

Instruções de utilização

FlexStar[®]

**SARS-CoV-2 Type & FLU
RT-PCR Detection Mix 1.5**

02/2022 PT

Respiratory

FlexStar®

SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5

Para utilização com

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)



FS0021515



384



02 2022



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

Conteúdo

1.	Sobre estas instruções de utilização	6
2.	Utilização prevista	6
3.	Conteúdo do produto	7
4.	Armazenamento	8
5.	Informação de base	9
6.	Descrição do produto	10
6.1	Componentes	11
6.2	Instrumentos PCR em tempo real	12
6.3	Tipos de amostras	12
7.	Material necessário mas não fornecido	13
8.	Advertências, precauções e limitações	14
9.	Procedimento	16
9.1	Recolha, manuseamento e armazenamento de amostras.....	16
9.2	Preparação de amostras	17
9.3	Preparação da master mix	19
9.4	Preparação da reação	20
10.	Programação do instrumento PCR em tempo real	21
10.1	Definições.....	22
10.2	Detetores de fluorescência (corantes).....	22
10.3	Perfil de temperatura e aquisição de corante.....	23
11.	Análise de dados	23
11.1	Validade dos processamentos de teste de diagnóstico.....	24
11.1.1	Processamento de teste de diagnóstico válido	24

11.1.2	Processamento de teste de diagnóstico inválido	24
11.2	Interpretação dos resultados	24
11.2.1	Análise qualitativa.....	25
12.	Avaliação do desempenho	26
12.1	Esfregaços respiratórios.....	26
12.1.1	Sensibilidade analítica.....	26
12.1.2	Especificidade analítica	30
12.1.2.1	Amostras negativas.....	31
12.1.2.2	Substâncias interferentes.....	31
12.1.2.3	Reatividade cruzada.....	32
12.1.3	Inclusividade.....	33
12.1.4	Precisão.....	36
12.1.5	Taxa de insucesso total	38
12.1.6	Transferência.....	38
12.1.7	Desempenho clínico	39
13.	Eliminação	41
14.	Controlo de qualidade	41
15.	Apoio técnico	42
16.	Bibliografia	42
17.	Marcas comerciais e isenções de responsabilidade.....	43
18.	Explicação de símbolos	44
19.	Histórico de revisões.....	46

1. Sobre estas instruções de utilização

Ao longo deste manual, os termos ATENÇÃO e NOTA têm os seguintes significados:

ATENÇÃO



Destaca os procedimentos ou as instruções de funcionamento que, se não forem seguidos corretamente, podem resultar em lesões pessoais ou afetar o desempenho do produto. Contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência.

NOTA



Consiste em informações úteis para o utilizador mas que não são essenciais para a tarefa em questão.

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

2. Utilização prevista

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção e diferenciação qualitativa de ARN específico do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) e do vírus da gripe em amostras de esfregaços respiratórios humanos. A deteção do SARS-CoV-2 é baseada na deteção paralela do gene E da linhagem B-betacoronavírus (incluindo o SARS-CoV-2) e do gene S do SARS-CoV-2.

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 destina-se a ser utilizado como auxiliar de diagnóstico na infeção por SARS-CoV-2 e vírus da gripe.

Os resultados obtidos com o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 têm de ser interpretados juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais.

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 destina-se a ser utilizado por profissionais com formação em técnicas de biologia molecular e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

3. Conteúdo do produto

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contém os seguintes componentes:

Tabela 1: Componentes do kit

Cor da tampa	Componente	Número de tubos	Volume nominal [µl/tubo]
Azul	Detection Mix ¹⁾	8	240
Vermelho	PC ²⁾	2	250
Branco	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Contém material biológico de origem animal

²⁾ Positive Control (controlo positivo) [ARN específico da linhagem B-βCoV (gene E), do SARS-CoV-2 (gene S) e do vírus da gripe]

³⁾ No Template Control (controlo negativo)

ATENÇÃO



Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto defeituoso ou incompleto, o desempenho do produto poderia ficar comprometido.

4. Armazenamento

- O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 é enviado em gelo seco. Os componentes do produto devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da recepção, ou se os tubos tiverem ficado comprometidos durante o envio, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência (consulte o capítulo 15. Apoio técnico).
- Todos os componentes devem ser armazenados entre -25 °C e -15 °C imediatamente à chegada.
- Deve evitar-se o descongelamento e congelamento repetido do componente Detection Mix, porque pode afetar o desempenho do produto.
- Deve evitar-se o descongelamento e congelamento repetido do Positive Control (PC, controlo positivo) e do No Template Control (NTC, controlo negativo) (mais de 4 vezes), porque pode afetar o desempenho do produto.
- O armazenamento à temperatura ambiente (máx +30 °C) não deve exceder um período de 2 horas.
- Proteja o componente Detection Mix da luz.

ATENÇÃO



Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



Não ultrapasse a sequência descongelar-congelar e a duração de manuseamento conforme especificado nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



Não utilize produtos para além da data de validade. A utilização de produtos expirados pode comprometer o desempenho do produto.

5. Informação de base

SARS-CoV-2

O coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) consiste num vírus de ARN de cadeia simples e sentido positivo pertencente à família *Coronaviridae*, género betacoronavírus, subgénero linhagem B.

O SARS-CoV-2 surgiu na região de Wuhan na China em dezembro de 2019, tendo-se espalhado pelo resto do mundo em 2 meses. O vírus foi inicialmente denominado 2019-nCoV (novo coronavírus), tendo o nome sido alterado para SARS-CoV-2 pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses”, em 11.02.2020. Na mesma altura, a OMS atribuiu o nome COVID-19 à doença causada pelo SARS-CoV-2. Tendo em conta a rápida escalada e propagação da COVID-19 a nível mundial, em 12.03.2020 a OMS caracterizou o surto como uma pandemia.

O SARS-CoV-2 é altamente contagioso e transmite-se através de aerossóis e gotículas, provocando infeções respiratórias agudas com sintomas do tipo gripe. De uma maneira geral, mas não de forma exclusiva, nos idosos e em pessoas com doença pré-existente, a infeção com SARS-CoV-2 pode resultar em doença grave e potencialmente fatal. Foram referidos casos de infeção assintomática, doença ligeira, doença grave e mortes causadas pela doença [1,2].

Vírus da gripe

A influenza, referida comumente como gripe, é uma doença infecciosa causada por vírus ARN da família *Orthomyxoviridae* (vírus da gripe) [3,4]. Os vírus da gripe caracterizam-se pela alteração contínua dos seus principais antígenos de superfície, hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) (derivação antigénica) [5]. Infetam as aves e os mamíferos através dos aerossóis [6]. Os vírus da gripe A e gripe B humana causam infeções graves predominantemente nas vias respiratórias, sendo a febre e a tosse os sintomas mais frequentes. Em casos mais graves, a gripe causa pneumonia, que pode ser fatal especialmente para as crianças e os idosos [7].

NOTA



Devido à evolução molecular relativamente rápida dos vírus ARN, existe um risco inerente relativamente a qualquer sistema de teste baseado em RT-PCR de a acumulação de mutações ao longo do tempo poder resultar em resultados falsos negativos.

6. Descrição do produto

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*. Utilizado em combinação com o FlexStar® (RT)-PCR Amplification Mix 1.5 permite a deteção e diferenciação qualitativa de ARN específico da linhagem B-betacoronavírus (linhagem B-βCoV, gene E), do SARS-CoV-2 (gene S) e do vírus da gripe (A+B) em amostras de esfregaços respiratórios humanos.

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 baseia-se em tecnologia RT-PCR em tempo real, utilizando a reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (cADN), a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências-alvo específicas da linhagem B-βCoV (gene E), do SARS-CoV-2 (gene S) e da gripe (A+B) e das sondas específicas para o alvo com marcação fluorescente para a deteção do cADN amplificado.

Para além dos sistemas de deteção e amplificação específicos de ARN da linhagem B-βCoV, SARS-CoV-2 e vírus da gripe, o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 inclui oligonucleotídeos para a amplificação e deteção do controlo interno (IC, AltoStar® Internal Control 1.5). O IC é automaticamente adicionado no início do procedimento de purificação de ácido nucleico no AltoStar® Automation System AM16 (doravante sintetizado como AltoStar® AM16). Para mais detalhes, consulte as instruções de utilização do AltoStar® Internal Control 1.5.

As sondas específicas para o ARN da linhagem B-βCoV (gene E) estão marcadas com o fluoróforo ROX™, as sondas específicas para o ARN do SARS-CoV-2 (gene S) estão marcadas com o fluoróforo Cy5 e as sondas específicas para o ARN do vírus da gripe (A+B) estão marcadas com o fluoróforo FAM™, respetivamente. A sonda específica para o IC está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela da linhagem B-βCoV (gene E), do SARS-CoV-2 (gene S), dos vírus da gripe (A+B) e do IC nos canais de deteção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

6.1 Componentes

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contém reagentes suficientes para 384 reações. O produto consiste nos seguintes componentes:

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Contém material biológico de origem animal

²⁾ Positive Control (controlo positivo) [ARN específico da linhagem B-βCoV (gene E), do SARS-CoV-2 (gene S) e do vírus da gripe]

³⁾ No Template Control (controlo negativo)

À exceção da polimerase do ADN e da transcriptase reversa, que estão incluídas no FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, o componente Detection Mix contém todos os reagentes (tampão PCR, sais de magnésio, primers e sondas) para permitir a deteção e diferenciação do linhagem B-βCoV (gene E) e do SARS-CoV-2 (gene S) e a deteção do ARN específico do vírus da gripe (A+B), bem como do ARN específico do IC.

O PC contém ARN específico da linhagem B-βCoV (gene E) e do SARS-CoV-2 (gene S) bem como do vírus da gripe. Utiliza-se para verificar a funcionalidade dos sistemas de deteção e amplificação específicos da linhagem B-βCoV, do SARS-CoV-2 e dos vírus da gripe.

O NTC não contém ARN específico da linhagem B-βCoV, do SARS-CoV-2 nem do vírus da gripe (A+B), mas contém o modelo de IC. O NTC é utilizado como controlo negativo para a PCR em tempo real específica da linhagem B-βCoV (gene E), do SARS-CoV-2 (gene S) e do vírus da gripe (A+B) e indica a possível contaminação do componente Detection Mix.

6.2 Instrumentos PCR em tempo real

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi desenvolvido e validado para utilização com os seguintes instrumentos PCR em tempo real:

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

NOTA



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

6.3 Tipos de amostras

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi validado para utilização com o seguinte tipo de amostras:

- Amostra de esfregaço respiratório humano

ATENÇÃO



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

7. Material necessário mas não fornecido

Os instrumentos e consumíveis adicionais seguintes são necessários para a utilização do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, mas não são fornecidos com este produto:

- Instrumento PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.2 Instrumentos PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (consulte o capítulo 9.2 Preparação de amostras)
- Agitador vortex
- Centrifugadora (por ex. centrifugadora de bancada) para centrifugação de reagentes do kit
- Centrifugadora para centrifugação de PCR plates (placas PCR)
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (ótico) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)
- Luvas sem pó (descartáveis)

Reagentes necessários mas não incluídos no FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (N.º de encomenda FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (N.º de encomenda IC15-16/IC15-46)

8. Advertências, precauções e limitações

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto defeituoso ou incompleto, o desempenho do produto poderia ficar comprometido.
- Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.
- Não ultrapasse a sequência descongelar-congelar e a duração de manuseamento conforme especificado nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não utilize produtos para além da data de validade. A utilização de produtos expirados pode comprometer o desempenho do produto.
- Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.
- O manuseamento incorreto de componentes e amostras do produto poderá causar contaminação e pode comprometer o desempenho do produto:
 - Não troque tampas de frascos ou garrafas.
 - Armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
 - Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação da amostra/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.
 - Elimine sempre as luvas após manusear material positivo e/ou potencialmente positivo.
 - Não abra as PCR plates (placas PCR) e/ou tubos após a amplificação.
- Não misture componentes de lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 diferentes, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco (biológico), em conformidade com os procedimentos laboratoriais e de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.
- A presença de inibidores de PCR poderia causar resultados inválidos ou falsos negativos.

- A eliminação de resíduos perigosos e biológicos deve cumprir os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.
- O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação das sequências-alvo do linhagem B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/ou vírus da gripe, o que poderia comprometer o desempenho do produto.
- A falta de centrifugação dos componentes do produto após a descongelação poderá provocar contaminação com resíduos de reagentes nas tampas, o que poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não exceda o tempo de armazenamento da mistura PCR, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- No caso de a amostra conter outros agentes patogénicos que não o linhagem B-βCoV (gene E), o SARS-CoV-2 (gene S) e/ou o vírus da gripe, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames IVD incorretos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do linhagem B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/ou vírus da gripe abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.

9. Procedimento

ATENÇÃO

O manuseamento incorreto de componentes e amostras do produto poderá causar contaminação e pode comprometer o desempenho do produto:



- Não troque tampas de frascos ou garrafas.
- Armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação da amostra/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.
- Elimine sempre as luvas após manusear material positivo e/ou potencialmente positivo.
- Não abra as PCR plates (placas PCR) e/ou tubos após a amplificação.

ATENÇÃO



Não misture componentes de lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 diferentes, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

9.1 Recolha, manuseamento e armazenamento de amostras

Para a recolha de amostras, é necessário utilizar esfregaços que estão à venda no mercado com ponta de poliéster ou fibra dácron e com hastes de plástico. Os esfregaços secos têm de ser colocados em ressuspensão em meio de transporte universal (por ex., UTM® da Copan). Não devem ser utilizados esfregaços de alginato de cálcio, esfregaços com hastes de madeira e/ou pontas de algodão, nem esfregaços de colheitas em gelatina de ágar. O transporte deve ser realizado de acordo com as instruções locais e nacionais relativas ao transporte de materiais biológicos.

Antes da utilização, os esfregaços respiratórios colocados em ressuspensão em UTM® não devem ser armazenados durante mais de 48 horas à temperatura ambiente (+20 °C a + 25 °C), 5 dias a uma temperatura entre +2 °C e +8 °C ou 2 meses a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C.

ATENÇÃO



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

NOTA



O armazenamento congelado de amostras não compromete o desempenho do kit. Ao trabalhar com amostras congeladas, certifique-se de que as amostras estão totalmente descongeladas e devidamente misturadas antes da utilização.

NOTA



Não devem ser utilizados esfregaços de alginato de cálcio uma vez que a sua utilização pode dar origem a resultados incorretos ou inválidos devido à inibição da PCR.

NOTA



Não utilize esfregaços com hastes de madeira e/ou pontas de algodão nem esfregaços com gelatina de ágar como meio de transporte uma vez que os resíduos de madeira, algodão e/ou ágar podem interferir com a transferência de amostras no AltoStar® AM16 e as amostras não serão processadas.

9.2 Preparação de amostras

O ARN extraído é o material inicial para o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. A qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho do produto.

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi validado com amostras de esfregaços respiratórios humanos utilizando o AltoStar® AM16 em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Após a conclusão da extração de ácido nucleico utilizando o AltoStar® AM16, os eluatos na eluate plate (placa de eluato) não selada mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante 4 horas.

Os eluatos numa eluate plate (placa de eluato) selada podem ser armazenados a uma temperatura entre +2 e +8 °C até 24 horas antes do início da preparação de uma reação. Para obter informações detalhadas sobre a selagem de eluate plates (placas de eluato), consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Os seguintes kits e sistemas alternativos de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. No entanto, a adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 deve ser validada pelo utilizador.

ATENÇÃO



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

ATENÇÃO



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

ATENÇÃO



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

ATENÇÃO



A eliminação de resíduos perigosos e biológicos deve cumprir os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.

ATENÇÃO



O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação das sequências-alvo do linhagem B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/ou vírus da gripe, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 15. Apoio técnico).

9.3 Preparação da master mix

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

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 está configurado para ser utilizado com o FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 e o AltoStar® Internal Control 1.5, que permite controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e a subsequente RT-PCR.

- ▶ O IC é automaticamente adicionado no início do procedimento de purificação de ácido nucleico no AltoStar® AM16.
- ▶ Ao utilizar outros métodos para a extração de ácido nucleico, o IC tem de ser adicionado durante o passo de lise manualmente ou automaticamente pelo respetivo instrumento.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione o IC diretamente à amostra. O IC deve ser sempre adicionado à mistura de amostra/lysis buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 50 % do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 30 µl de IC por amostra à mistura de amostra/lysis buffer (tampão de lise).

- ▶ Prepare a master mix de acordo com o esquema de pipetagem seguinte:

Tabela 2: Esquema de pipetagem (preparação da master mix)

Número de reações (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
Volume da master mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO



A falta de centrifugação dos componentes do produto após a descongelação poderá provocar contaminação com resíduos de reagentes nas tampas, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

9.4 Preparação da reação

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

Tabela 3: Esquema de pipetagem (preparação da reação)

Preparação da reação	
Master mix	20 µl
Amostra ou controlo	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos 1 PC e 1 NTC por processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a master mix através de pipetagem para cima e para baixo.

- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação com as tampas adequadas.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação e os tubos de reação numa centrífuga apropriada durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~ 3 000 rpm).
- ▶ O NTC já contém o modelo de IC com a concentração correta.

Após a conclusão da configuração da mistura PCR, a mistura RT-PCR numa PCR plate (placa PCR) selada mantém-se estável à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante, no máximo, 30 minutos.

ATENÇÃO



Não exceda o tempo de armazenamento da mistura PCR, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

10. Programação do instrumento PCR em tempo real

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

Para obter instruções de programação detalhadas relativamente à utilização do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 em instrumentos PCR em tempo real específicos, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 15. Apoio técnico).

10.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Tabela 4: Definições de processamento

Definições	
Volume de reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência passiva	Nenhuma

10.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Tabela 5: Detetores de fluorescência

Alvo	Nome do detetor	Reporter	Quencher
ARN específico da linhagem B-βCoV	E gene	ROX™	(Nenhum)
ARN específico do SARS-CoV-2	S gene	Cy5	(Nenhum)
ARN específico do vírus da gripe (A+B)	Flu	FAM™	(Nenhum)
Internal Control (controlo interno)	IC	JOE™	(Nenhum)

10.3 Perfil de temperatura e aquisição de corante

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

Tabela 6: Perfil de temperatura e aquisição de corante

	Fase	Repetições do ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Transcrição reversa	Suspensão	1	-	52	05:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	00:05
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:05
			Sim	58	00:25

11. Análise de dados

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 em diferentes instrumentos PCR em tempo real, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 15. Apoio técnico).

11.1 Validade dos processamentos de teste de diagnóstico

11.1.1 Processamento de teste de diagnóstico válido

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

Tabela 7: Condições de controlo para um processamento de teste válido

ID do Controlo	Canal de deteção			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Positive Control (controlo positivo) [linhagem B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e vírus da gripe]	+	+	+	Não aplicável
Controlo negativo	-	-	-	+

11.1.2 Processamento de teste de diagnóstico inválido

Um processamento de teste de diagnóstico é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

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

11.2 Interpretação dos resultados

ATENÇÃO



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

11.2.1 Análise qualitativa

Tabela 8: Interpretação de resultados

Canal de detecção				Interpretação de resultados
ROX™ (gene E)	Cy5 (gene S)	FAM™ [gripe (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Detetado ARN específico da linhagem B-βCoV e do SARS-CoV-2.
+	-	-	+/-*	Detetado apenas ARN específico da linhagem B-βCoV.**
-	+	-	+/-*	Detetado apenas ARN específico do SARS-CoV-2.**
-	-	+	+/-*	Detetado apenas ARN do vírus da gripe (A e/ou B).
+	-	+	+/-*	Detetado ARN específico da linhagem B-βCoV e do vírus da gripe (A e/ou B).
-	+	+	+/-*	Detetado ARN específico do SARS-CoV-2 e do vírus da gripe (A e/ou B).
+	+	+	+/-*	Detetado ARN específico da linhagem B-βCoV, do SARS-CoV-2 e do vírus da gripe (A e/ou B).
-	-	-	+	Não foi detetado ARN específico da linhagem B-βCoV, nem do SARS-CoV-2 nem do vírus da gripe (A e/ou B). A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico da linhagem B-βCoV, do SARS-CoV-2 ou do vírus da gripe.
-	-	-	-	Inibição de RT-PCR ou falha do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a detecção do IC no canal de detecção JOE™ para resultados positivos no canal de detecção ROX™ e/ou Cy5 e/ou FAM™. Uma carga elevada de ARN da linhagem B-βCoV (gene E alvo) e/ou do SARS-CoV-2 (gene S alvo) e/ou da gripe (A+B) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de IC.

** A detecção em apenas um dos dois canais de detecção respetivos para a linhagem B-βCoV (gene E) e o SARS-CoV-2 (gene S) poderá dever-se a uma baixa concentração de ARN viral próxima do limite de detecção ou devido a mutação de uma das duas sequências alvo.

12. Avaliação do desempenho

O desempenho do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi avaliado segundo a Norma Internacional da OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146)», material do vírus da gripe A (influenza A H3N2, estirpe Wisconsin/67/05) e material do vírus da gripe B (estirpe Florida/04/06) comercialmente disponíveis.

12.1 Esfregaços respiratórios

12.1.1 Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite de detecção (LDD), foi gerada uma série de diluições da Norma Internacional da OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA», de material do vírus da gripe A (influenza A H3N2, estirpe Wisconsin/67/05) e material do vírus da gripe B (estirpe Florida/04/06) comercialmente disponíveis diluídos em meio de transporte universal (UTM®, Copan) contendo matriz nasal simulada [5 % p/v mucina, 5 % v/v sangue, 0,8 % v/v NaCl (95 % solução salina) e 0,00002 % p/v ADN genómico humano (510k Submissão para ensaio BD MAX™ MRSA XT; número de registo: K133605)].

Foi testada uma série de diluições da Norma Internacional da OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA» que variou entre 1,00E+04 UI/ml e 5,00E-01 UI/ml. Para o vírus da gripe A e o vírus da gripe B, foi testada uma série de diluições que variou entre 2,00E+03 cópias/ml e 1,00E+01 cópias/ml.

Cada diluição foi testada em 8 réplicas em 3 processamentos diferentes (total n = 24 por diluição) utilizando combinações de:

- 3 lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotes de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lotes do kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes do AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

Para cada vírus, os dados de todos os processamentos foram combinados e foi realizada uma análise de probit para determinar o valor do LDD de 95 %.

Tabela 9: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para o SARS-CoV-2 (gene S)

Concentração [UI/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

O LDD do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para a detecção de SARS-CoV-2 (gene S) no UTM® é de 201 UI/ml (intervalo de confiança de 95 %: 107–501 UI/ml).

Tabela 10: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para o SARS-CoV-2 (gene E)

Concentração [UI/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	2	8
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

O LDD do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para a detecção de SARS-CoV-2 (gene E) no UTM® é de 226 UI/ml (intervalo de confiança de 95 %: 124–545 UI/ml).

Tabela 11: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para o vírus da gripe A

Concentração [cópias/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	23	96
2,50E+02	24	22	92
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	9	38
2,50E+01	24	6	25
1,00E+01	24	1	4

O LDD do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para a detecção do vírus da gripe A no UTM® é de 341 cópias/ml (intervalo de confiança de 95 %: 230–611 cópias/ml).

Tabela 12: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para o vírus da gripe B

Concentração [cópias/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	19	79
1,00E+02	24	3	13
5,00E+01	24	6	25
2,50E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4

O LDD do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para a detecção do vírus da gripe B no UTM® é de 432 cópias/ml (intervalo de confiança de 95 %: 286–780 cópias/ml).

12.1.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados por análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos do SARS-CoV-2 e do vírus da gripe relevantes serão detetados.

Para verificação da especificidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, foram realizados os seguintes ensaios (consulte os capítulos 12.1.2.1 Amostras negativas a 12.1.2.3 Reatividade cruzada).

12.1.2.1 Amostras negativas

Foram testadas 30 amostras de esfregaços respiratórios negativos de SARS-CoV-2, do vírus da gripe A e do vírus da gripe B de doadores individuais com o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Todas as amostras testadas (30 de 30) apresentaram resultados negativos para o ARN específico do SARS-CoV-2, do vírus da gripe A e do vírus da gripe B e positivos para o IC. A especificidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para amostras de esfregaços respiratórios é $\geq 95\%$.

12.1.2.2 Substâncias interferentes

Para avaliar a influência de substâncias endógenas e exógenas potencialmente interferentes no desempenho do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, foram fortificadas substâncias selecionadas em UTM® contendo SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B numa concentração final de 3 x LDD (6,03E+02 UI/ml, 1,02E+03 cópias/ml e 1,29E+03 cópias/ml, respectivamente) e em UTM® não contendo SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B.

Os resultados obtidos de amostras com substâncias potencialmente interferentes foram comparados com os resultados gerados de UTM® sem interferente adicionado. Cada amostra foi processada em 3 réplicas.

Não foi observada qualquer interferência para as amostras contendo níveis elevados de:

- Substâncias endógenas
 - ADN genómico humano
 - Sangue total humano
 - Mucina
- Substâncias exógenas
 - Spray nasal antialérgico (contendo dipropionato de beclometasona)
 - Spray nasal descongestionante (contendo cloridrato de xilometazolina e dexpanthenol)
 - Mupirocina
 - Zanamivir

ATENÇÃO



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

12.1.2.3 Reatividade cruzada

A especificidade analítica do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogénicos que não o SARS-CoV-2, o vírus da gripe A e o vírus da gripe B foi avaliada testando:

- Agentes patogénicos relacionados com o SARS-CoV-2 e os vírus da gripe
- Agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes a uma infeção com SARS-CoV-2 ou vírus da gripe

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogénicos:

- Adenovírus
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterovírus
- *Haemophilus influenzae*
- Coronavírus humano 229E
- Coronavírus humano NL63
- Coronavírus humano OC43
- Metapneumovírus humano (hMPV)
- *Legionella pneumophila*
- MERS-coronavírus
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Vírus Parainfluenza 1-4
- *Pneumocystis jirovecii*
- Vírus sincicial respiratório A
- Vírus sincicial respiratório B
- Rinovírus
- *Streptococcus pneumoniae*

ATENÇÃO

No caso de a amostra conter outros agentes patogênicos que não a linhagem B-βCoV (gene E), o SARS-CoV-2 (gene S) e/ou o vírus da gripe, poderá ocorrer concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames IVD incorretos.

12.1.3 Inclusividade

A especificidade do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 no que respeita à detecção de diferentes variantes do SARS-CoV-2 e diferentes estirpes de vírus da gripe é garantida, sobretudo, pela seleção dos primers e sondas. Para comprovar que o FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 permite a detecção de diferentes variantes do SARS-CoV-2 e diferentes estirpes de vírus da gripe, foram testadas as seguintes variantes/estirpes (consulte as tabelas 13 e 15).

Tabela 13: Linhagens de SARS-CoV-2 testadas

Variante (linhagem)	Canal ROX™ (gene E)	Canal Cy5 (gene S)	Canal VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (tipo selvagem)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (tipo selvagem)	+	+	+
Alfa (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gama (P.1)	+	+	+

Tabela 14: Inclusividade [análise *in silico* para 2 993 884 sequências de genoma inteiro do SARS-CoV-2 publicadas através da GISAID e.V. (www.gisaid.org) em 10 de outubro de 2021 e 518 615 sequências de genoma inteiro publicadas através do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) em 10 de outubro de 2021 para o alvo do gene E e do gene S: FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5]

3 512 499 sequências de genoma inteiro		Sequências que apresentam 100 % de homologia	Sequências que apresentam mismatches (número de mismatches)
Gene E	Primer forward	3 505 942	6 549 (1) 8 (2)
	Primer reverse	3 509 461	3 032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonda	3 510 308	2 183 (1) 4 (2)
Gene S	Primer forward	3 491 594	20 728 (1) 160 (2)
	Primer reverse	3 490 361	22 061 (1) 77 (2)
	Sonda	3 498 798	13 653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

* A sequência (registo ID EPI_ISL_415593, GISAID) apresentou 4 mismatches no local de ligação da sonda do gene S. Esta sequência foi publicada a 10 de março de 2020 com origem em Washington, EUA. Desde então, nenhuma das sequências publicadas apresentou novamente esse número de mismatches. A sequência foi comentada pelos autores, "Atenção. Sequências de NNN (1,74 % da sequência geral)", indicando que a qualidade da sequenciação não era ideal, pelo que o impacto nos oligonucleotídeos específicos do gene S não foi investigado.

**A sequência (registo MW584978.1) apresentou 3 mismatches no local de ligação do primer reverse do gene E. Esta amostra foi colhida a 3 de abril de 2020 e publicada em fevereiro de 2021 com origem em Cleveland, EUA. Desde então, nenhuma das sequências publicadas apresentou novamente esse número de mismatches.

Dependendo da posição, é pouco provável que eventos de mutação conducentes a ≤ 2 mismatches numa única sequência de oligonucleotídeos tenham qualquer efeito negativo significativo no desempenho do ensaio. Todas essas sequências (≤ 2 mismatches) testadas em ensaios laboratoriais molhados no caso das atividades de vigilância pós-introdução no mercado relativas aos kits RealStar®, FlexStar® e AltoStar® para detecção de SARS-CoV-2 confirmaram, até agora, que o desempenho não foi afetado por essas mutações. À exceção de uma única sequência, nenhuma das outras sequências analisadas apresentou mismatches em mais de um oligonucleotídeo e nenhuma das sequências desemparelhadas apresentou mismatches com ambos os sistemas de detecção específicos (gene E e gene S), pelo que não se prevê que a reatividade dos oligonucleotídeos específicos incluídos nos kits RealStar®, FlexStar® e AltoStar® para detecção de SARS-CoV-2 seja afetada.

Tabela 15: Estirpes do vírus da gripe A e do vírus da gripe B testadas

Subtipo/estirpe	Canal FAM™ (vírus da gripe A e B)	Canal VIC™ (IC)
Vírus da gripe A, subtipo H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Vírus da gripe A, subtipo H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Vírus da gripe A, variante da derivação do subtipo A/H3N2 (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Vírus da gripe A, subtipo H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Vírus da gripe B (B/Colorado/6/2017, B-Victoria lineage)	+	+
Vírus da gripe B (B/Phuket/3073/2013, B/Yamagata 16/88 lineage)	+	+

12.1.4 Precisão

A precisão do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi avaliada utilizando um painel constituído por:

- 1 amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 [50 x LDD (1,00E+04 UI/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra altamente positiva do vírus da gripe A [50 x LDD (1,70E+04 cópias/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra altamente positiva do vírus da gripe B [50 x LDD (2,16E+04 cópias/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra fracamente positiva de SARS-CoV-2 [3 x LDD (6,03E+02 UI/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra fracamente positiva do vírus da gripe A [3 x LDD (1,02E+03 cópias/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra fracamente positiva do vírus da gripe B [3 x LDD (1,29E+03 cópias/ml)] em UTM® contendo matriz nasal simulada
- 1 amostra negativa de SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B (UTM® contendo matriz nasal simulada)

Cada componente do painel foi testado em pelo menos 6 réplicas por processamento.

Foram realizados 5 processamentos em 5 dias diferentes utilizando combinações de:

- 3 lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotes de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lotes do kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes do AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

A repetibilidade (variabilidade intraprocessamento), a variabilidade entre lotes e a reprodutibilidade (variabilidade total) foram determinadas com base em:

- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para amostras altamente positivas de SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B (consulte as tabelas 16 e 17)
- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para o IC nas amostras negativas de SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B (consulte a tabela 18)

* Tenha em atenção que o termo C_q escolhido é equivalente à designação de C_t , que podia ser utilizada por outros cicladores que não o CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tabela 16: Dados de precisão (CV % valores C_q) para amostras altamente positivas de SARS-CoV-2

	Amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 (C_q no canal ROX™, gene E alvo)	Amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 (C_q no canal Cy5, gene S alvo)
Variabilidade intraprocessamento	0,21–0,42	0,44–0,60
Variabilidade entre lotes	0,59	0,52
Variabilidade total	0,89	0,63

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

Tabela 17: Dados de precisão (CV % valores C_q) para amostras altamente positivas para o vírus da gripe A e vírus da gripe B

	Amostra altamente positiva do vírus da gripe A (C_q no canal FAM™)	Amostra altamente positiva do vírus da gripe B (C_q no canal FAM™)
Variabilidade intraprocessamento	0,93–1,16	0,52–1,48
Variabilidade entre lotes	1,02	1,02
Variabilidade total	1,48	1,69

Todas as amostras testadas a 3 x LDD (amostras fracamente positivas) foram detetadas como positivas para o vírus da gripe A e o vírus da gripe B.

Tabela 18: Dados de precisão (CV % valores C_q) para o IC nas amostras negativas para o SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B

	IC
Variabilidade intraprocessamento	0,23–0,35
Variabilidade entre lotes	0,38
Variabilidade total	0,74

12.1.5 Taxa de insucesso total

A solidez do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi avaliada através do teste de 30 amostras de esfregaços respiratórios humanos negativas de SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B de doadores individuais, fortificadas com SARS-CoV-2, vírus da gripe A e vírus da gripe B para uma concentração final de 3 x LDD (6,03E+02 UI/ml de SARS-CoV-2, 1,02E+03 cópias/ml de vírus da gripe A e 1,29E+03 cópias/ml de vírus da gripe B). Todas as amostras testadas (30 de 30) apresentaram resultados positivos nos canais de detecção por fluorescência (Cy5 e ROX™) específicos do SARS-CoV-2 e no canal de detecção por fluorescência (FAM™) específico do vírus da gripe A e do vírus da gripe B.

12.1.6 Transferência

A transferência é essencialmente um risco dependente da ordem das tarefas e independente do ensaio PCR utilizado. Para a AltoStar® Workflow, utilizou-se o kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 como modelo exemplar. A potencial contaminação cruzada através de transferência de amostras altamente positivas foi avaliada testando alternativamente amostras altamente positivas do parvovírus B19 (1,00E+07 UI/ml) e amostras negativas (n = 44 cada por processamento; 2 processamentos) com o kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Não foi observada transferência, ou seja, todas as amostras negativas do parvovírus B19 tiveram um resultado negativo.

12.1.7 Desempenho clínico

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi avaliado num estudo comparativo com o *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) com marcação CE. Retrospectivamente, foram testadas em paralelo 165 amostras de esfregaços respiratórios humanos individuais.

O *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) foi usado combinado com o MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) e o MagNA Pure 96 Extraction System (Roche).

O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 foi utilizado em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o AltoStar® Internal Control 1.5 no AltoStar® AM16 e no CFX96™ DW Dx.

Para a análise qualitativa, foram excluídas todas as amostras com um resultado inválido para um ou ambos os ensaios.

Os resultados para as restantes amostras (164 para o SARS-CoV-2 e 152 para o vírus da gripe) são apresentados nas tabelas 19 e 20, respetivamente.

Tabela 19: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do SARS-CoV-2 em esfregaços respiratórios

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	58	1
	NEGATIVO	0	105

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 em comparação com o *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) foi de 100 % (intervalo de confiança 93,8 %–100 %) e 99,1 % (intervalo de confiança 94,9 %–100 %), respetivamente.

Tabela 20: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico para o vírus da gripe em esfregaços respiratórios

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	37	1
	NEGATIVO	0	114

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 em comparação com o *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) foi de 100 % (intervalo de confiança 90,1 %–100 %) e 95,3 % (intervalo de confiança 95,3 %–100 %), respetivamente.

13. Eliminação

Elimine os resíduos perigosos e biológicos em conformidade com os regulamentos nacionais e locais. Os resíduos e os componentes excedentes não devem entrar em contacto com redes de esgoto, cursos de água ou o solo.

ATENÇÃO



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

ATENÇÃO



A eliminação de resíduos perigosos e biológicos deve cumprir os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.

14. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade da Altona Diagnostics GmbH certificado pela EN ISO 13485, cada lote de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

15. Apoio técnico

Para apoio ao cliente, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics:

e-mail: support@altona-diagnostics.com

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

NOTA



Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação a este produto deve ser comunicado à Altona Diagnostics e à autoridade competente do seu país.

16. Bibliografia

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10ª edição. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terceira edição. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, acessado em 24 de Março de 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006). "Influenza Virology: Current Topics". Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, acessado em 24 de Março de 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). "The biology of influenza viruses". Vaccine. Vol.26, Suppl. 4:D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID 19230160.
- [6] Richard M, Fouchier RAM (2016) "Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential". FEMS Microbiology Reviews. Vol.40, Issue 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] Organização Mundial da Saúde (OMS). Fact sheets - "Influenza (Seasonal)". 18th November 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), acessado em 24 de Março de 2020.

17. Marcas comerciais e isenções de responsabilidade

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); CFX96™ (Bio-Rad); UTM® (Copan); Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

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
















O FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.




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

Não disponível em todos os países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

18. Explicação de símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de item de comércio internacional
	Código do lote
	Conteúdo
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Número
	Componente
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Número de material

Símbolo	Explicação
	Versão
	Nota
	Contém material biológico de origem animal

19. Histórico de revisões

Tabela 21: Histórico de revisões

Identificador	Data de emissão [mês/ano]	Modificações
MAN-FS0021510-PT-S01	02/2022	Lançamento inicial

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

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

www.altona-diagnostics.com

