

RIDA® GENE Coronavirus

REF PG6805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemanha

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®GENE Coronavirus realizado no instrumento de PCR em tempo real LightCycler® 480 II é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa e diferenciação direta de coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV a partir de esfregaços nasais/garganta humana não tratados de pessoas com sinais e sintomas de infecção respiratória.

O teste RIDA®GENE Coronavirus foi desenvolvido para apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS CoV em pacientes com sintomas de infecção respiratória em conjunto com outros achados clínicos e resultados laboratoriais.

Resultados negativos não excluem infecção com coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS, e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

2. Sumário e explicação do teste

Os coronavírus pertencem à família dos Coronaviridae e são vírus de RNA de cadeia única (ss). Devido à sua elevada variabilidade genética, as espécies de vírus individuais podem ultrapassar a barreira das espécies e infectar diferentes espécies hospedeiras. Exemplos dessas transmissões entre espécies incluem infecções com o SARS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave), que foram responsáveis pela pandemia da SARS em 2002/2003⁽¹⁾, e o MERS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio), que surgiu em 2012.⁽²⁾ O SARS-CoV causa sintomas de pneumonia atípica e reclamou mais de 1.000 mortes durante a pandemia de 2002/2003. Acredita-se que os hospedeiros originais sejam civetas e morcegos. Mesmo que as várias vias de transmissão não estejam completamente esclarecidas, a transmissão ocorre principalmente através de infecção por gotículas. Não se pode descartar a transmissão por infecção por esfregaço ou pela via fecal-oral.

Até 2015, mais de 1.100 infecções por MERS-CoV foram confirmadas em todo o mundo e mais de 420 mortes associadas ao MERS-CoV foram registradas.^(3,4) A maioria destes casos foi identificada na Península Arábica. O hospedeiro original também ainda não foi claramente identificado para a MERS, mas suspeita-se que os dromedários sejam a principal fonte de transmissão.⁽⁵⁾ Após um período de incubação de 1 a 2 semanas, aparecem sintomas semelhantes aos da gripe; casos graves podem levar a pneumonia e a angústia respiratória aguda.

Para além da SARS-CoV e MERS-CoV, os vários coronavírus humanos patogênicos HKU1, NL63, 229E, OC43 são os desencadeadores de infecções respiratórias leves até às síndromes respiratórias agudas graves.⁽⁶⁾ Embora os quatro coronavírus ocorram globalmente, eles são detectados em diferentes regiões do mundo em diferentes épocas do ano.

O coronavírus humano 229E (HCoV-229E) pertence ao gênero Alphacoronavirus e, juntamente com o coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43, gênero: Betacoronavirus), que é frequentemente responsável por resfriados.⁽²⁾ Outros Beta coronavírus são SARS-CoV, MERS-CoV e Coronavirus HKU1. O último foi diagnosticado em 2005 em um paciente hospitalizado com síndrome respiratória aguda e pneumonia na China.⁽⁷⁾

As infecções com o coronavírus humano NL63 (HCoV-NL63) são semelhantes às das infecções de parainfluenza. O vírus foi descoberto pela primeira vez em uma criança com bronquiolite na Holanda em 2003 e, desde então, foi detectado em todo o mundo em crianças pequenas e pacientes imunossuprimidos com síndrome respiratória aguda.⁽⁸⁾

3. Princípio do teste

O RIDA®GENE Coronavirus é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa e diferenciação direta de coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV RNA. Após o RNA ter sido isolado, os fragmentos genéticos específicos de coronavírus e MERS-CoV (ORF1) são amplificados (se presentes). As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Coronavirus contém um **Internal Control RNA** (ICR) a fim de poder controlar o preparo da amostra e/ou uma potencial inibição de PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2 ×	700 µl	Amarelo, pronto para uso
2	PP-Mix	1 ×	770 µl	Verde claro, pronto a usar
3	Enzyme-Mix	1 ×	80 µl	Vermelho, pronto para uso
R	Internal Control RNA	2 ×	1800 µl	Marrom, pronto para uso
N	PCR Water	1 ×	500 µl	Branco, pronto para uso
P	Positive Control	1 ×	100 µl	Azul, pronto para uso

5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira a +2 a +8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 15 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (+2 a +8 °C).

Tabela 2: Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
Não aberto	-20 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
Aberto	-20 °C	15 ciclos de descongelamento-congelamento

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1 Reagentes fornecidos

Os seguintes reagentes são necessários para realizar os testes Coronavírus RIDA®GENE:

Reagentes
Água PCR (livre de nuclease)

6.2 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar os testes RIDA®GENE Coronavírus:

Equipamentos
Plataforma de extração: Maxwell® RSC (Promega)
Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
Consumíveis PCR em tempo real (placas (baixo perfil, poços brancos, armação transparente), recipientes de reação, lâminas)
Centrífuga com rotor para placas
Vortexer
Pipetas (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1.000 µl)
Pontas da pipeta com filtros
Luvas descartáveis sem pó

Para perguntas sobre o uso de equipamentos para processamento automatizado, entre em contato com a R-Biopharm AG em automation@r-biopharm.de.

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR, o PCR deve ser usado para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

É proibido trocar e misturar os componentes (mistura de reação, mistura de PP, mistura de enzimas, RNA de controle interno, controle positivo, água de PCR) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização.

Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

As substâncias perigosas são indicadas de acordo com as obrigações de marcação. Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS).

8. Coleta e armazenamento de amostras

8.1 Preparação de RNA de esfregaços nasais e da garganta

Um kit de extração de ácido nucleico disponível no mercado (por exemplo, RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de ácido nucleico (por exemplo, Maxwell® RSC (Promega)) é recomendado para a preparação de RNA a partir de esfregaços. Preste atenção às informações fornecidas pelo fabricante.

O teste RIDA®GENE Coronavirus contém um **Internal Control RNA** que indica possível inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado apenas como controle de inibição ou como controle de processo (controle de extração e inibição).

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição para amplificação, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à Mistura Principal (consulte a Tabela 3).

Quando o **Internal Control RNA** for usado como controle de extração para o preparo de amostras e como controle de inibição para amplificação, então 20 µl de **Internal Control RNA** deve ser usado durante a extração. Nós recomendamos que o **Internal Control RNA** seja adicionado à mistura tampão de lise de amostras sempre que possível, e não diretamente ao material da amostra. Recomendamos que 1 µl por reação do **Internal Control RNA** seja pipetado à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da Mistura Principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10% à Mistura Principal a fim de compensar qualquer perda da pipeta (Tabela 3, Tabela 4). Descongelar, agitar em vórtice (exceto a mistura de enzimas) e centrifugar brevemente antes de usar **Reaction Mix**, **Enzyme-Mix**, o **Positive Control**, a **PCR Water** e **Internal Control RNA**. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (+2 a +8 °C).

Tabela 3: Exemplo de cálculo e preparação da Mistura Principal para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes da Mistura Principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20,1 µl	221,1 µl

Misture a Mistura Principal e depois centrifugue por pouco tempo.

Tabela 4: Exemplo do cálculo e produção da Mistura Principal para 10 reações (ICD somente como controle de inibição)

Código do kit	Componentes da Mistura Principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,1 µl	232,0 µl

Misture a Mistura Principal e depois centrifugue por pouco tempo.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da Mistura Principal em cada tubo de ensaio (frascos/placas).

Controle negativo: 5 µl de PCR Water pipetados à respectiva Mistura Principal.

Nota: Ao usar Internal Control RNA como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos que 1 µl de Internal Control RNA seja pipetado para cada Mistura de PCR do controle negativo.

Amostras: Adicione 5 µl de eluato a cada Mistura Principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl de Positive Control à Mistura Principal pipetada.

Nota: Ao usar Internal Control RNA como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos que 1 µl de Internal Control RNA seja pipetado para cada Mistura de PCR do controle positivo.

Selar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (consulte a Tabela 5, Tabela 6).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de RT-PCR em tempo real universal

Tabela 5: Perfil de RT-PCR em tempo real universal para o LightCycler® 480 II

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58°C
Desnaturação inicial	1 min, 95°C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95°C
Recozimento/Extensão	15 s, 60°C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Nota: O perfil PCR em tempo real universal também pode ser usado para testes de DNA se os testes de PCR em tempo real RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA forem combinados em uma execução.

9.4 Configuração do canal de detecção

Tabela 6: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de detecção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	465/510	Kit de compensação de cor I RIDA®GENE (PG0001)
	ICR	533/580	
	MERS-CoV	618/660	

10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 7).

O **Positive Control** está disponível em uma concentração de 10^3 cópias/ μ l. É usado em uma quantidade total de 5×10^3 cópias em cada execução de PCR.

Tabela 7: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene-alvo Ct
Positive Control	Positivo	N/A *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

**1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.*

Se o controle positivo não estiver na faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

11. Interpretação dos resultados

Tabela 8: Interpretação dos resultados

Detecção de			Resultado
Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV	ICR	
positivo	negativo	positivo /negativo	Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) detectável
negativo	positivo	positivo /negativo	MERS-CoV detectável
positivo	positivo	positivo /negativo	Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV detectáveis
negativo	negativo	positivo	Negativo (genes alvos não são detectáveis)
negativo	negativo	negativo	Inválido

Uma amostra é considerada positiva se o RNA da amostra e **Internal Control RNA** mostrarem amplificação no sistema de detecção.

Uma amostra também é considerada positiva se o RNA da amostra mostrar amplificação, mas o **Internal Control RNA** não mostra amplificação no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** não é necessária neste caso, já que altas concentrações do fragmento amplificado podem levar a um sinal fraco ou ausente do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é considerada negativa se o RNA da amostra não mostrar amplificação, enquanto o **Internal Control RNA** mostra amplificação no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** pode descartar a inibição da reação PCR.

Uma amostra é considerada inválida quando o RNA da amostra e o **Internal Control RNA** não mostram amplificação no sistema de detecção. Os inibidores de PCR estão presentes na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração. A amostra extraída deve ser diluída de 1:10 com água de PCR e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. O teste RIDA®GENE Coronavirus detecta coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) RNA e MERS-CoV RNA a partir de esfregaços nasais/garganta humana não tratados. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste só é verificado para esfregaços nasais/garganta humana não tratados.
4. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequados, ou uma carga patogênica abaixo da sensibilidade analítica do teste pode levar a falsos resultados negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
6. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95%) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
7. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas, e podem levar a um resultado falso negativo com RIDA®GENE Coronavirus.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo correspondentes (ORF1) estão presentes.
9. Este ensaio deve ser realizado de acordo com o Regulamento da UE sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante precisamente ao realizar o teste.

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade analítica

O RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Coronavirus tem um limite de detecção de ≥ 50 cópias/reacção RNA para coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV (Fig. 1, Fig. 2).

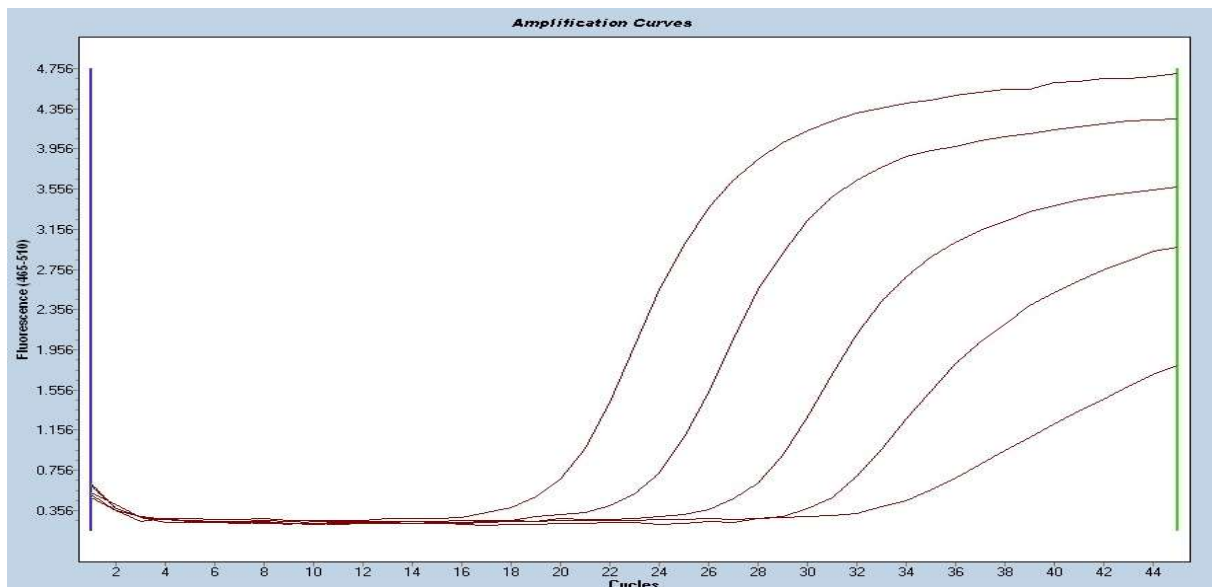


Figura 1: Série de diluições de Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43) ($10^5 - 10^1$ RNA cópias/μl) no LightCycler® 480 II

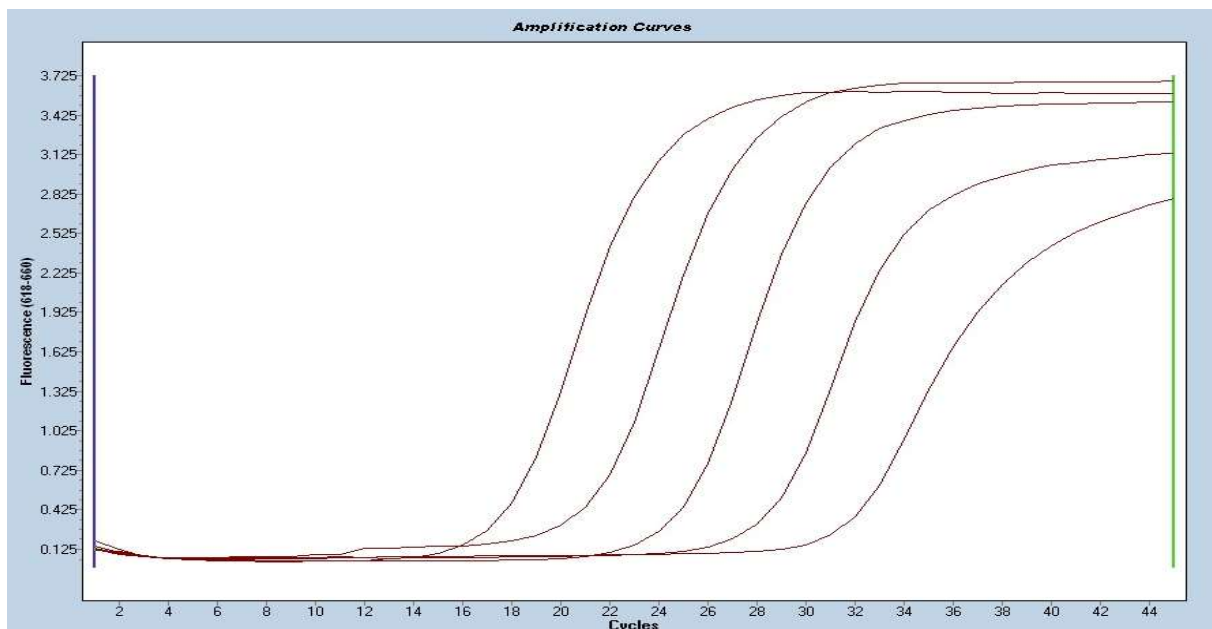


Figura 2: Série de diluição MERS ($10^5 - 10^1$ RNA cópias/μl) no LightCycler® 480 II

O limite de detecção do método geral depende da matriz da amostra, da extração do RNA e do conteúdo de RNA.

13.2 Especificidade analítica

O RT-PCR em tempo real RIDA®GENE Coronavirus é específico par coronavírus. Não foram detectadas atividades cruzadas com as seguintes espécies (Tabela 9):

Tabela 9: Organismos potencialmente reativos cruzados

Organismo	Resultado do teste	
	Coronavírus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV
<i>Acinetobacter baumannii</i> estirpe 5377	negativo	negativo
Adenovirus	negativo	negativo
Adenovírus 1, humano, estirpe de adenóide 71	negativo	negativo
Adenovírus 7, humano, estirpe Gomen	negativo	negativo
Adenovirus 40, humano, estirpe Dugan	negativo	negativo
Adenovírus 41, humano, estirpe Tak	negativo	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negativo	negativo
<i>Arcobacter butzleri</i>	negativo	negativo
Astrovirus	negativo	negativo
<i>Bacillus cereus</i>	negativo	negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> estirpe 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativo	negativo
<i>Campylobacter coli</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	negativo	negativo
<i>Clostridium bifermentans</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sporogenes</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium septicum</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium novyi</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo

<i>E. coli</i> (O6)	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativo	negativo
Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	negativo	negativo
Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	negativo	negativo
Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	negativo	negativo
Metapneumovírus humano	negativo	negativo
Coxsackievirus humano B4	negativo	negativo
Citomegalovírus humano	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 1, estirpe C35	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 2, estirpe Greer	negativo	negativo
Vírus parainfluenza humana 4b, estirpe CH19503	negativo	negativo
Vírus parainfluenza sorotipo 3	negativo	negativo
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe longa	negativo	negativo
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe 9320	negativo	negativo
Genogrupo A de rinovírus humano	negativo	negativo
Vírus influenza, infeccioso A/PR/8/34	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe MGH 78578	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe FH de Eaton Agent	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> estirpe FAM18	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
Rotavirus	negativo	negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	negativo	negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	negativo	negativo

<i>Serratia liquefaciens</i>	negativo	negativo
<i>Shigella flexneri</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	negativo	negativo
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , estirpe NCTC 7465	negativo	negativo
Vírus de varicela Zoster (tipo B)	negativo	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negativo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negativo	negativo

Substâncias interferentes

A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. De forma correspondente, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir dada a sua utilização generalizada para infecções respiratórias, ou a existência generalizada nas amostras correspondentes.

As substâncias que poderiam influenciar significativamente os resultados dos testes foram primeiramente examinadas em uma tela de interferência. Foram identificadas várias substâncias que poderiam estar presentes como resíduos da extração, devido ao uso disseminado em infecções respiratórias (várias farmácias ou medicamentos prescritos), ou devido à ocorrência disseminada nas amostras de controle correspondentes (por exemplo, mucinas na superfície das membranas mucosas ou sangue), e verificadas inicialmente em altas concentrações (três vezes a dose diária ou simulação do "pior caso"). Se uma possível interferência foi encontrada nesta tela de interferência para uma substância examinada, foi estabelecida uma relação dose-efeito entre a concentração da substância em questão e a interferência.

Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 10.

Tabela 10: Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Ciprofloxacina 500 mg (Ciprofloxacina)	25 mg/ml
Ampicilina	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (dipropionato de beclometasona)	10 % [v/v]
Sangue humano	2 % [v/v]
Eritromicina	10 % [v/v]
Fluído Nasal (propionato de fluticasona)	25 mg/ml
Robitussin (guaifenesina/dextrometorfano)	10 % [v/v]
Spray para dor de garganta Chloraseptic® (fenol)	10 % [v/v]
Mucina	60 µg/ml
Cloreto de sódio	10 % [v/v]
Nasivin 0,05 % (oximetazolina)	10 % [v/v]
Tobramina	4 µg/ml
Fosfato de oseltamivir	25 mg/ml

13.3 Reatividade analítica

A reatividade do RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Coronavirus foi examinada com vários subtipos de coronavírus (consulte a Tabela 11). Os subtipos de Coronavírus do painel de amostra foram detectados com o RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Coronavirus. A reatividade do subtipo HKU1 foi analisada por correspondência de sequências.

Tabela 11: Testes de reatividade analítica

Estirpe – Subtipo	Concentração	Resultado	
		Coronavírus	MERS-CoV
Coronavírus – HKU1	*	positivo	negativo
Coronavírus – OC43	1,5x10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavírus – NL63	1,2x10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavírus – 229E	1,2x10 ⁰ U/ml	positivo	negativo
Coronavírus – MERS	1,0x10 ⁻⁵ U/ml	negativo	positivo










*A reatividade analítica ao coronavírus HKU1 foi detectada com uma análise BLAST.

14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2017-09-20	Versão anterior
2021-08-13	Revisão geral: 1. Uso previsto 4. Reagentes fornecidos 5. Instruções de armazenamento 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários 8. Coleta e armazenamento de amostras 9. Realização do teste 10. Controle de qualidade 12. Limitações do método 13. Características de desempenho
2022-04-19	6. Reagentes necessários, mas não fornecidos (RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004))

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cumpra com o manual de instruções
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Reaction Mix	Reaction Mix
PP-Mix	Mistura de iniciador/amostra
Enzyme-Mix	Enzyme Mix
Internal Control RNA	Controle de extração/inibição
PCR Water	Controle negativo
Positive Control	Controle positivo

16. Referências

1. World Health Organization Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) multi-country outbreak - Update 6 http://www.who.int/csr/don/2003_03_21/en/ accessed 28.07.2015
2. To K.W. et al. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* 2013; 5 (S2):S103-S108.
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV) – Saudi Arabia <http://www.who.int/csr/don/29-april-2015-mers-saudi-arabia/en/> accessed 30.07.2015
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: severe respiratory illness associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)–worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62:480–483
5. Adney DR et al. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1999–2005
6. US Centers for Disease Control and Prevention. MERS clinical features [cited 2015 May 30]. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/clinical-features.html> accessed 30.07.2015
7. Woo PC et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
8. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 368-373.