



WGene SARS-CoV-2

RT Detection

Método para a detecção de sequências de RNA do vírus SARS-CoV-2 por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SIGNIFICADO CLÍNICO

Coronavírus é um vírus de RNA monocatenário de sentido positivo que pode causar uma variedade de doenças agudas e crônicas em animais domésticos, animais de estimação e humanos.

No final de 2019, um novo coronavírus foi identificado em casos de pneumonia viral em Wuhan, China. Este novo vírus foi denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como SARS-CoV-2. A doença causada pelo SARS-CoV-2 é chamada COVID-19, que varia de formas leves com poucos ou nenhum sintoma a quadros com pneumonia e morte nos casos mais graves. Os sintomas mais comuns são febre, tosse, dor de garganta, perda do olfato (anosmia) e do paladar (disgeusia), falta de ar e dispneia.

O RNA do SARS-CoV-2 é geralmente detectado em amostras do trato respiratório superior (Swab nasofaríngeo ou orofaríngeo, saliva, etc.) durante a fase aguda da infecção. Os resultados positivos são indicativos da presença de RNA do SARS-CoV-2. Recomenda-se avaliar a correlação clínica com a história do paciente e outros parâmetros de diagnóstico que ajudam a determinar o estado de infecção do paciente.

Os resultados positivos não excluem a coinfeção bacteriana ou a coinfeção com outros vírus. Os resultados negativos não excluem a infecção por SARS-CoV-2 e não devem ser usados como base única para as decisões de tratamento do paciente. Os resultados negativos devem ser combinados com observações clínicas, história do paciente e informações epidemiológicas.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

O **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** é um ensaio in vitro que compreende a transcrição reversa de sequências específicas de RNA viral, seguida pela amplificação por PCR em tempo real de uma etapa (one step RT-qPCR). Este ensaio para a detecção qualitativa de sequências do genoma viral é realizado a partir de amostras biológicas de origem respiratória (swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos) de indivíduos com suspeita de COVID-19.

O kit detecta dois dos genes virais com maior relevância diagnóstica: RdRp (correspondente ao RNA polimerase viral dependente de RNA) e N (correspondente ao nucleocapsídeo).

O procedimento completo consiste na purificação do RNA viral da amostra biológica, que é então utilizado na etapa de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real de uma etapa com sondas do tipo TaqMan®.

O RNA do SARS-CoV-2 é transcrito em DNAc (DNA cópia) pela enzima transcriptase reversa, que é usada como um modelo para a amplificação por PCR por uma enzima polimerase de Hot Start DNA. Durante a reação de PCR, a atividade de exonuclease da enzima causa a degradação da sonda do tipo TaqMan®, separando o fluoróforo do quencher. O aumento no sinal de fluorescência resultante do acúmulo do DNA templado é detectado pelo instrumento de PCR em tempo real: canal FAM para detecção conjunta de genes RdRp e N, e canal YAK (Yakima Yellow ou VIC/JOE/HEX) para a detecção do gene RNase P como controle interno endógeno. Esse controle endógeno garante a presença de ácidos nucleicos na amostra clínica e a ausência de inibidores na reação de amplificação.

Também é necessário incluir um Controle Negativo de reação (CN) para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes. Para isso, água livre de nuclease (reagente RNase/DNase-free H₂O) é usada como amostra. Em caso de resultado positivo para este controle, o teste deve ser repetido, buscando previamente as possíveis fontes de contaminação e as eliminando.

REAGENTES FORNECIDOS

PC SARS-CoV-2/IC: Controle positivo que consiste em sequências de DNA específicas de SARS-CoV-2. Também inclui DNA de um controle interno endógeno (IC). Apresentação: seco, incolor x 0,5 ml com tampa vermelha.

SARS-CoV-2 RT Mix (40x): mistura de reação para a transcrição reversa de RNA viral e do IC. Contém: tampão de reação, DTT 100 mM, inibidores de RNase 40 U/μl, Transcriptase reversa, água tratada com DEPC, estabilizantes e conservantes. Apresentação: líquido, tubo incolor x 0,5 ml com tampa âmbar.

Master Mix SARS-CoV-2 (5x): mistura de reação para a amplificação/detecção do DNAc resultante da transcrição reversa. Contém: tampão de reação, KCl 250 mM, dNTPs 1 mM, Hot Start DNA polimerase, MgCl₂ 15 mM, agentes redutores, estabilizantes e conservantes. Apresentação: líquido, tubo incolor x 0,5 ml com tampa azul.

Oligo Mix SARS-CoV-2: mistura de oligonucleotídeos e sondas para a amplificação específica de sequências SARS-CoV-2 e IC. Apresentação: tubo de base cônica, seco x 1,5 ml.

RNase/DNase-free H₂O: água livre de nuclease. Apresentação: líquido, tubo incolor x 2 ml com tampa incolor.

REAGENTES E EQUIPAMENTOS NÃO FORNECIDOS

- Sistema comercial de purificação de RNA (utilizando colunas de sílica ou partículas magnéticas).
Observação: embora o **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** tenha sido validado com os produtos listados abaixo, outros sistemas comerciais semelhantes podem ser usados.
 - Kit MagnaPure Compact Nucleid Acid Isolation (Roche, Cat. 03 730 964 001).
 - Kit High Pure Viral Nucleid Acid Kit (Roche, Cat. 11 858 874 001).
 - Kit EasyPure Viral DNA/RNA kit (TransGen Biotech, Cat. TGB-ER20102).
- Micropipetas de volume variável;
- Ponteiras com filtro livre de nuclease;
- Tubos de microcentrífuga (x 1,5 ou 2 ml), sem nuclease;
- Suporte para tubos de 1,5 ml ou 2 ml
- Luvas descartáveis de látex, vinil ou nitrila sem pó
- Suporte de reação de acordo com o instrumento de PCR em tempo real usado (por exemplo, microplacas com filmes óticos, tubos qPCR, etc.)
- Termociclador ou instrumento de PCR em tempo real: podem ser utilizadas diferentes marcas comerciais, desde que disponham de canal de detecção de fluorescência para FAM e YAK/JOE/VIC.
Nota: este produto foi validado nos seguintes termocicladores:
 - QuantStudio[®] 3 (Applied Biosystems).
 - StepOne Plus[®] (Applied Biosystems).
 - Applied Biosystems 7500[®] (Applied Biosystems).
 - CFX96[®] (Biorad).
 - Rotor Gene Q[®] (Qiagen).
 - Light Cycler 480[®] (Roche).
 - Mic[®] qPCR Thermal Cycler - 4 (Sistemas Biomoleculares).
 - Mastercycler[®] RealPlex (Eppendorf).
- Agitador Vortex;
- Microcentrífuga de mesa com rotor para tubos de 1,5 a 2 ml;
- Recipiente para descarte de material biológico e,
- Equipamento de proteção pessoal.

PRECAUÇÕES

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Leia atentamente as instruções de uso antes de realizar o teste.
- Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes devem ser completamente descongelados (uma vez reconstituídos), homogeneizar e centrifugar brevemente antes de iniciar o teste. Recomenda-se, então, mantê-los refrigerados, principalmente as misturas de transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos, que devem ser homogeneizadas suavemente, evitando a formação de espuma.
- Não use os reagentes após o prazo de validade.
- Não misture reagentes de lotes diferentes nem modifique os procedimentos de teste.
- Não use reagentes de origem diferente dos indicados.
- Todos os reagentes e amostras devem ser descartados de acordo com a legislação local vigente.
- Evitar que os componentes sofram contaminação microbiana ou com nuclease quando forem introduzidos elementos neles.
- Caso o sistema de purificação de RNA a ser utilizado contiver soluções de lavagem com etanol, garantir a eliminação de possíveis vestígios antes de eluir o RNA, pois ele inibe a reação qPCR.
- É imprescindível para a utilização deste produto, possuir conhecimentos básicos no manuseio de técnicas moleculares de diagnóstico. Devido a alta sensibilidade da tecnologia de amplificação, é necessário respeitar os padrões de trabalho indicados para este tipo de análise (áreas de processamento de amostras, pré e pós amplificação, fluxo de trabalho, utilização de material adequado, etc.).

ESTABILIDADE, TRANSPORTE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O kit pode ser transportado refrigerado (2-10°C). Depois de recebido, armazene o kit completo a -20°C até a data de vencimento indicada na embalagem.

Uma vez que os reagentes liofilizados tenham sido ressuspensos, armazene-os também a -20°C.

Evite ciclos repetidos de congelamento/descongelamento dos reagentes (não mais do que três ciclos), pois eles podem causar perda de reatividade.

Se os reagentes não forem usados regularmente, é aconselhável dividi-los em alíquotas e colocá-los a -20°C, levando em consideração o uso de material livre de nuclease e que o reagente Oligo Mix SARS-CoV-2 contém sondas que requerem proteção contra a luz.

AMOSTRA

RNA purificado a partir de swab nasofaríngeo ou orofaríngeo

a) Coleta e transporte da amostra respiratória:

As amostras devem ser coletadas e transportadas de acordo com as recomendações das autoridades sanitárias locais.

b) Purificação de RNA:

O RNA é purificado de acordo com os requisitos e instruções do fabricante do kit de extração de RNA utilizado, que deve ser compatível com a metodologia qPCR, garantindo uma alta qualidade do RNA purificado.

O procedimento deve ser realizado em condições seguras e adequadas para o manuseio de material infeccioso (de acordo com o documento do NCCLS M29 - Proteção dos Trabalhadores de Laboratório contra Infecções Adquiridas no Trabalho).

c) Estabilidade do RNA e instruções de armazenamento:

Os ensaios moleculares são particularmente sensíveis às condições pré-analíticas subótimas, portanto, a qualidade da amostra a ser usada é essencial.

O RNA purificado deve ser mantido em banho de gelo e/ou bloco frio até o momento do uso. Caso seja necessário mantê-lo por um período mais longo, deve ser armazenado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Se necessário, para evitar mais de um ciclo de congelamento/descongelamento, recomenda-se aliquotar.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COMPLETO

1- Extração de RNA (ver AMOSTRA)

2- Reconstituição de reagentes liofilizados

Faça uma breve centrifugação dos mesmos para evitar perdas na abertura dos tubos.

Na área de pré-amplificação:

Reconstitua o reagente Oligo Mix SARS-CoV-2 usando 110 μl de reagente RNase/DNase-free H_2O . Homogeneizar com vortex por 30 segundos, deixar 5 minutos em temperatura ambiente, homogeneizar novamente e fazer uma breve centrifugação antes de usar. Mantenha o reagente reconstituído refrigerado (em gelo ou bloco frio) durante o uso.

Armazene o reagente reconstituído a -20°C após o uso.

Na área de amplificação:

Reconstitua o reagente PC SARS-CoV-2/IC usando 500 μl de reagente RNase/DNase-free H_2O . Homogeneizar com vortex por 30 segundos, deixar 5 minutos em temperatura ambiente, homogeneizar novamente e fazer uma breve centrifugação antes de usar.

3- Preparação da mistura de reação

Na área de pré-amplificação:

Descongele os reagentes completamente e misture.

Os reagentes RT Mix SARS-CoV-2 (40x) e Master Mix SARS-CoV-2 (5x), devem ser misturados suavemente evitando a formação de espuma e colocados imediatamente no frio (gelo ou bloco frio), uma vez descongelados.

Faça uma breve centrifugação dos mesmos para evitar perdas na abertura dos tubos.

Prepare a mistura de reação seguindo as proporções indicadas na tabela, levando em consideração o número de reações a serem realizadas no teste.

Reagente	Volume por reação (μl)	Volume por n reações (μl)
RT Mix SARS-CoV-2 (40x)	0,5	
Master Mix SARS-CoV-2 (5x)	4	
Oligo Mix SARS-CoV-2	1	
RNase/DNase-free H_2O	9,5	

n = No de amostras clínicas para analisar + PC SARS-CoV-2/IC (duplicado) + NC (Controle Negativo) + 10%.

Dispense 15 μl da mistura de reação em cada tubo/poço de reação.

Adicione 5 μl da amostra clínica ou controles aos tubos/poços de reação correspondentes, da seguinte forma:

- Amostras para analisar: 5 μl do RNA purificado correspondente a cada amostra;

- NC: 5 μl de reagente RNase/DNase H_2O -free;

- PC: 5 μl de reagente PC SARS-CoV-2/IC

O volume final da reação é de 20 μl .

Recomenda-se a todo o momento o manuseio das amostras na área designada para este fim e o PC na área de amplificação, para evitar contaminação do restante dos reagentes.

Feche os tubos/poços de reação e inicie a reação no termociclador.

4- Programação do termociclador

É necessário ter informações básicas sobre o manuseio e a programação do termociclador a ser utilizado, motivo pelo qual se recomendamos consultar o manual do instrumento correspondente.

As condições gerais para realizar a reação qPCR são as seguintes:

Condições gerais	
Programa	Quantificação absoluta
Volume de reação	20 µl
Corante de referência passivo*	Não contém
Tipo de enzima (Taq)	Standard
Tipo de química	Sonda de hidrólises

*Apenas em equipamentos que usam corantes passivos (Applied Biosystems® 7500, StepOne™, StepOnePlus™, QuantStudio™, etc.)

Detectores de fluorescência	
Deteção	Fluoróforo (absorção/emissão)
SARS-CoV-2	FAM (492 nm / 516 nm)
IC	YAK* (530 nm / 550 nm)

*O espectro de absorção/emissão é semelhante ao JOE/VIC

Programa de amplificação e deteção				
Etap	Temperatura	Tempo (min:seg)	Ciclos	Aquisição
Transcrição reversa	50°C	10:00	1	
Desnaturação/ Ativação Taq	95°C	10:00	1	-
Amplificação	95°C	0:15	45	Sim*
	58°C	0:30		

*Os dados de fluorescência devem ser registrados durante a etapa de extensão (58°C).

5- Análise dos resultados

É importante ter informações básicas sobre o procedimento de análise de dados do termociclador usado na reação qPCR, portanto, é recomendável consultar o manual do instrumento.

Para analisar as curvas de amplificação, é necessário definir corretamente os seguintes parâmetros: linha de base (baseline) e valor do limiar de fluorescência (threshold). Esses parâmetros podem ser selecionados automaticamente pelo programa, de acordo com o algoritmo utilizado, ou manualmente.

Ambos os parâmetros influenciam na determinação do valor Ct (ciclo que excede o valor do limiar de fluorescência) para cada amostra.

- A linha de base deve incluir ciclos de PCR em que o sinal de fluorescência está abaixo dos limites de deteção do instrumento (normalmente uma faixa de valores de Ct de 3 a 15).
- O valor do limiar de fluorescência deve ser definido na fase exponencial das curvas de amplificação das amostras positivas para os templates em análise. Geralmente, é em torno de 10% em relação à fluorescência máxima do platô geral das curvas de amplificação.

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DE ENSAIO

Uma vez que os parâmetros acima tenham sido definidos, o teste é considerado válido se as seguintes condições forem atendidas simultaneamente:

Controle	Detecção em FAMTM (Ct)	Detecção em YAKTM (Ct)
PC	≤ 32	≤ 32
NC	> 40	> 35*

* Eventualmente, sinais inespecíficos podem ser observados no NC no canal YAK, que não tem uma forma sigmoide e geralmente aparecem em Ct > 35.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA AMOSTRAS CLÍNICAS

- Uma **amostra detectável para SARS-CoV-2** é considerada quando, no canal de fluorescência FAM, é observada uma curva de amplificação que ultrapassa o limiar, originando um valor de Ct ≤ 40.
 - Uma **amostra não detectável para SARS-CoV-2** é considerada quando, no canal de fluorescência FAM, a curva de fluorescência não cruza o limiar dando lugar à ausência de Ct ou o cruza com um valor superior a 40.
 - As amostras também devem detectar o IC, apresentando uma curva de amplificação no canal YAK que cruza o limiar de fluorescência com um Ct ≤ 35. No entanto, pode ocorrer para amostras detectáveis para SARS-CoV-2 (canal FAM), que seja inibida a amplificação do IC (não detectável no canal YAK), não invalidando o resultado (ver nota 1 na tabela abaixo).
- No caso de uma amostra de interpretação duvidosa ou inválida, é recomendável repetir o ensaio de uma nova purificação de RNA ou coletar uma nova amostra respiratória do paciente.

Amostra	Detecção em FAM	Detecção em YAK	Interpretação do resultado
A	Detectável (Ct ≤ 40)	Detectável (Ct ≤ 35) / Não Detectável (Ct > 35) ¹	Presença de RNA de SARS-Cov-2
B	Não Detectável (Ct > 40)	Detectável (Ct ≤ 35)	Ausência de RNA de SARS-Cov-2
C	Não Detectável (Ct > 40)	Não Detectável (Ct > 35)	Inválido ²

¹ A detecção do IC no canal YAK (detectável YAK) não é necessária para resultados detectáveis no canal FAM

² Inibição de qPCR, problema com a purificação de RNA e/ou coleta de amostra clínica.

LIMITAÇÕES DO ENSAIO

- Qualquer resultado diagnóstico obtido com este kit deve ser interpretado em conjunto com outras descobertas clínicas e/ou laboratoriais.
- Os resultados negativos não excluem a infecção por SARS-CoV-2 e não devem ser a única base para a decisão de tratamento do paciente.
- Um resultado positivo indica a detecção do ácido nucleico SARS-CoV-2.
- Podem surgir resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada de SARS-CoV-2, seja de amostras contendo altas concentrações de RNA viral ou contaminação devido a produtos de PCR de reações anteriores.
- Os resultados falsos negativos podem ser devidos a: coleta inadequada de amostras; degradação do RNA viral durante o transporte/armazenamento; a presença de inibidores de qPCR, etc.

ESPECIFICAÇÕES DO TESTE

1- Sensibilidade Analítica - Limite de Detecção (LOD)

A sensibilidade analítica foi determinada avaliando amostras de diferentes concentrações de SARS em octuplicada, repetindo o esquema por 4 dias (32 dados para cada concentração). As amostras foram preparadas a partir de um RNA viral completo de SARS-CoV-2 quantificado (AMPLIRUN® CORONAVIRUS SARS-CoV-2 RNA CONTROL, Vircell, Ref. MBC137-R) em um pool de amostras de swab orofaríngeo negativo para SARS. CoV-2. Um resumo dos resultados positivos obtidos são os seguintes:

Controles SARS-CoV-2 (cópias/reacção)	Nº de positivos					% de positivos
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	TOTAL	
50	8	8	8	8	32	100
25	8	8	8	8	32	100
10	8	8	8	8	32	100
5	4	2	6	5	17	53,13
2,5	3	1	0	2	6	18,75
1	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0

Com os dados acima, uma análise de regressão Probit foi realizada. O **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** apresentou um LOD de 9,6 cópias/reacção para um IC95%.

2- Especificidade Analítica

Análise *in silico*

A análise *in silico* foi realizada comparando as sequências dos oligonucleotídeos/sondas utilizadas no **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** com as sequências de ácido nucleico de microrganismos filogeneticamente relacionados e/ou que podem estar presentes na amostra clínica. A reatividade cruzada foi definida como a presença de identidade de nucleotídeos superior a 80% entre os oligonucleotídeos e qualquer sequência presente no microrganismo alvo. Após esta análise, nenhuma reatividade cruzada foi encontrada com outras espécies além do SARS-CoV-2, exceto com a sequência do vírus SARS-CoV-1. Identificou-se que os oligonucleotídeos do gene RdRp apresentavam uma identidade maior que 80%, tendo a sonda uma identidade de 88%. Com base nesta análise, não pode ser descartado que este vírus seja amplificado e detectado por **WGene SARS-CoV-2 RT Detection**. No entanto, o vírus SARS-CoV não foi detectado na população humana desde 2004 (<https://www.cdc.gov/sars/index.html>).

A tabela a seguir lista os patógenos incluídos na análise de especificidade analítica *in silico*.

Microorganismo	Número de acesso GenBank
Human coronavirus 229E	NC_002645.1
Human coronavirus HKU1	NC_006577.2
Human Coronavirus NL63	NC_005831.2
Human coronavirus OC43 strain ATCC VR-759	NC_006213.1
Middle East respiratory syndrome coronavirus	NC_019843.3
SARS coronavirus	NC_004718.3
Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008	NC_014470.1
Human adenovirus type 1	AC_000017.1
Human parainfluenza virus 1 isolate NM001	KX639498.1
Human parainfluenza virus 2 isolate VIROAF10	KM190939.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/AUS/3/2007	KF530243.1
Respiratory syncytial virus strain B/WI/629-Q0190/10	JN032120.1
Human enterovirus D	NC_001430.1
Human rhinovirus 14	NC_001490.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapi-ens/PER/FPP00726/2011/A	KJ627437.1
Influenza A virus (A/New York/PV305/2017(H1N1))	MH798556.1
Influenza B virus (B/Nicaragua/8689_13/2017)	MK969560.1
Bordetella pertussis strain B3921	CP011448.1
Candida albicans strain L757 mitochondrion	NC_018046.1
Haemophilus influenzae PittGG	CP000672.1
Legionella pneumophila strain Philadelphia_1_CDC chromo-some	CP015928.1
Mycobacterium tuberculosis DNA strain: HN-506	AP018036.1
Mycoplasma pneumoniae strain 14-637 chromosome	CP039772.1
Pneumocystis jirovecii isolate SW7_full mitochondrion	MH010446.1
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14	CP000438.1

Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325 chromosome	NC_007795.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	NC_004461.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-01	NC_005008.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-02	NC_005007.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-03	NC_005006.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-04	NC_005005.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-05	NC_005004.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-06	NC_005003.1
Streptococcus pneumoniae strain D39V chromosome	CP027540.1
Streptococcus pyogenes MGAS8232	AE009949.1
Streptococcus salivarius strain FDAARGOS_259 chromosome	CP020451.2

Ensaio *in vitro*

Amostras de ácido nucleico de outros patógenos respiratórios que podem apresentar reatividade cruzada e gerar resultados falsos positivos foram testadas com o kit **WGene SARS-CoV-2 RT Detection**.

A tabela a seguir lista os patógenos testados:

Patógeno identificado	Resultado SARS-CoV-2	Resultado IC
Adenovírus humano TIPO A/B/C/D/E	Negativo	Positivo
Rhinovírus TIPO A/B/C	Negativo	Positivo
Moraxella catarrhalis	Negativo	Positivo
Haemophilus influenzae	Negativo	Positivo
Influenza A	Negativo	Positivo
Rhinovírus TIPO A/B/C	Negativo	Positivo
Streptococcus pneumoniae	Negativo	Positivo
Coronavírus 229E/NL63	Negativo	Positivo

O produto não apresentou reatividade cruzada com nenhum dos patógenos avaliados no teste.

3- Estudo de Inclusão

A análise *in silico* foi realizada usando as 16.378 sequências do vírus SARS-CoV-2 disponíveis em todo o mundo no banco de dados GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, <https://www.gisaid.org>), acesso 13 de maio de 2020. Considerando as identidades apresentadas pelos oligonucleotídeos desenhados nos genes RdRp e N, 16.347 (99,8%), as sequências apresentaram 100% de identidade com pelo menos um dos genes. As 31 sequências restantes apresentaram 1 base não aparelhada (mismatch) em alguns dos oligonucleotídeos envolvidos.

4- Estudo de Precisão

A precisão foi determinada através da avaliação de uma amostra clínica diluída de matriz negativa (MC-1), o controle positivo (PC) e uma amostra de RNA SARS de 50 cópias/reação, em 3 instrumentos diferentes (QuantStudio® 3 (Applied Biosystems), Mic qPCR Thermal Cycler - 4 (Biomolecular Systems) e Mastercycler® RealPlex (Eppendorf)) repetindo o esquema por 5 dias. Um resumo dos parâmetros obtidos é o seguinte:

Amostra	Ct SARS-CoV-2 Média	Repetibilidade DP	Repetibilidade CV	Intra instrumento DP	Intra instrumento CV	Reprodutibilidade DP	Reprodutibilidade CV
CP kit	28,78	0,16	0,6%	0,22	0,8%	0,45	1,6%
MC-1	29,50	0,11	0,4%	0,21	0,7%	0,35	1,2%
SARS-CoV-2	32,40	0,26	0,8%	0,34	1,1%	0,49	1,5%

O produto **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** apresenta um coeficiente de variação (CV) <2% nas determinações intra e inter instrumentos para todas as amostras avaliadas, confirmando a robustez do produto.

5- Validação Clínica

A validação clínica do **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** foi realizada através da análise de 185 amostras clínicas previamente testadas com um método de referência que é comumente utilizado para o diagnóstico de infecção pelo vírus SARS-CoV-2. 113 amostras negativas e 72 positivas foram testadas para SARS-CoV-2. A tabela mostra o resumo dos resultados obtidos:

		Método de Referência		
		Positivo	Negativo	TOTAL
WGene SARS-CoV-2 RT Detection	Positivo	72	0	72
	Negativo	0	113	113
	TOTAL	72	113	185

% concordância +	100%
% concordância -	100%

O produto **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** apresentou 100% de concordância com o método de referência nas amostras analisadas.

APRESENTAÇÃO

- Kit para 100 determinações (Cód. 1060080)













REFERÊNCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020, May 13th). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CDC. (2020, August 16th). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - Information for Laboratories: Real-Time RT-PCR Resources: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CDC. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS): <https://www.cdc.gov/sars/index.html>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CLSI. Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID): <https://www.gisaid.org>, acceso 13 de mayo de 2020.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223):497e506.
- World Health Organization (WHO). Q&A on coronaviruses (COVID-19): <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.


TaqMan e Light Cycler 480 são marcas registradas de Roche Molecular Systems, Inc.
StepOne Plus, Applied Biosystems 7500 e QuantStudio são marcas registradas de Applied Biosystems by Thermo Scientific.
CFX96 é marca registrada da Biorad
Mx é marca registrada de biomolecular systems
Rotor Gene Q é marca registrada da Qiagen.
Mastercycler RealPlex é marca registrada de Eppendorf

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

	Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
<input type="checkbox"/> EC <input type="checkbox"/> REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Nocivo
<input type="checkbox"/> IVD	Uso médico-diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Conteúdo suficiente para <n> testes		Irritante
	Data de validade		Consultar as instruções de uso
	Limite de temperatura (conservar a)	<input type="checkbox"/> Calibr.	Calibrador
	Não congelar	<input type="checkbox"/> CONTROL	Controle
	Risco biológico	<input type="checkbox"/> CONTROL +	Controle Positivo
	Volume após a reconstituição	<input type="checkbox"/> CONTROL -	Controle Negativo
<input type="checkbox"/> Cont.	Conteúdo	<input type="checkbox"/> REF	Número de catálogo
<input type="checkbox"/> LOT	Número de lote		

Produto autorizado no contexto da emergência de saúde devido ao COVID-19

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-211

 **Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina