resultado de teste no Seegene Viewer
4) Critérios de Validade dos Resultados do Controle
a. Execução de Ensaio Válido

Para confirmar a validade dos experimentos, os ensaios de PCR devem ser acompanhados de PC (Positive Control) e NC (Negative Control). A execução do ensaio é determinada como válida quando todos os critérios a seguir são atendidos:

1) Extração padrão

Controlo	Resultado do Seegene Viewer					Auto interpretação
	FAM (C _t)	Cal Red 610 (C _t)	Quasar670 (C _t)	HEX (C _t)	E gene	
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC		
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40		Controlo Positivo (+)
Controlo Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A		Controlo Negativo(-)

2) Método sem extração

Controlo	Resultado do Seegene Viewer					Auto interpretação
	FAM (C _t)	Cal Red 610 (C _t)	Quasar670 (C _t)	HEX (C _t)	E gene	
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC		
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40		Controlo Positivo (+)
Controlo Negativo	N/A	N/A	N/A	≤ 40		Controlo Negativo (-)

b. Execução de Ensaio Inválido

Nos casos de falha de validade, os resultados não devem ser interpretados ou relatados. E a reação de PCR deve ser repetida.

2. CFX96™ Dx System (CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1 Configuração do Instrumento de PCR em Tempo Real

Observação: A configuração do CFX96™ Dx System (Bio-Rad) pode ser dividido em três passos: Protocol Setup (Configuração do Protocolo), Plate Setup (Configuração da Placa) e Start run (Iniciar execução).

A. Configuração do Protocolo

1) No menu principal, selecionar **“File”** (Ficheiro) → **“New”** (Novo) → **“Protocol”** (Protocolo) para abrir o **“Protocol Editor”** (Editor de Protocolo).

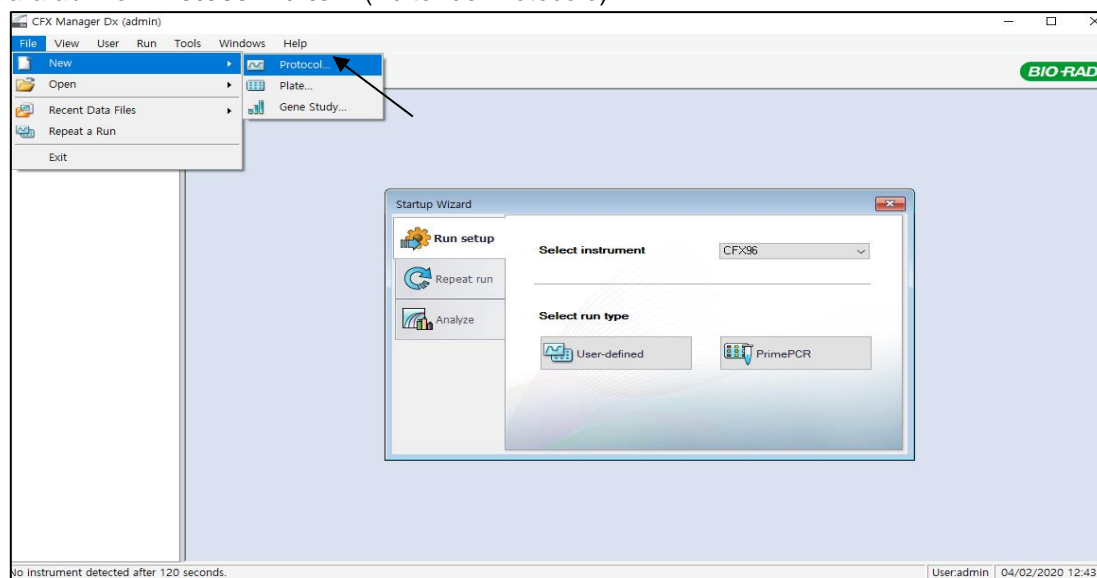


Fig. 16. Protocol Setup (Configuração do Protocolo)

2) Em “**Protocol Editor**” (Editor de Protocolo), defina o perfil térmico conforme a seguir:

Passo	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 seg
4*		60°C	15 seg
5*		72°C	10 seg

Observação*: Leitura da placa na Etapa 4 e 5. A fluorescência é detetada a 60°C e a 72°C.

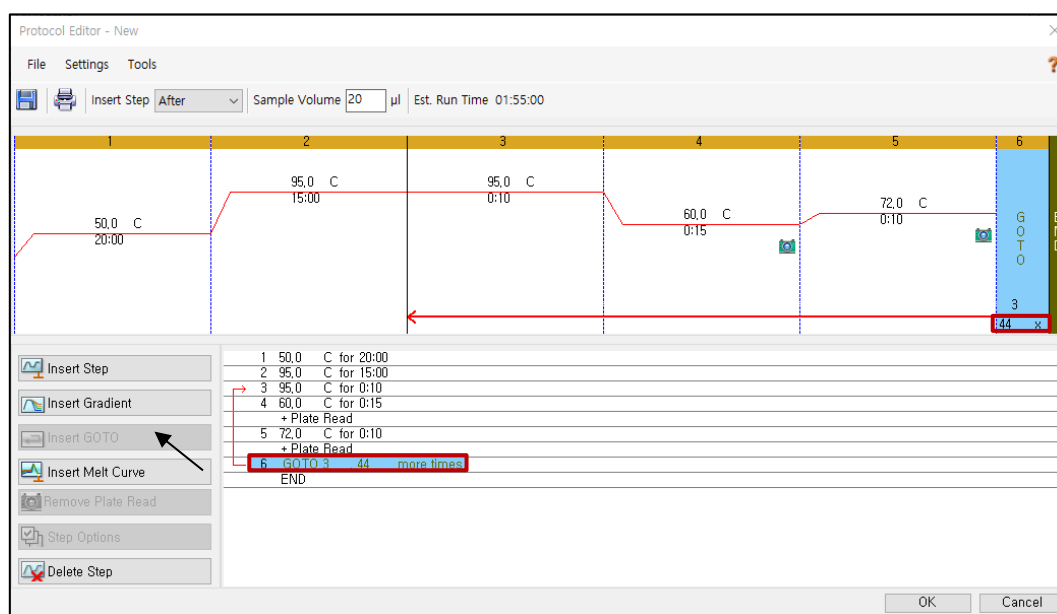


Fig. 17. Protocol Editor (Editor de Protocolo)

Observação: Clique em “**Insert GOTO (Inserir GOTO)**” e digite “**GOTO 3, 44 more times (GOTO Etapa 3, mais 44 vezes)**” na Etapa 6.

3) Clicar na caixa próxima ao “**Sample Volume**” (Volume de Amostra) para inserir 20 µL diretamente.

4) Clicar em “OK” e guardar o protocolo para abrir a janela “Run Setup” (Configuração de Execução).

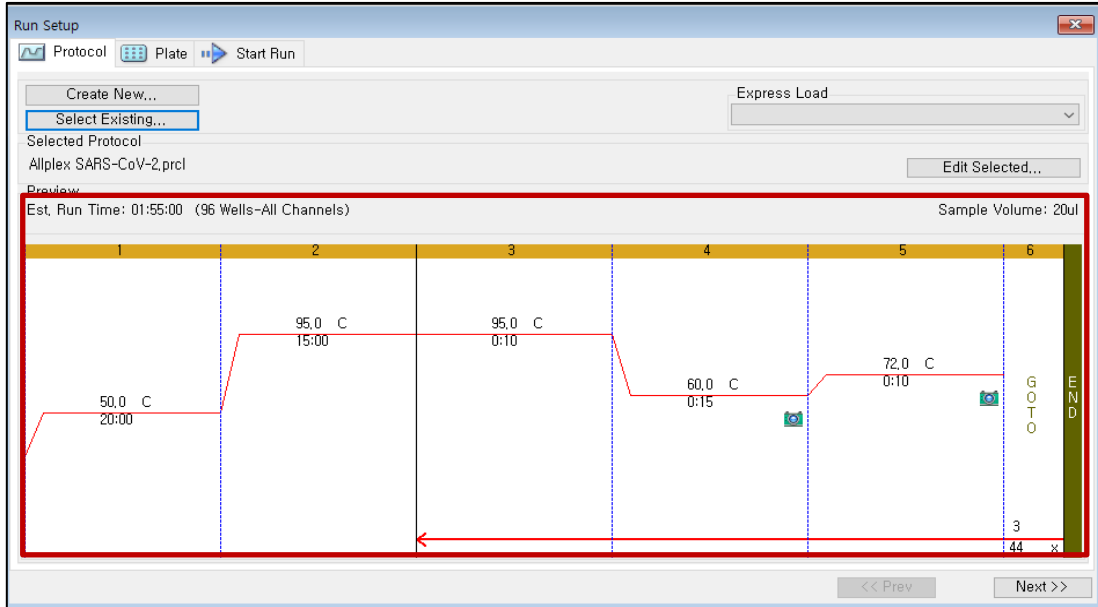


Fig. 18. Run Setup: Protocol (Configuração de Execução)

B. Configuração da Placa

1) A partir da aba da “Plate” (Placa) em “Run Setup” (Configuração de Execução), clicar em “Create New” (Criar Novo) para abrir a janela “Plate Editor” (Editor de Placa).

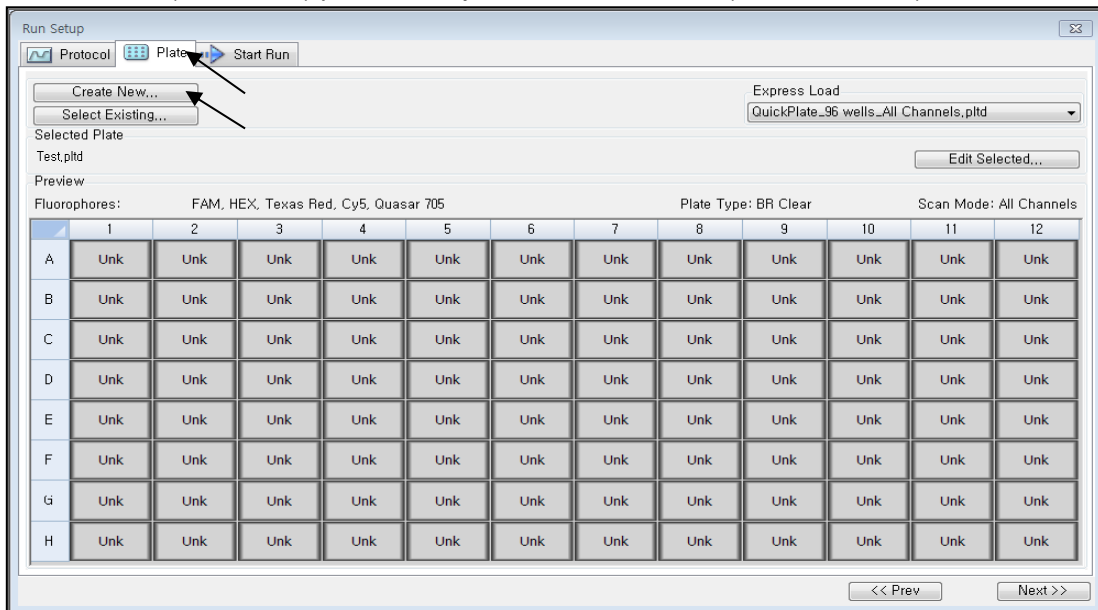


Fig. 19. Plate Editor (Editor de Placa)

2) Clicar em **“Select Fluorophores”** (Selecionar Fluoróforos) para indicar os fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670**) que serão usados e, em seguida, em **“OK”**.

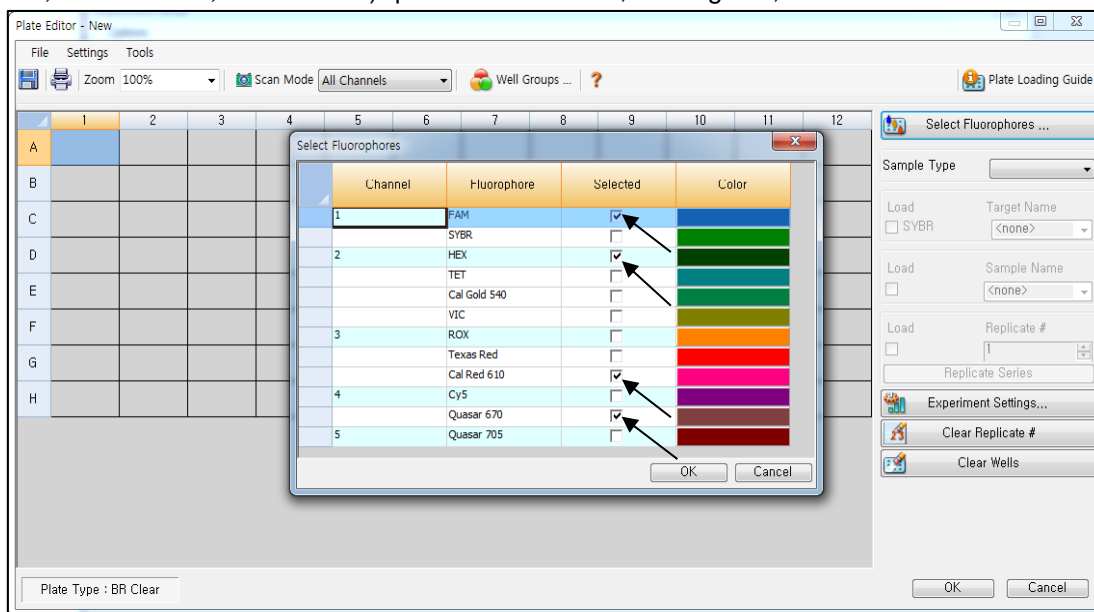


Fig. 20. **“Select Fluorophores”** (**FAM, HEX, Cal Red 610, e Quasar 670**)

3) Selecionar os poços em que o tubo de PCR será colocado e selecionar seus tipos de amostras no menu de seleção em **“Sample Type”** (Tipo de Amostra).

- **Desconhecido:** Amostras clínicas
- **Controlo Negativo**
- **Controlo Positivo**

4) Clicar nas caixas de seleção apropriadas (**FAM, HEX, Cal Red 610, e Quasar 670**) para especificar os fluoróforos a serem detetados nos poços selecionados.

5) Inserir **“Sample Name”** (Nome de Amostra) e pressionar a tecla enter.

- 6) Em **“Settings”** (Configurações) do menu principal do **“Plate Editor”** (Editor de Placa), escolher **“Plate Size” (96 wells)** (Tamanho de placa (96 poços)) e **“Plate Type” (BR White)** (Tipo de placa (BR branca)).

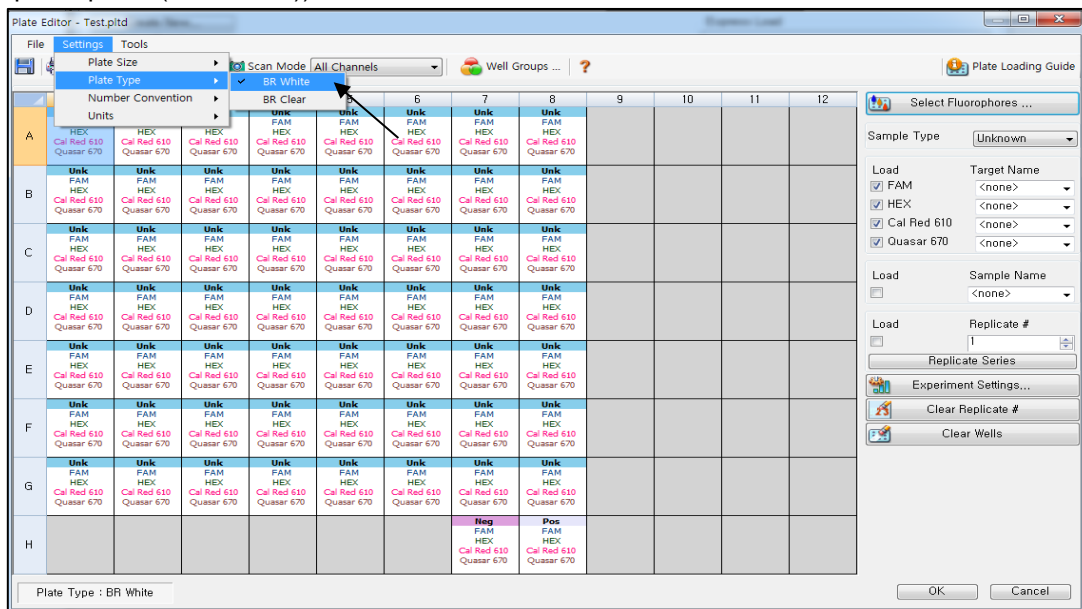


Fig. 21. Plate Setup (Configuração da Placa)

- 7) Clicar em **“OK”** para salvar a nova placa.
 8) Tu retornarás à janela **“Run Setup”** (Configuração de Execução).

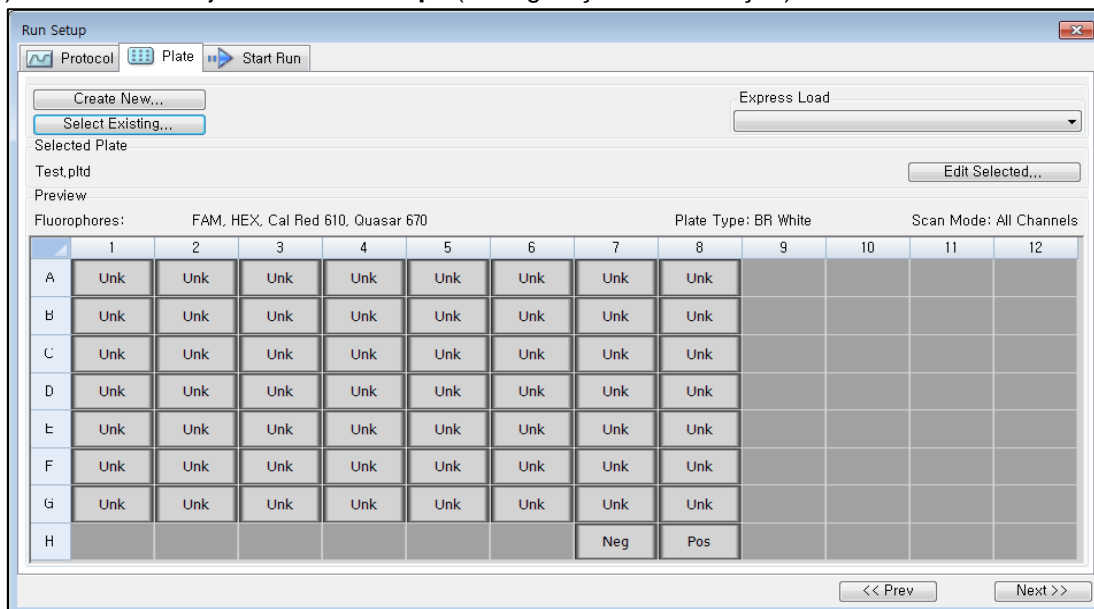


Fig. 22. Run Setup: Plate (Configuração de Execução: Placa)

- 9) Clicar em **“Next”** (Próximo) para Iniciar Execução.

C. Start Run (Iniciar Execução)

1) A partir da aba “**Start Run**” (Iniciar Execução) em “**Run Setup**” (Configuração de Execução), clicar em “**Close Lid**” (Fechar Tampa) para fechar a tampa do instrumento.

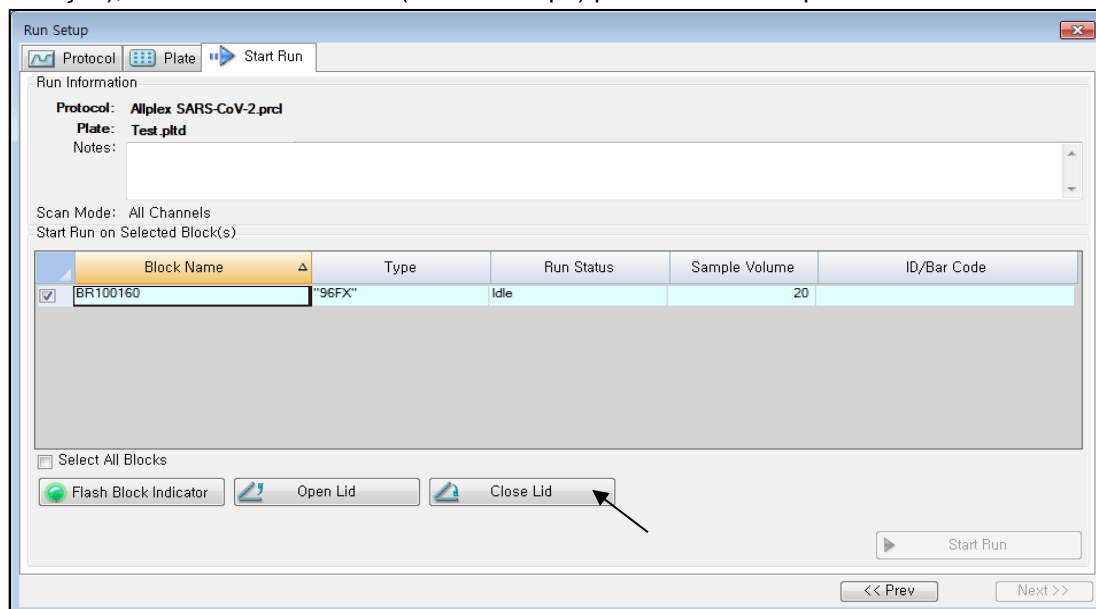


Fig. 23. **Close Lid (Fechar Tampa)**

2) Clicar em “**Start Run**” (Iniciar Execução) .
 3) Armazenar o ficheiro de execução em Meus Documentos ou em uma pasta designada. Introduzir o nome do ficheiro, clicar em ”**SAVE**” (Guardar), e a execução iniciará.

2.2. Análise de Dados

A. Criar pastas para exportação de dados

1) Para guardar dados de todas as etapas de deteção da curva de amplificação a partir do ficheiro de resultados, crie uma pasta.
 2) O nome da pasta deve ser conforme o desejo do usuário (Para função ‘Seegene Export’, as Pastas “QuantStep4” e “QuantStep5” são criadas automaticamente para salvar cada dado da curva de amplificação na pasta criada pelo usuário).

B. Pré-configurações para Análise de Dados em CFX96™

1) Após o teste, clicar na aba **“Quantitation”** (Quantificação) para ver os resultados da curva de amplificação.

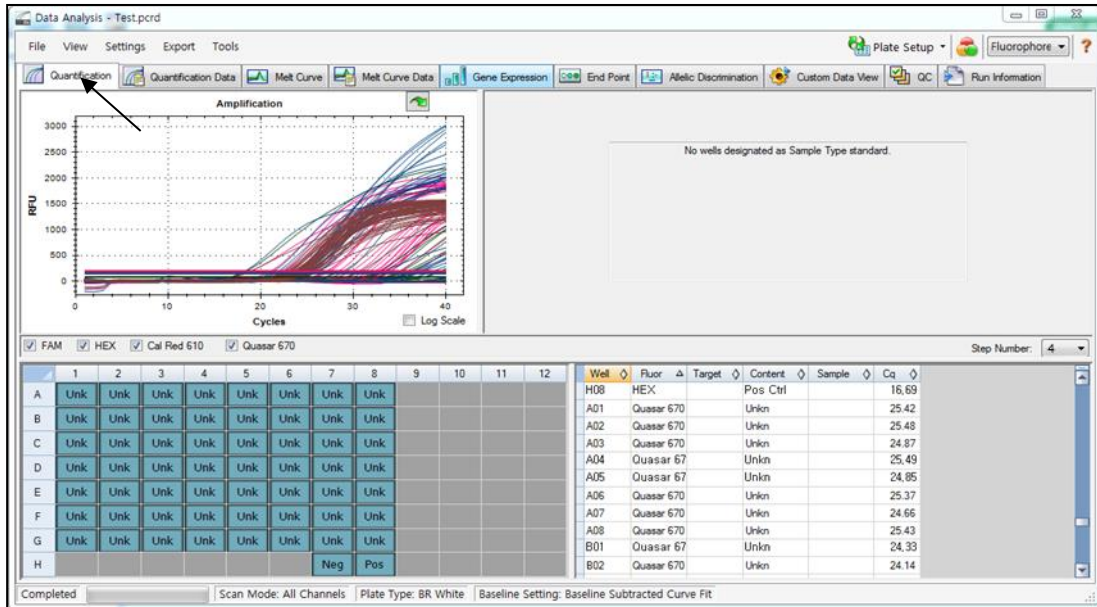


Fig. 24. Amplification curve results (Resultados da curva de amplificação)

2) Selecionar **“No Baseline Subtraction”** (Sem Subtração de Linha de Base) a partir de Baseline Setting no menu Settings.

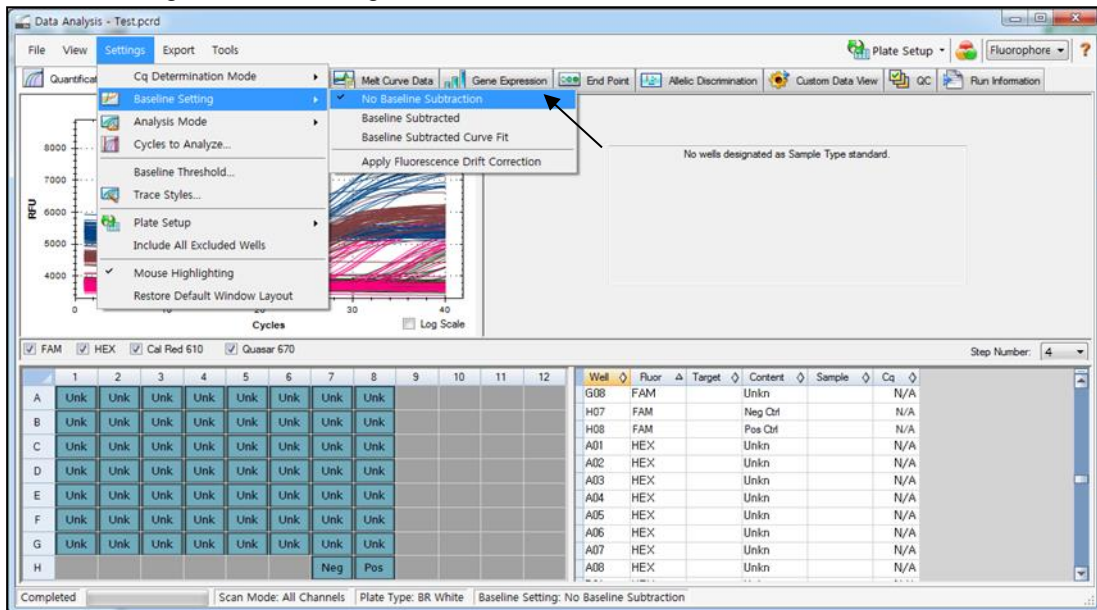


Fig. 25. No Baseline Subtraction (Sem Subtração de Linha de Base)

3) Selecionar **“Seegene Export”** (Exportação da Seegene) a partir do menu Export.

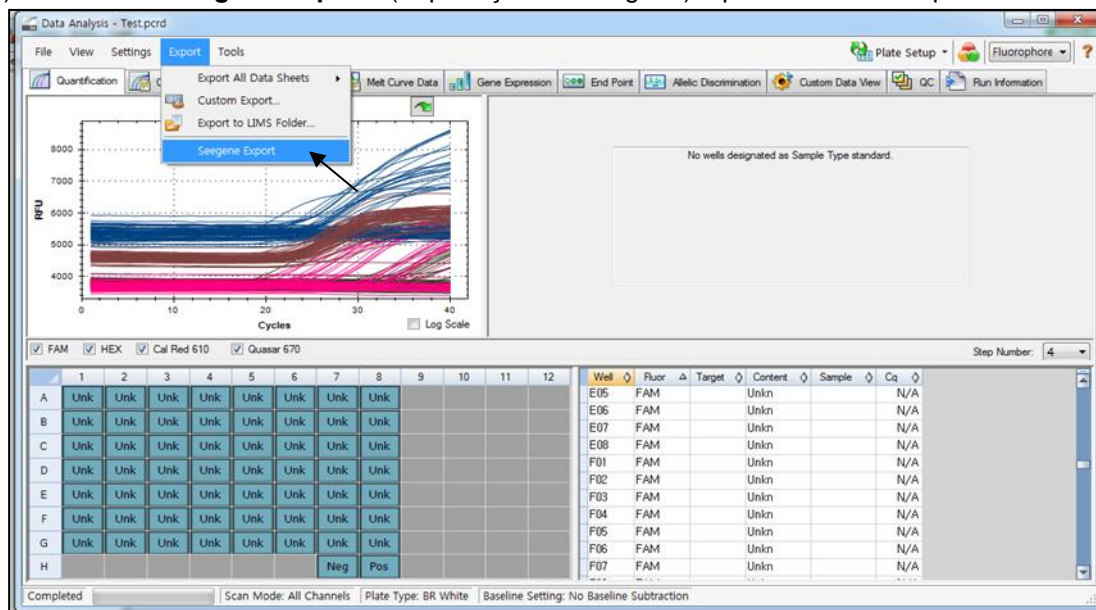


Fig. 26. **“Seegene Export”** (Exportação da Seegene)

4) Escolher um local para guardar os dados e clicar em **“OK”**.

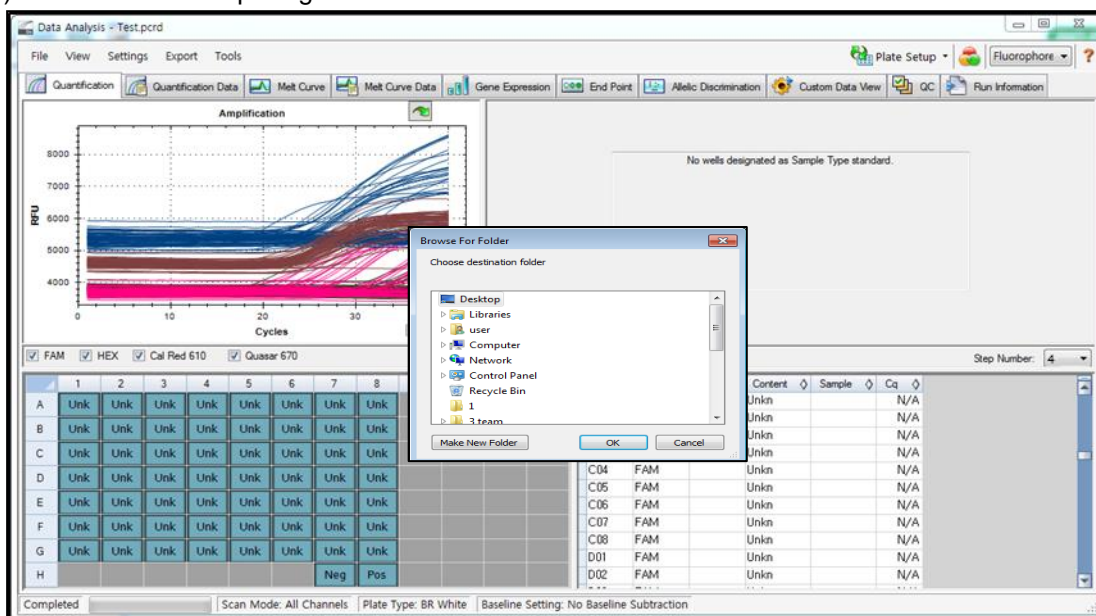


Fig. 27. **Exportação da Seegene para a pasta designada**

C. Configurações para Análise de Dados no Seegene Viewer

1) Abrir o programa Seegene Viewer e clicar em “**Option**” (Opções) para seleccionar **CFX96** ou **CFX96 Dx** em “**Instrument**” (Instrumento).

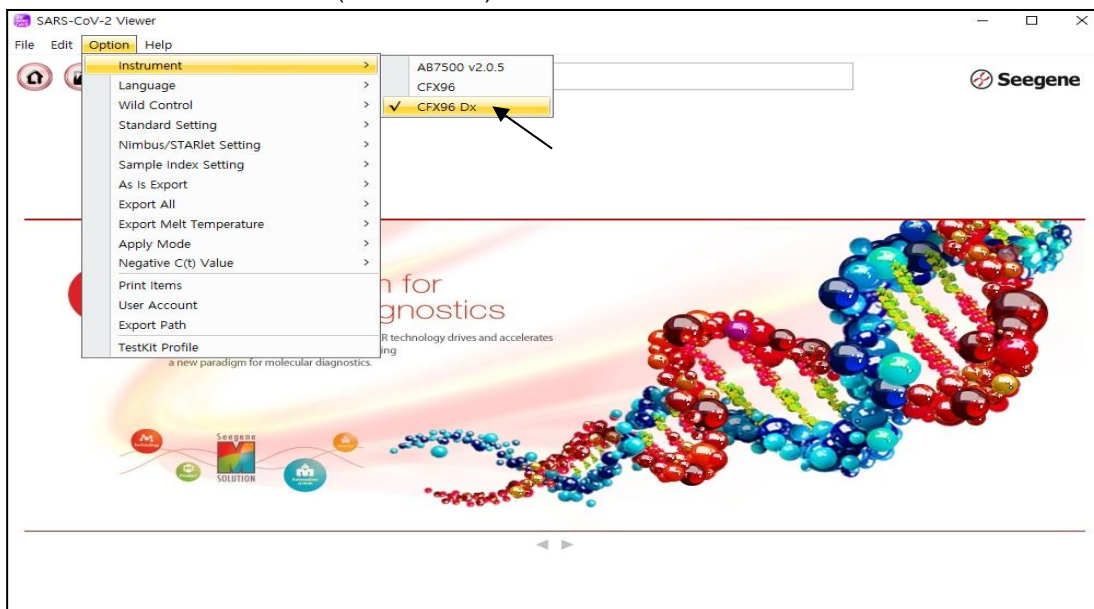


Fig. 28. Seegene Viewer

2) Clicar em “**Open**” (Abrir) para encontrar o ficheiro guardado na pasta “QuantStep4”, abrir o ficheiro de resultados e seleccionar o kit de teste no menu “**PRODUCT**” (PRODUTO).

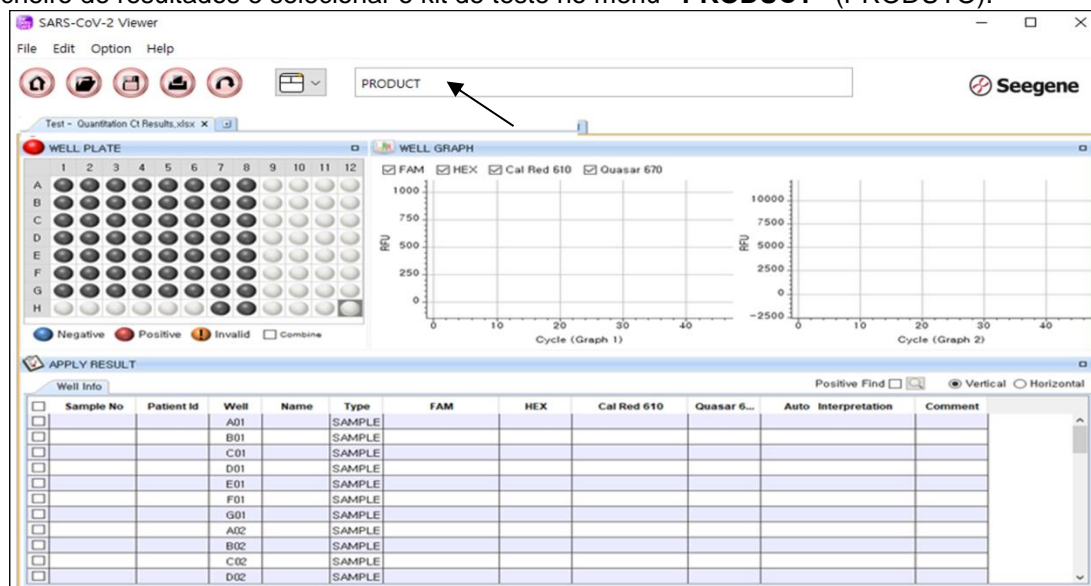
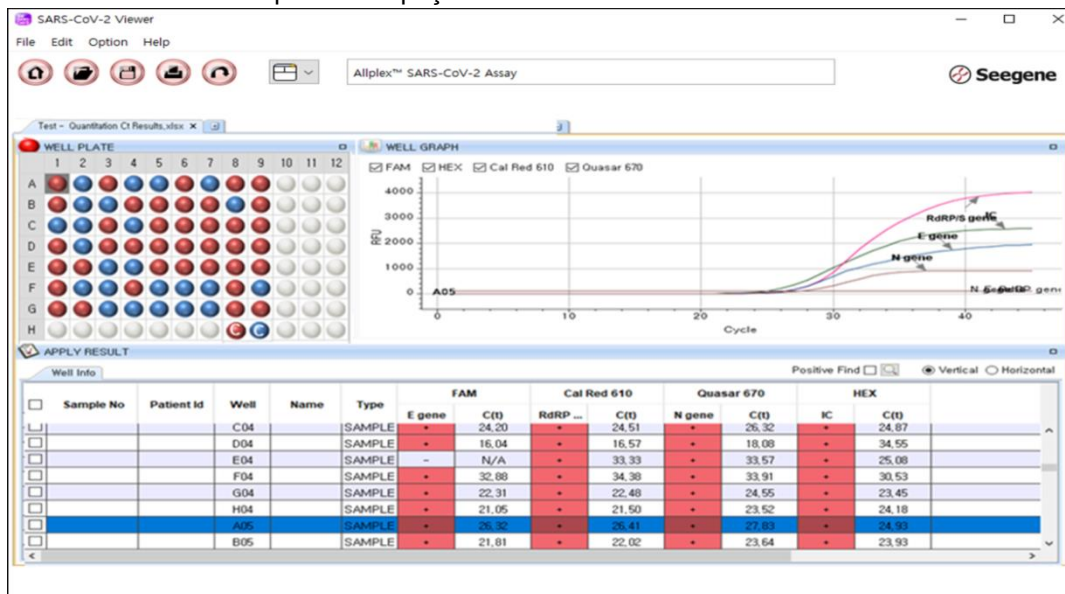


Fig. 29. Configurações para Análise de Dados no Seegene Viewer

Observação: Caso se aplique o método sem extração, seleccione “Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (extraction-free method)” no menu do PRODUTO.

3) Verificar os resultados para cada poço.

Fig. 30. Resultado de teste no Seegene Viewer
4) Critérios de Validade dos Resultados do Controle
a. Execução de Ensaio Válido

Para confirmar a validade dos experimentos, os ensaios de PCR devem ser acompanhados de PC (Positive Control) e NC (Negative Control). A execução do ensaio é determinada como válida quando todos os critérios a seguir são atendidos:

1) Extração padrão

Controlo	Resultado do Seegene Viewer					Auto interpretação
	FAM (C _t)	Cal Red 610 (C _t)	Quasar670 (C _t)	HEX (C _t)	E gene	
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC		
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Controlo Positivo(+)	
Negative Control	N/A	N/A	N/A	N/A	Controlo Negativo(-)	

2) Método sem extração

Controlo	Resultado do Seegene Viewer					Auto interpretação
	FAM (C _t)	ROX (C _t)	CY5 (C _t)	VIC (C _t)	E gene	
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC		
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Controlo Positivo(+)	
Controlo Negativo	N/A	N/A	N/A	≤ 40	Controlo Negativo(-)	

b. Execução de Ensaio Inválido

Nos casos de falha de validade, os resultados não devem ser interpretados ou relatados. E a reação de PCR deve ser repetida.

3. Applied Biosystems™ 7500 (SDS software v2.0.5)

3.1. Configuração do instrumento de PCR em tempo real

Observação: O instrumento deve ser calibrado antes de ser utilizado.

Observação: A configuração de experiência Applied Biosystems™ 7500(Thermo Fisher Scientific) pode ser dividida em duas etapas: Configuração e Execução

A. Configuração

1) No menu principal, selecione **“Set Up”** (Configuração) → **“Advanced Setup”** (Configuração avançada)

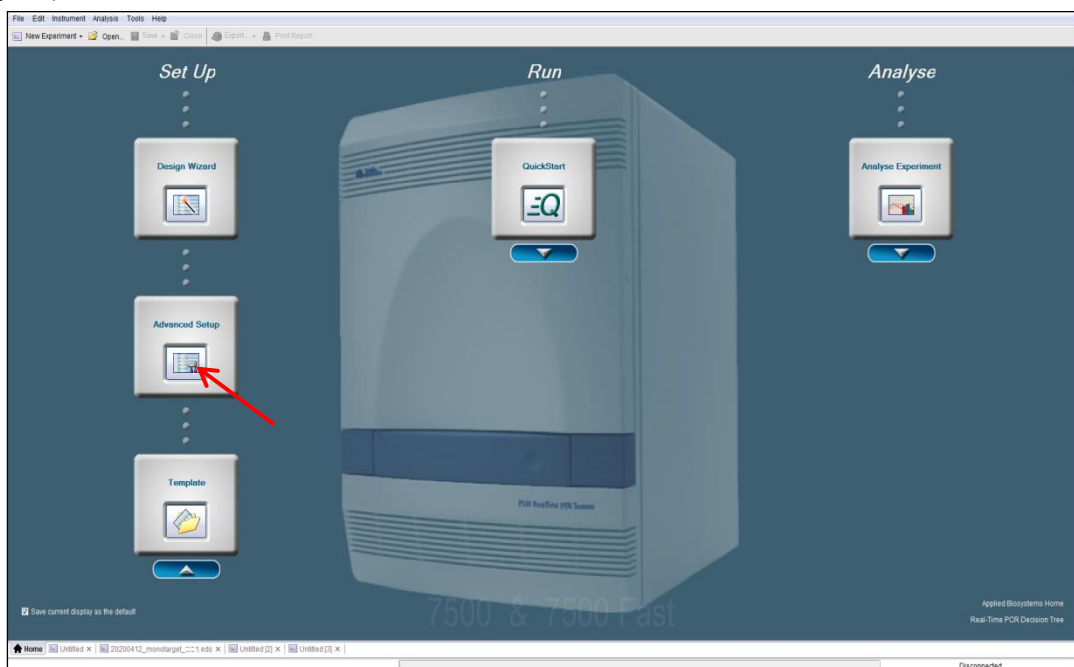


Fig 31. Configuração

2) No separador **“Experiment properties”** (Propriedades da experiência), introduza **“Experiment Name”** (Nome da experiência) e selecione, **“Experiment type”** (Tipo de experiência), **“Reagents”** (Reagentes) e **“Ramp speed”** (Velocidade de rampa), como indicado em seguida.

Instrument (Instrumento)	7500 (96 Wells) (96 poços)
Experiment type (Tipo de experiência)	Quantitation (Quantificação) – Standard Curve (Curva padrão)
Reagents (Reagentes)	Taqman® Reagents (Reagentes Taqman®)
Ramp speed (Velocidade da rampa)	Standard (Padrão)

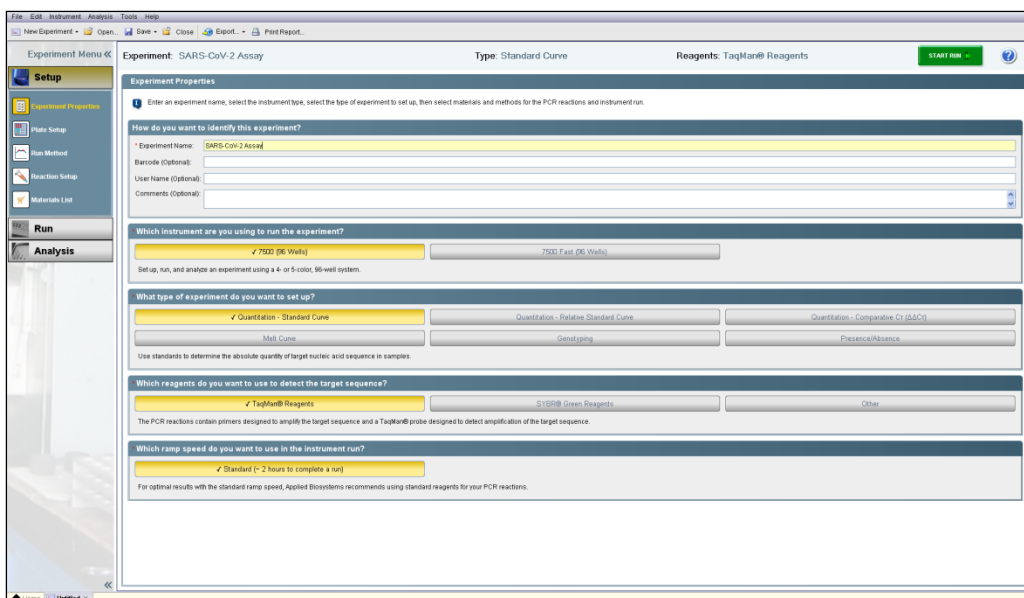


Fig. 32. Separador Propriedades da experiência

3) Clique no separador **“Plate setup”** (Configuração da placa). No separador **“Define Targets and Samples”** (Definir alvos e amostras), introduza o **“Target Name”** (Nome do alvo) e selecione **“Reporter”** (Corante) e **“Quencher”** (Supressor), como indicado em seguida.

Target Name (Nome do alvo)	Reporter (Corante)	Quencher (Supressor)
E gene	FAM	Nenhum
IC	VIC	Nenhum
RdRP/S gene	ROX	Nenhum
N gene	CY5	Nenhum

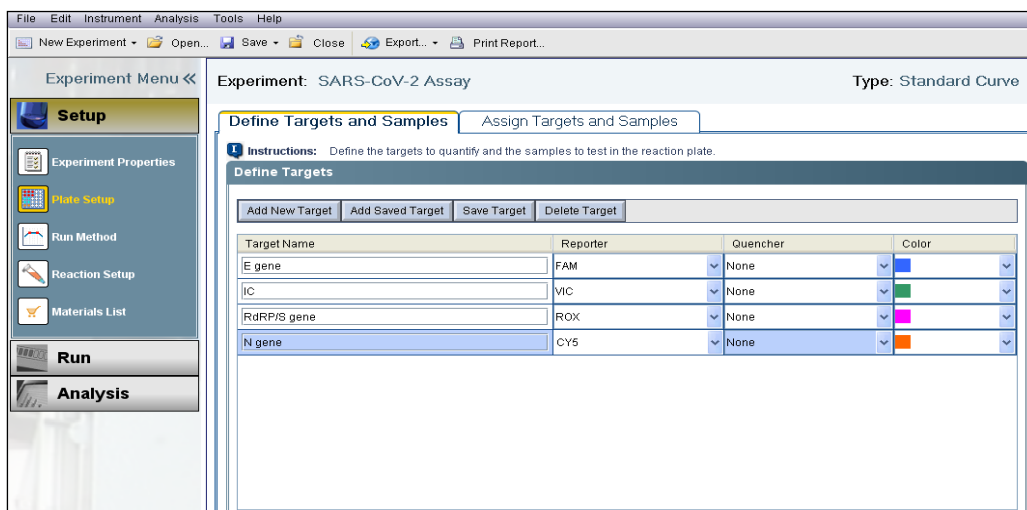


Fig. 33. Separador Definir alvos e amostras

4) Clique no separador “**Assign Targets and Samples**” (Atribuir alvos e amostras), selecione os poços onde o tubo de PCR será colocado e atribua alvos. Selecione Nenhum para referência Passiva.

Observação: Se for selecionado um poço sem amostra ou mistura inicial, poderá ser apresentado sinal de ruído. Certifique-se de que estão selecionados apenas poços com amostras ou mistura inicial.

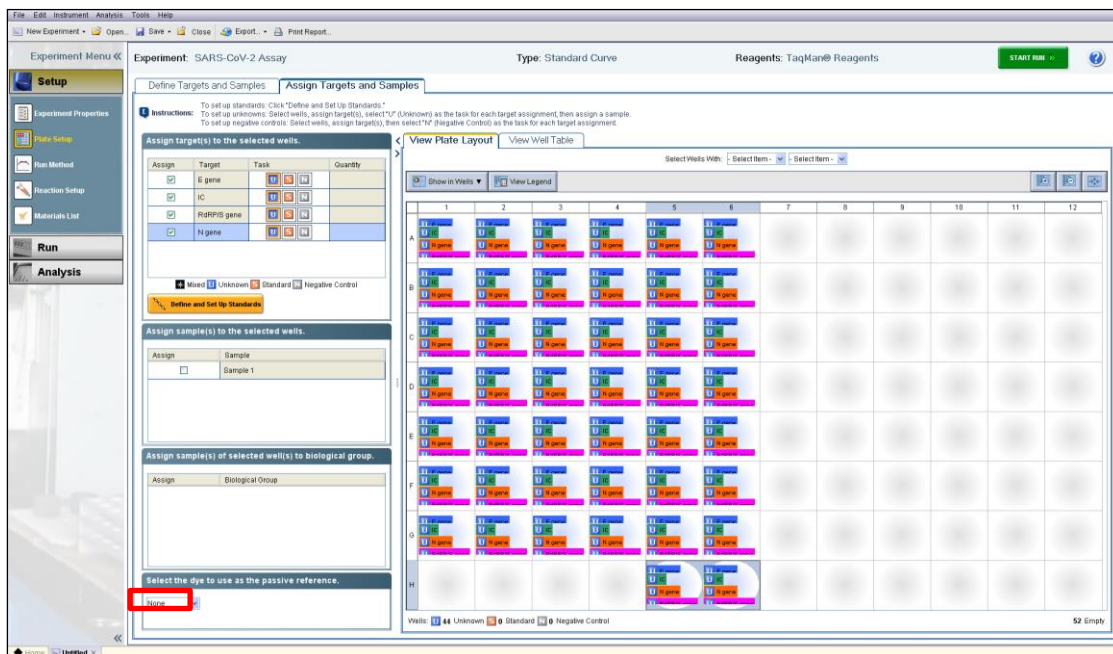


Fig. 34. Separador Atribuir alvos e amostras

5) Clique em “**Run Method**” (Método de execução). No separador “**Graphical View**” (Vista gráfica) ou “**Tabular View tab**” (Vista tabular), introduza 20 µL no campo “**Reaction Volume per Well**” (Volume de reação por poço). Defina o perfil térmico como indicado na tabela abaixo.

Etapa	N.º de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 seg
4*		60°C	30 seg
5		72°C	10 seg

Observação*: Leitura da placa na **Etapa 4**. Fluorescência detetada a 60°C.

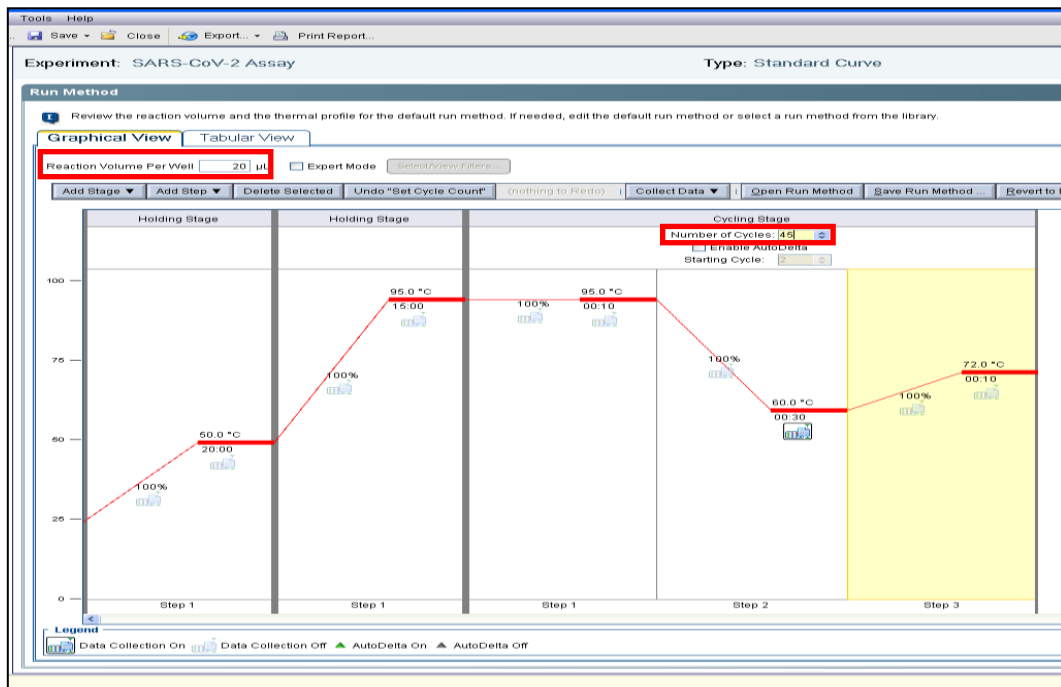


Fig. 35. Separador Vista gráfica

6) Clique em **“File”** (Ficheiro) → **“Save as Template”** (Guardar como modelo) para guardar o novo ficheiro de **“template”** (modelo) no formato **“.edt”**. Introduza o nome do ficheiro, selecione uma localização para o modelo e clique em **“Save”** (Guardar). O **“template”** (modelo) guardado pode ser utilizado para testes futuros.

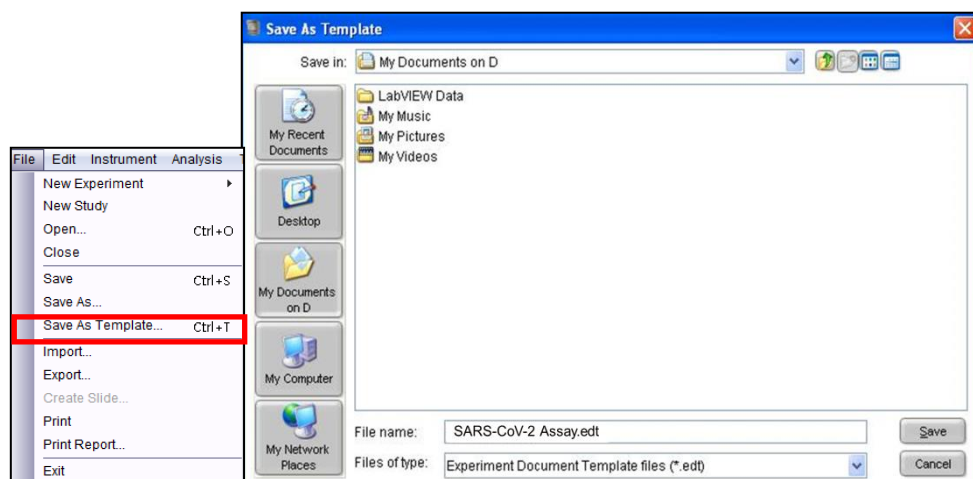


Fig. 36. Guardar como modelo (.edt)

B. Execução

- 1) Ligue o computador portátil e o sistema Applied Biosystems™ 7500 de PCR em tempo real. Assegure-se de que o computador portátil está ligado ao instrumento.
- 2) Pressione a porta do tabuleiro para abrir o instrumento. Coloque a placa de PCR no suporte do instrumento.
- 3) Pressione a porta do tabuleiro para fechar o instrumento.
- 4) Clique em **“File”** (Ficheiro) → **“Save as Template”** (Guardar como modelo) para guardar o novo ficheiro de modelo no formato **“.eds”**. Introduza o nome do ficheiro, selecione uma localização para o modelo e clique em **“Save”** (Guardar).

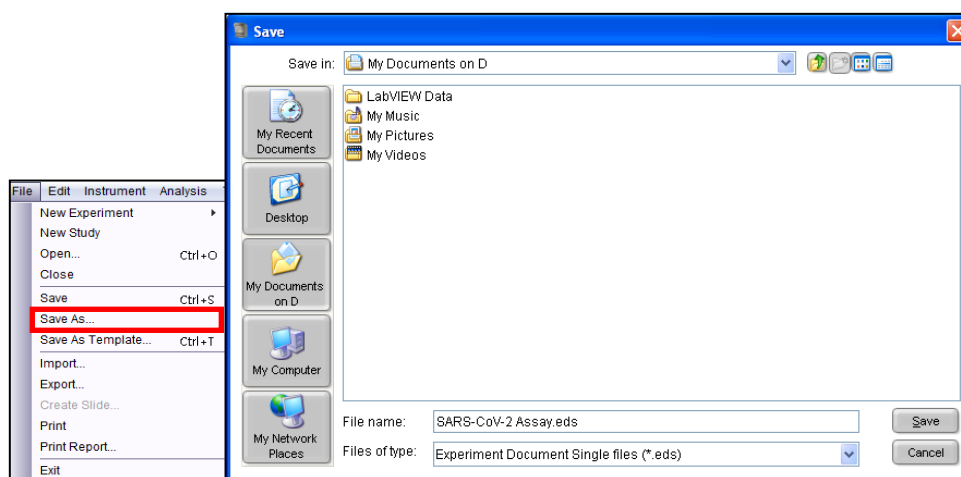


Fig. 37. Guardar como (.eds)

- 5) Clique em **START RUN** (INICIAR EXECUÇÃO).

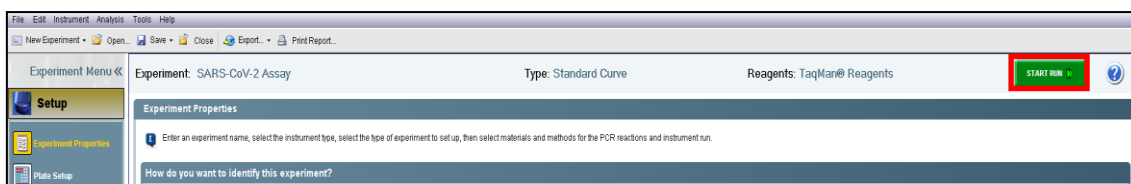


Fig. 38. INICIAR EXECUÇÃO

3.2. Exportação e análise de dados

A. Predefinições para exportação e análise de dados

- 1) Crie uma pasta para guardar os dados de todas as etapas de deteção da curva de amplificação a partir do ficheiro de resultados.
- 2) Introduza o nome da pasta conforme necessário.

3) Clique em **“File”** (Ficheiro) → **“Export”** (Exportar)

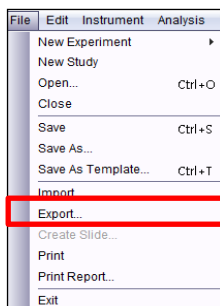


Fig. 39. Exportação de ficheiros

4) Clique no separador **“Export Properties”** (Exportar propriedades) (predefinição) e selecione **“Sample Setup”** (Configuração da amostra), **“Raw data”** (Dados não processados), **“Amplification Data”** (Dados de amplificação), **“Results”** (Resultados) e **“Multicomponent Data”** (Dados multicomponente) em **“1. Select data to export”** (Selecionar dados a exportar).

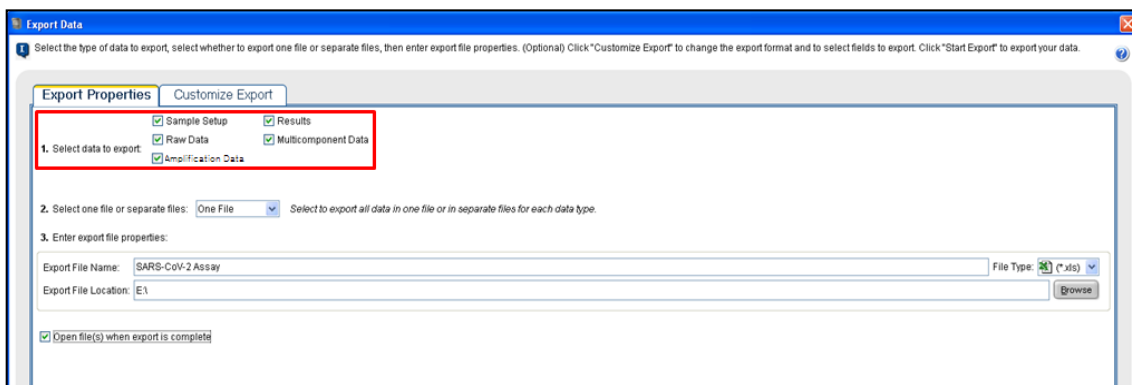


Fig. 40. 1. Selecionar dados a exportar

5) Selecione **“One File”** (Um ficheiro) em **“2. Select one or separate files:”** (Selecionar um ou ficheiros independentes:).

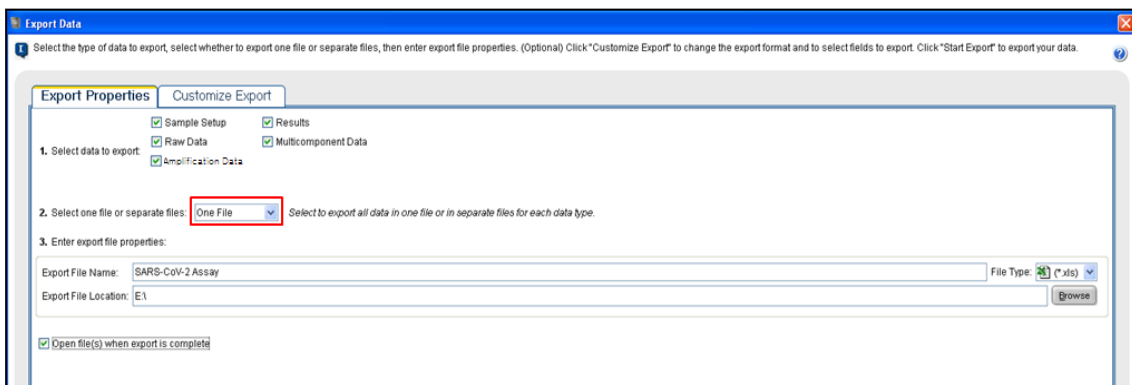


Fig. 41. 2. Selecionar um ou ficheiros independentes

6) Introduza o “**Export File Name**” (Nome do ficheiro de exportação) e, em seguida, seleccione “**Export File Location**” (Localização do ficheiro de exportação). Seleccione “**.xls**” na lista pendente “**File Type**” (Tipo de ficheiro).

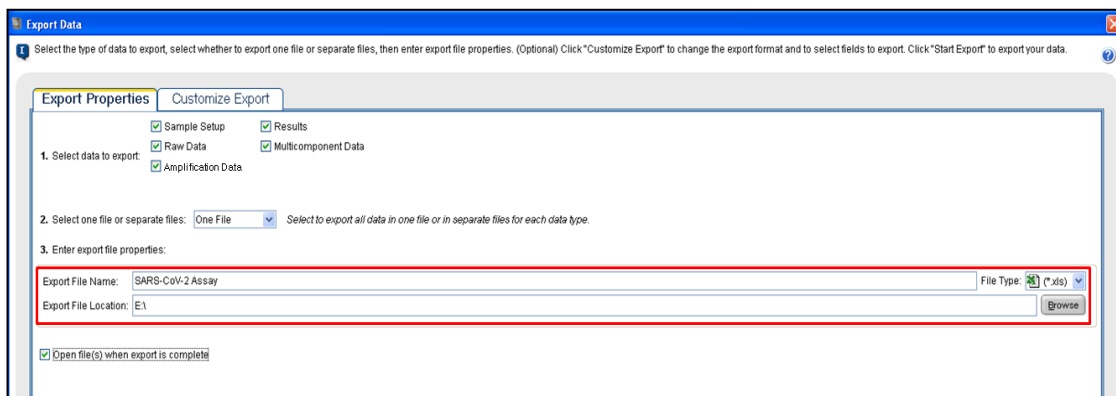


Fig. 42. **3. Introduzir propriedades do ficheiro de exportação**

7) Clique em “**Start Export**” (Iniciar exportação).

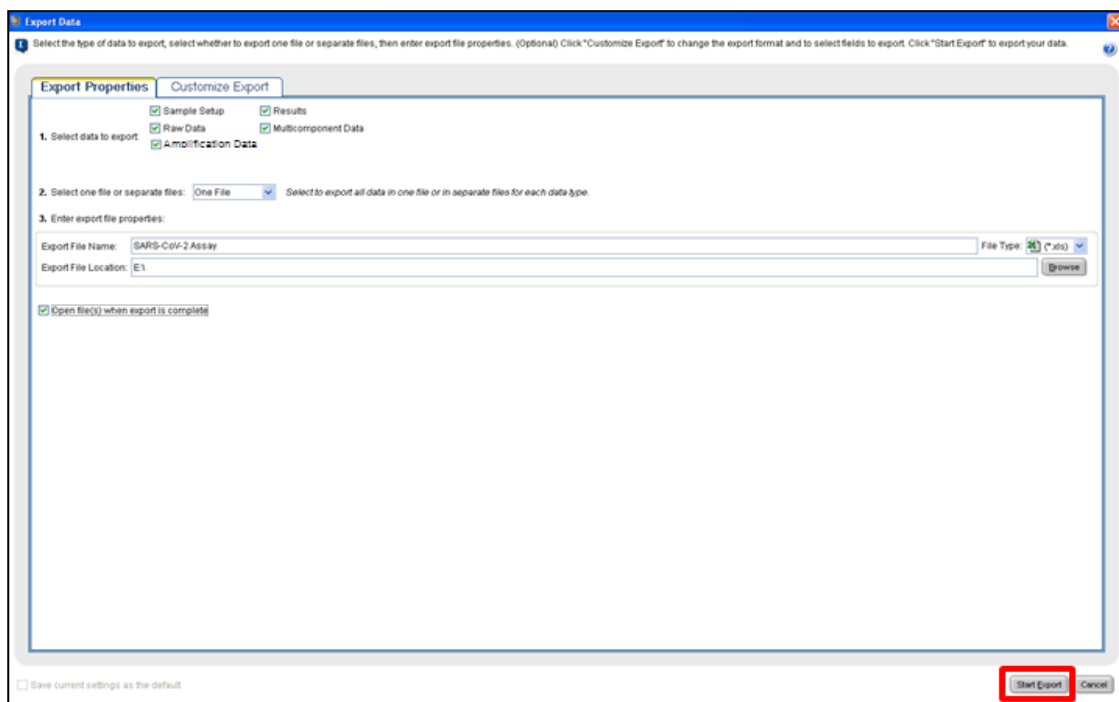


Fig. 43. **Iniciar exportação**

B. Configuração para análise de dados no Seegene Viewer

1) Abra o software Seegene Viewer instalado no computador portátil ligado do sistema Applied Biosystems™ 7500. Clique em “Option” (Opção) para selecionar AB7500 v2.0.5 no “Instrument menu” (Menu Instrumento).

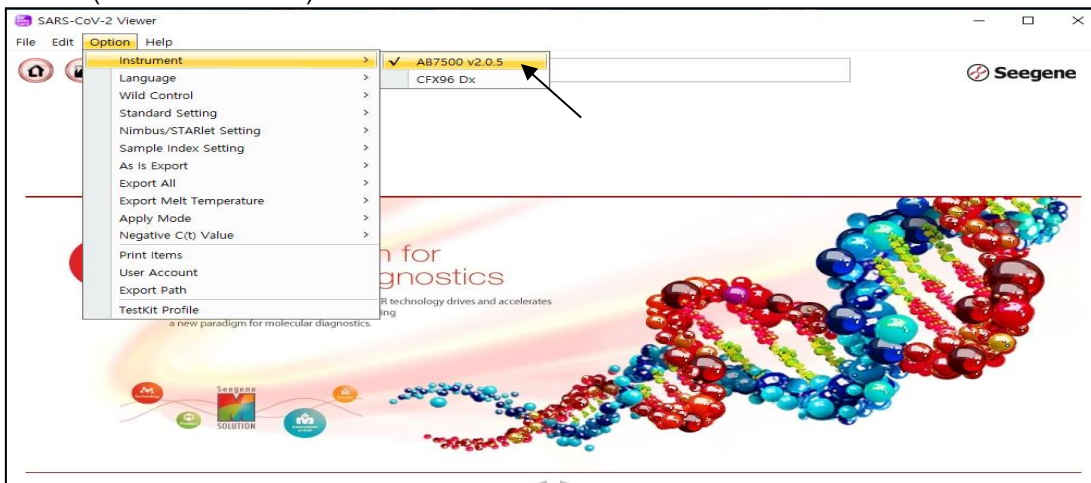


Fig. 44. Seegene Viewer

2) Clique no ícone “Open” (Abrir) e localize os dados exportados do Applied Biosystems™ 7500 onde os dados do sistema Applied Biosystems™ 7500 foram guardados. Depois de abrir o ficheiro de resultados, selecione ‘Allplex™ SARS-CoV-2 Assay’ no menu PRODUCT (PRODUTO).

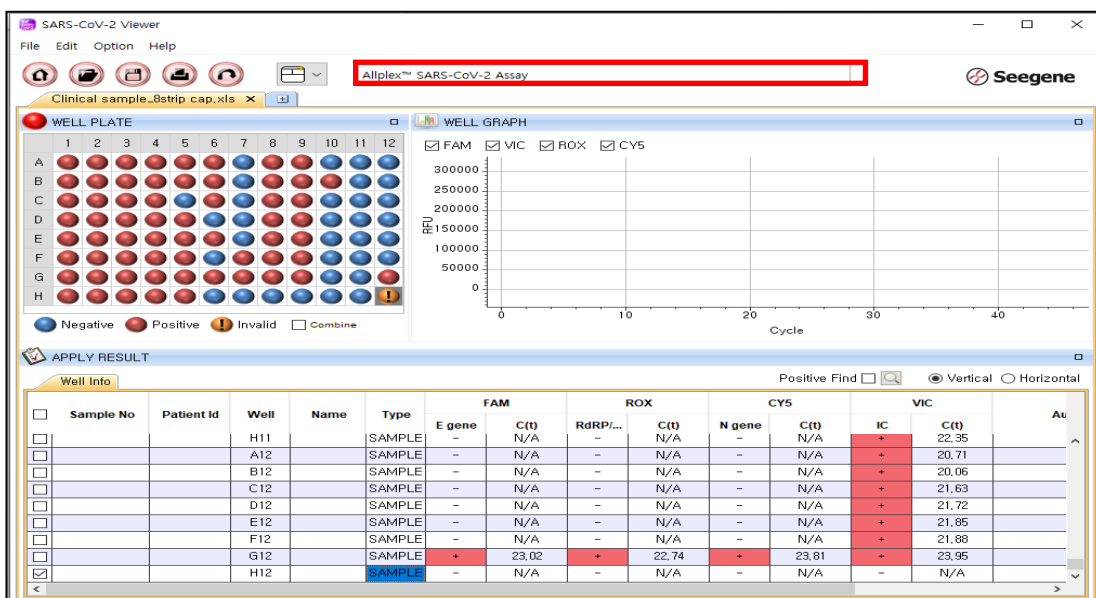


Fig. 45. Definições para análise de dados no Seegene Viewer

Observação: Caso se aplique o método sem extração, selecione “Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (extraction-free method)” no menu do PRODUTO.

3) Atribua respetivamente o controlo positivo e negativo selecionando PC, NC no menu pendente Tipo.

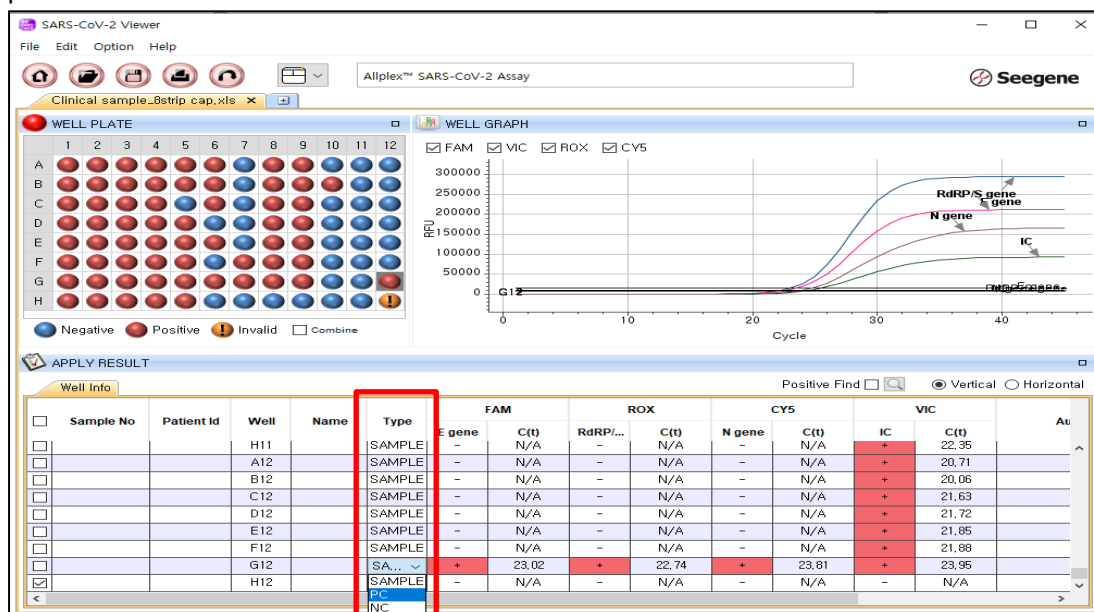


Fig. 46. Definições para tipo de amostra no Seegene Viewer

- 4) Ver resultados do teste. Os resultados interpretados para cada amostra podem ser visualizados clicando em cada poço.
- 5) Critérios de validade dos resultados dos controlos

a. Execução de teste válida

Para verificar a validade das experiências, as execuções de PCR devem ser acompanhadas por PC (Controlo Positivo) e NC (Controlo Negativo). A execução do teste é considerada válida se forem cumpridos todos os seguintes critérios:

3) Extração padrão

Controlo	Resultado do Seegene Viewer				
	FAM (C _t)	ROX (C _t)	CY5 (C _t)	VIC (C _t)	Auto interpretação
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC	
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Controlo Positivo (+)
Controlo Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	Controlo Negativo (-)

4) Método sem extração

Controlo	Resultado do Seegene Viewer				
	FAM (C _t)	ROX (C _t)	CY5 (C _t)	VIC (C _t)	Auto interpretação
	E gene	RdRP/S gene	N gene	IC	
Controlo Positivo	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Controlo Positivo (+)
Controlo Negativo	N/A	N/A	N/A	≤ 40	Controlo Negativo (-)

b. Execução de teste inválida

Em caso de falha na validade, os resultados não devem ser interpretados ou comunicados. A reação de PCR deve também ser repetida.

RESULTADOS**1. Informações de Analito**

CFX96	AB7500	Analitos
Fluoróforos	Fluoróforos	
FAM	FAM	E gene
HEX	VIC	IC
Cal Red 610	ROX	RdRP gene, S gene
Quasar 670	CY5	N gene

2. Interpretação de Resultados

Analito	Valor de C_t	Resultado
Alvos	≤ 40	Detetado (+)
	> 40 ou N/A	Não detetado (-)
IC	≤ 40	Detetado (+)
	> 40 ou N/A	Não detetado (-)

Resultado Alvo			Resultado de IC*	Interpretação Automática	Descrição
E gene	RdRP/S gene	N gene			
+	+	+	+/-	SARS-CoV-2	Todos os Resultados Alvo foram válidos. O resultado para RNA de SARS-CoV-2 foi detetado.
+	-	+	+/-		- Todos os Resultados Alvo foram válidos. O resultado para RNA de SARS-CoV-2 foi detetado.
-	+	+	+/-		- Resultados alvo negativos sugerem
+	+	-	+/-		1) Uma amostra a concentrações próximas ou abaixo do limite de detecção do teste,
-	+	-	+/-		2) Uma mutação na região alvo correspondente,
-	-	+	+/-		3) Outros fatores.
+	-	-	+/-	SARS-CoV-2 Presuntivo positivo	<p>- Todos os Resultados Alvo foram válidos. O resultado para RNA de Sarbecovírus foi detetado. O resultado para RNA de SARS-CoV-2 é Presuntivo Positivo.</p> <p>- Resultados alvo negativos sugerem</p> <p>1) Uma amostra a concentrações próximas ou abaixo do limite de detecção do teste,</p> <p>2) Uma mutação na região alvo correspondente,</p> <p>3) Outros fatores.</p> <p>- Repetir teste com mais ácido nucleico (até 10ul)</p> <p>- Para amostras com o mesmo resultado em testes repetidos, podem ser realizados testes confirmatórios adicionais, caso seja</p>

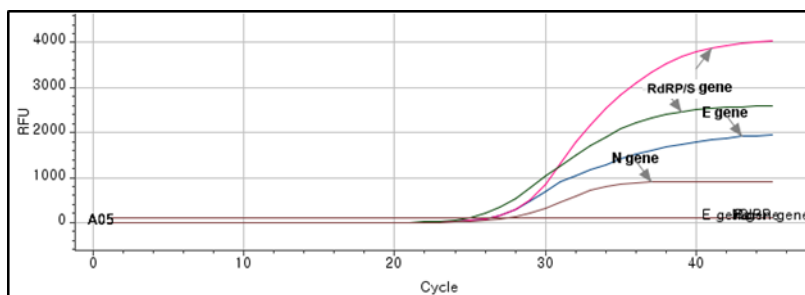
					necessário diferenciar entre SARS-CoV-2 e outro Sarbecovírus atualmente desconhecido como infeccioso a seres humanos, para fins epidemiológicos ou manejo clínico.
-	-	-	+	Não detetado (-)	Todos os resultados alvo foram válidos. O resultado para RNA de SARS-CoV-2 não foi detetado.
-	-	-	-	Inválido**	<ul style="list-style-type: none"> - Os resultados sugerem uma coleta ou processos inadequados de amostras (por exemplo, nenhum IC exógeno adicionado) ou a presença de inibidores de PCR. - Repetir o teste a partir da extração de ácido nucleico com uso de outra alíquota da amostra original. - Se o mesmo resultado for mostrado no ácido nucleico diluído, coletar as amostras novamente.

* O alto nível de ácidos nucleicos alvos pode causar interferência na detecção e leitura do Controle Interno. O sinal de IC inválido não indica que os resultados positivos para os alvos sejam inválidos.

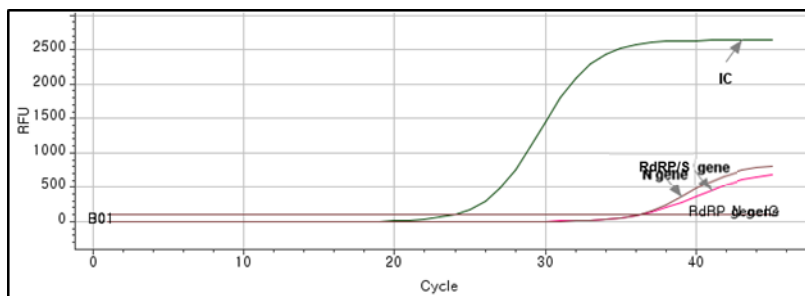
** Vide seção RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS para instruções detalhadas.

3. Aplicação a Amostras Clínicas

Amostra Clínica 1



Amostra Clínica 2



CFX96	FAM		Cal Red 610		Quasar 670		HEX		Auto interpretação
AB7500	FAM		ROX		CY5		VIC		
Amostra	E gene	C(t)	RdRP/ S gene	C(t)	N gene	C(t)	IC	C(t)	
1	+	26,32	+	26,41	+	27,83	+	24,93	SARS-CoV-2
2	-	N/A	+	36,25	+	36,36	+	23,85	SARS-CoV-2

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay		
OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÃO
Sem sinal	Os fluoróforos para análise de dados não cumprem o protocolo	Selecionar os fluoróforos corretos para análise de dados.
	Ajuste incorreto do termociclador em tempo real	Verificar as condições de ciclos térmicos e repetir o teste nas definições corretas.
	Armazenamento incorreto do kit de testes ou validade expirada	Verificar as condições de armazenamento (consultar página 8) e a data de validade (consultar etiqueta) do kit de teste e utilize um novo kit caso necessário.
	Falha de extração de ácido nucleico	<p>Caso o IC tenha sido adicionado exogenamente à amostra antes da extração, a ausência de sinal de IC pode indicar a perda de ácido nucleico durante a extração. Certificar-se de estar a utilizar o método de extração recomendado.</p> <p>Caso ocorra por conta dos inibidores, extrair novamente a amostra original ou mesma pode ser diluída com solução salina 1/3-1/10 vezes e, em seguida, adicionar o material "RP-V IC2" à amostra diluída.</p>
Sem sinal de Controlo Interno	Alta carga de ácido nucleico do patógeno	Se o sinal patogénico alvo é observado mas não o IC, então a amplificação do IC pode ter sido inibida pelo título elevado do patógeno alvo. Para fins de observação do sinal de IC, diluir a amostra (1/3~1/10) em tampão salino e repetir o teste a partir da fase de extração.
	Presença de inibidor de PCR	Diluir a amostra (1/3~1/10) em tampão salino e repetir o teste a partir da fase de extração.

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay		
OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÃO
Sinais suspeitos de serem falso positivos ou sinais-alvo observados em Controlo Negativo	Contaminação	Descontaminar todas as superfícies e instrumentos com hipoclorito de sódio e etanol. Utilizar apenas pontas de filtro ao longo do procedimento e trocar as pontas entre os tubos. Repetir todo o procedimento a partir da extração de ácido nucleico com um novo conjunto de reagentes.
Sinais suspeitos de serem falso negativos ou sem sinais-alvo observados em Controlo Positivo	Erro na coleta de amostra	Verificar o método de coleta de amostras e coletar novamente.
	Armazenamento incorreto de amostra	Coletar novamente a amostra e repetir o procedimento todo. Certificar-se de que a amostra esteja armazenada conforme recomendado.
	Erro na extração de ácido nucleico	Verificar o processo de extração de ácido nucleico e sua concentração e o extrair novamente.
	Erro na adição de ácido nucleico aos tubos de PCR corretos	Verificar os números de amostra de tubos contendo ácido nucleico e certificar-se de adicionar ácido nucleico para os tubos de PCR corretos e repetir o teste cuidadosamente, se necessário.
	Presença de inibidor	Diluir a amostra (1/3~1/10) em tampão salino e repetir o teste a partir da fase de extração.
	Mistura de PCR incorreta	Confirmar se todos os componentes são adicionados à mistura de reação (a sensibilidade é comprometida com a pré-mistura pré-composta). Todos os reagentes devem ser homogeneizados e centrifugados antes de serem utilizados.
Picos em qualquer ciclo de curva de amplificação	Bolhas no tubo de PCR	Centrifugar p tubo de PCR antes da execução.
Sem sinal do método sem extração	Presença de inibidor de PCR	Verifique o dispositivo de colheita de amostras. ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR, Gene™ Set (GTS2) e Gene™ Set (GTS1) não se aplicam ao método sem extração.

DESEMPENHO
1. Especificidade Analítica

A alta especificidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay é assegurada pelos oligos concebidos especificamente para os alvos de interesse. O Allplex™ SARS-CoV-2 Assay foi testado quanto à reatividade cruzada para 65 agentes patogénicos diferentes, e a amplificação e deteção de PCR foram identificadas somente nos alvos especificados.

Nº.	Organismo	Fonte	Isolado No.	Resultado†
1	SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01	TWIST BIOSCIENCE	102019	E, RdRP/S, N gene Detetado
2	SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	TWIST BIOSCIENCE	102024	E, RdRP/S, N gene Detetado
3	Human coronavirus HKU1	Isolado Coreano		Não Detetado
4	Human coronavirus OC43	ATCC	VR-1558	Não Detetado
5	Human coronavirus NL63	ZMC	0810228CF	Não Detetado
6	Human coronavirus 229E	Isolado Coreano		Não Detetado
7	SARS-coronavirus	ZMC	NATSARS-ST	E gene Detetado
8	MERS-coronavirus	ZMC	NATMERS-ST	Não Detetado
9	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-95 (H1N1)	Não Detetado
10	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-547	Não Detetado
11	Influenza B virus	ATCC	VR-523	Não Detetado
12	Human Rhinovirus 1	KBPV	VR-81	Não Detetado
13	Rhinovirus 21	KBPV	VR-40	Não Detetado
14	Human rhinovirus type 90	ATCC	VR-1291	Não Detetado
15	Human rhinovirus type 16	ATCC	VR-283	Não Detetado
16	Human rhinovirus type 42	ATCC	VR-338	Não Detetado
17	Human rhinovirus type 8	ATCC	VR-488	Não Detetado
18	Human rhinovirus type 14	ATCC	VR-284	Não Detetado
19	Human enterovirus type 68	ATCC	VR-1826	Não Detetado
20	Human enterovirus type 70	ATCC	VR-836	Não Detetado
21	Human enterovirus type 71	ATCC	VR-784	Não Detetado
22	Human respiratory syncytial virus A	ATCC	VR-26	Não Detetado
23	Human respiratory syncytial virus B	ATCC	VR-955	Não Detetado
24	Parainfluenza 1 virus	ATCC	VR-1380	Não Detetado
25	Human parainfluenza virus 2	ATCC	VR-92	Não Detetado

Nº.	Organismo	Fonte	Isolado No.	Resultado†
26	Human parainfluenza virus 3	ATCC	VR-93	Não Detetado
27	Human parainfluenza 4 virus 4a	ATCC	VR-1378	Não Detetado
28	Human parainfluenza virus 4b	ATCC	VR-1377	Não Detetado
29	Human Metapneumovirus (MPV)	KBPV	VR-87	Não Detetado
30	Human adenovirus 1	ATCC	VR-1	Não Detetado
31	Human adenovirus 11	KBPV	VR-63	Não Detetado
32	Human adenovirus 18	ATCC	VR-1095	Não Detetado
33	Human adenovirus 23	ATCC	VR-1101	Não Detetado
34	Human adenovirus 3	ATCC	VR-3	Não Detetado
35	Human adenovirus 4	ATCC	VR-1572	Não Detetado
36	Human adenovirus 8	ATCC	VR-1368	Não Detetado
37	Human adenovirus type 31	ATCC	VR-1109	Não Detetado
38	Human adenovirus type 40	ATCC	VR-931	Não Detetado
39	Human adenovirus type 5	KBPV	VR-61	Não Detetado
40	Human adenovirus type 35	ATCC	VR-718	Não Detetado
41	Human Bocavirus (HBoV)	Isolado Coreano		Não Detetado
42	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 2	ATCC	33154	Não Detetado
43	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serotype 4	ATCC	33156	Não Detetado
44	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 7	ATCC	33823	Não Detetado
45	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 10	ATCC	43283	Não Detetado
46	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 11	ATCC	43130	Não Detetado
47	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 12	ATCC	43290	Não Detetado
48	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 13	ATCC	43736	Não Detetado
49	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype 14	ATCC	43703	Não Detetado
50	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> Serotype 15	ATCC	35251	Não Detetado
51	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	15293	Não Detetado
52	<i>Streptococcus salivarius</i>	KCTC	5512	Não Detetado
53	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCCM	40416	Não Detetado
54	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC	51907	Não Detetado
55	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC	25177	Não Detetado

Nº.	Organismo	Fonte	Isolado No.	Resultado†
56	<i>Alphacoronavirus 1 (feline infectious Peritonitis Virus)</i> , 79-1146	BEI	NR-49097	Não Detetado
57	<i>Porcine Respiratory Coronavirus</i> , ISU-1	BEI	NR-48572	Não Detetado
58	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC	53592	Não Detetado
59	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCCM	40410	Não Detetado
60	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC	19615	Não Detetado
61	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC	BAA-589	Não Detetado
62	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Isolado Coreano		Não Detetado
63	Pooled human nasal wash*	Isolado Coreano		Não Detetado
64	<i>Candida albicans</i>	KCCM	11282	Não Detetado
65	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ZMC	801908	Não Detetado

† Os testes de especificidade foram repetidos 3 vezes.

* No.63 foi usado para avaliar a especificidade de diversa flora microbiana no trato respiratório humano.

※ ATCC: American Type Culture Collection,

BEI: BEI Resources

KBPV: Korea Bank for Pathogenic Viruses

ZMC: ZeptoMetrix Corporation

KCTC : Korean Collection for Type Cultures

2. Sensibilidade Analítica

Para determinar a sensibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, o RNA genómico do SARS-CoV-2, obtido a partir de TWIST BIOSCIENCE (Cat. N.º 102024) e BEI Resources (Cat. N.º NR-52286) foi diluído em série em matriz de amostra negativa. Os ácidos nucleicos foram extraídos de cada diluição utilizando Microlab NIMBUS IVD e analisados com Allplex™ SARS-CoV-2 Assay. O limite de deteção do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay verificado utilizando RNA genómico de TWIST BIOSCIENCE é de 5.000 cópias/mL (= 50 cópias de RNA/rxn). O limite de deteção do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay verificado utilizando o vírus SARS-CoV-2 inativado de BEI Resources é de 1.000 equivalentes de genoma viral/mL (= 1,0 GE/µL).

Para determinar a sensibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay para o método sem extração, o vírus SARS-CoV-2 inativado de BEI Resources foi extraído grosseiramente através do método sem extração. O limite de deteção do método sem extração é de 10.000 equivalentes de genoma viral/mL (= 10 GE/µL).

3. Reprodutibilidade

O teste de repetibilidade foi preparado, incluindo amostras negativas altas (0,1X LoD), positivas baixas (1X LoD) e positivas moderadas (3X LoD). Em cada local de teste, o kit foi testado durante cinco dias, duas execuções por dia por dois operadores diferentes e triplicado de cada alvo. As taxas positivas foram observadas para cada alvo do estudo de reprodutibilidade: 100,0% para amostras positivas moderadas, $\geq 95\%$ para amostras positivas baixas. A reprodutibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay foi avaliada entre execuções, locais e lotes do produto. As taxas positivas para todas as concentrações e valores de CV atenderam aos critérios menores ou iguais a 4% ($\leq 4\%$).

Os resultados foram satisfeitos com os critérios definidos acima, confirmando assim os desempenhos em termos de reprodutibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay.

4. Substâncias interferentes

Não houve efeito no resultado pela adição das substâncias: detecção ou inibição não específicas na amplificação do alvo. Com base nos resultados, 7 substância interferente não teve nenhum efeito nos resultados do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay.

No.	Substâncias interferentes	Fonte	Testes Concentração
1	Mucin (bovine submaxillary gland, type I-S)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº M3895)	60 µg/ml
2	Mupirocin (Antibiotic, nasal ointment)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº 1448901)	6,6 mg/ml
3	Oxymetazoline (Afrin Nasal Spray)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº O2378)	15% (v/v)
4	Blood	Human	2% (v/v)
5	Tobramycin (Antibacterial, systemic)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº T4014)	4,0 µg/mL
6	Zanamivir (Anti-viral drug-Relenza)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº SML0492)	3,3 mg/mL
7	Oseltamivir (Anti-viral drug-Tamiflu)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº 1479304)	25 mg/mL

5. Desempenho clínico

5-1. Extração padrão

Um total de 187 amostras foram incluídas neste desempenho clínico. As amostras são constituídas por 5 amostras de aspirado nasofaríngeo, 61 amostras nasofaríngea por zaragatoa, 5 amostras de lavado broncoalveolar, 59 amostras de zaragatoa orofaríngeo (garganta), e 57 amostras de expectoração. O desempenho do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay foi avaliado através da comparação com outro painel de diagnóstico SARS-CoV-2 RT-PCR em tempo real Real-Time previamente aprovado pela CE-IVD. Este teste de comparação mostra mais de 95% de concordância na amostra clínica. Por conseguinte, está confirmado que a qualidade do Allplex™ SARS-CoV-2 Assay é válida. O desempenho é resumido na tabela.

		Resultado de comparação com aprovação CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	Positivo	96	3*	99
	Negativo	0	88	88
	Total	96	91	187

- ORA (Taxas globais de correspondência): 98,40% (95% CI: 95,38% a 99,67%)
- PPA (Percentagem de correspondência positiva): 100% (95% CI: 96,23% a 100,00%)
- NPA (Percentagem de correspondência negativa): 96,70% (95% CI: 90,67% a 99,31%)
- * Sequenciação e confirmação de verdadeiro positivo.

5-2. Método sem extração

Um total de 111 amostras de esfregaço foram incluídas neste desempenho clínico do método sem extração. O método sem extração foi comparado com a extração padrão para comprovar a validade clínica do método sem extração para Allplex™ SARS-CoV-2 Assay. Este teste de comparação mostra mais de 95% de concordância na amostra clínica. Portanto, a qualidade do método livre de extração para o Allplex™ SARS-CoV-2 Assay é confirmada como válida. O desempenho é resumido na tabela.

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay		Extração padrão		
		Positivo	Negativo	Total
Método sem extração	Positivo	78	0	78
	Negativo	1*	32	33
	Total	79	32	111

- ORA(Taxas globais de correspondência): 99,1% (95% CI: 95,07% a 99,8%)
- PPA(Percentagem de correspondência positiva): 98,7% (95% CI: 93,17% a 99,78%)
- NPA(Percentagem de correspondência negativa): 100% (95% CI: 89,57% a 100%)
- * Sequenciação e confirmação de verdadeiro positivo.

REFERÊNCIAS

















1. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4
2. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin (2012) 1: 5-10
3. Y. J. Lee, *et al.* [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR] Scientific Reports (2014) 4:7439
4. J. Y. Chun, *et al.* [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Research. (2007) 35(6): e40
5. Gobalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, *et al.* (March 2020). "The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2". Nature Microbiology. 5 (4): 536–544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z. PMID 32123347. Archived from the original on 5 March 2020. Retrieved 3 March 2020
6. "Coronavirus disease named Covid-19". BBC News Online. 11 February 2020. Archived from the original on 15 February 2020. Retrieved 15 February 2020
7. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV): interim guidance v1, January 2020 (Report). World Health Organization. January 2020. hdl:10665/330376. WHO/2019-nCoV/Surveillance/v2020.1
8. "Healthcare Professionals: Frequently Asked Questions and Answers". United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 11 February 2020. Archived from the original on 14 February 2020. Retrieved 15 February 2020
9. "About Novel Coronavirus (2019-nCoV)". United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 11 February 2020. Archived from the original on 11 February 2020. Retrieved 25 February 2020
10. "CoV2020". GISAID EpifluDB. Archived from the original on 12 January 2020. Retrieved 12 January 2020
11. "WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020". World Health Organization (WHO) (Press release). 11 March 2020. Archived from the original on 11 March 2020. Retrieved 12 March 2020
12. Wee SL, McNeil Jr. DG, Hernández JC (30 January 2020). "W.H.O. Declares Global Emergency as Wuhan Coronavirus Spreads". The New York Times. Archived from the original on 30 January 2020. Retrieved 30 January 2020
13. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, *et al.* (February 2020). "A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster". The Lancet. 395 (10223): 514–523. doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

PMID 31986261

14. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. (February 2020). "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin". *Nature*. 579 (7798): 270–273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7. PMC 7095418. PMID 32015507
15. Perlman S (February 2020). "Another Decade, Another Coronavirus". *The New England Journal of Medicine*. 382 (8): 760–762. doi:10.1056/NEJMe2001126. PMID 31978944
16. Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M (April 2020). "The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution". *Journal of Medical Virology*. 92 (4): 455–459. doi:10.1002/jmv.25688. PMID 31994738
17. Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 22 (Report). World Health Organization. 11 February 2020. hdl:10665/330991
18. Shield C (7 February 2020). "Coronavirus: From bats to pangolins, how do viruses reach us?". *Deutsche Welle*. Retrieved 13 March 2020
19. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. (February 2020). "The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health – The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China". *The International Journal of Infectious Diseases*. 91: 264–266. doi:10.1016/j.ijid.2020.01.009. PMID 31953166. open access

SÍMBOLOS

Chave para símbolos utilizados no manual e nos rótulos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo de diagnóstico médico in vitro
	Código do lote
	Número de catálogo
	Uso por data
	Limite superior de temperatura
	Mistura de oligonucleótidos para amplificação e deteção
	Mix de enzimas
	RNase-free Water
	Controlo Positivo (PC)
	Controlo Interno (IC)
	Consultar instruções de uso
	Fabricante
	Data de fabricação
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Cuidado
	Contém o suficiente para <n> testes

INFORMAÇÕES DE PEDIDO

Cat. Nº	Produto	Tamanho
Série Allplex™		
RV10247Y	Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	50 rxns
RV10248X	Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	100 rxns*
* Para uso com Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS e Seegene STARlet somente		
Produto acessório		
SG1701	Ribo_spin vRD (Kit de Extração de RNA/DNA Viral)	50 preps
Sistemas de extração automatizada		
65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384 T / 1box
EX00013C	STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit	384 T / 1box
SGprep32-180701	SGprep32	EA
EX00003P	STARMag 96 UniPlate	96 T / 1box
EX00004T	STARMag 96 UniTube	96 T / 1box
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96 T / 1box
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96 T / 1box
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96 T / 1 box
EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96 T / 1 box
M9600	Maelstrom™ 9600	EA
W665S66	TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Auto Tube	72 T / 1box
W665A10	TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Bulk Plate	960 T / crt