

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTÁGIO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**DETEÇÃO DE SARS-COV-2 EM AMOSTRAS NASOFARÍNGEAS
COM AS TÉCNICAS DE ANTIGÉNIO, RT-PCR E VITAPCR REAL
TIME PCR**

AUTOR: IURI DIOGO REGO RODRIGUES

ORIENTADORA (ESTEsL):

DOUTORA ANA RAMOS

COORDINADORA (Labocentro):

DOUTORA KARINA PELIÇARI

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2022

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTÁGIO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**DETEÇÃO DE SARS-COV-2 EM AMOSTRAS
NASOFARÍNGEAS COM AS TÉCNICAS DE ANTIGÉNIO,
RT-PCR E VITAPCR REAL TIME PCR**

AUTOR: IURI DIOGO REGO RODRIGUES

ORIENTADORA (ESTEsL):

DOUTORA ANA RAMOS

COORIENTADORA (Labocentro):

DOUTORA KARINA PELIÇARI

JÚRI:

DOUTORA EDNA SORAIA RIBEIRO
(ESTEsL)

DOUTOR JOÃO PEDRO SANTOS
(INSA)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2022

Direitos de cópia

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar o presente relatório de estágio e de o divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2022 – Iuri Diogo Rego Rodrigues

Agradecimentos

Com o término de mais uma etapa muito importante na minha vida, tenho de deixar alguns agradecimentos porque nunca conseguiria fazer isto sem o apoio de todos vocês.

Primeiramente, começo por agradecer às minhas orientadoras, da Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, Professora Ana Ramos, assim como à Técnica Karina Peliçari do Labocentro S.A.- Laboratório de Análises Clínicas.

Quero também agradecer ao Grupo Clara saúde, em especial ao Labocentro S.A.- Laboratório de Análises Clínicas por me ter recebido e acolhido numa fase muito complicada para se arranjar estágio devido à COVID-19. Um grande obrigado a todas as técnicas do laboratório que me receberam, acolheram e me fizeram sempre sentir bem no ambiente de trabalho, mostrando-se sempre prontos a ajudar e ensinar. Em especial à equipa da triagem e da biologia molecular que sempre me ajudaram quando precisei. Quero deixar o meu maior agradecimento a técnica Karina Peliçari, que sempre esteve presente em todas as horas, me ajudou e apoiou em toda esta fase. Um obrigado especial também às técnicas Joana Marques, Cláudia Silva, Ana Hipólito, Ana Oliveira e Teresa Melo que dentro do laboratório sempre me apoiaram e animaram quando mais precisei.

Não existem palavras suficientes para agradecer à minha família, que sempre me apoiou, não me deixou desistir e que presenciou todas as minhas fases durante o meu percurso académico. Obrigado por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Quero agradecer também ao grupo de amigos que fiz nestes dois anos, Carolina Sebastião, Maria João Borges e Tiago Nascimento. Obrigado por todas as sessões de estudo, gargalhadas e conversas alheias. Um obrigado especial à Carolina que acompanhou um pouco mais este percurso, passando de colega de mestrado, a colega de estágio e por fim a colega de trabalho. Obrigado por todas as ajudas e conselhos, mas principalmente pela amizade e companheirismo. Um obrigado também aos “velhos” amigos que continuam na minha vida e que sempre me apoiaram e aturaram em todas as diferentes fases da minha vida. Quero deixar em destaque o meu muito obrigado à Irina Palma, Marta Vasconcelos, André Lourenço, Diogo Martins, Beatriz Vieira, Raquel Miranda e Ana Pereira. Sem o vosso apoio todo este processo teria sido muito mais complicado.

Resumo

A pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) veio representar grandes ameaças ao mundo em diversos aspetos. Nesta situação é essencial haver uma testagem regular de toda a população.

Já existem vários testes disponíveis para deteção de Síndrome respiratório aguda grave - coronavírus 2 (SARS-CoV-2), no entanto demos especial atenção às técnicas de antígeno e de diagnóstico molecular. Na primeira técnica a amostra foi colocada numa cassete de cromatografia, que possuía uma área revestida com o anticorpo monoclonal anti-SARS-CoV-2. A segunda técnica dividiu-se em dois testes. O primeiro foi o teste VitaPCR™, onde a amostra foi armazenada num tampão específico, que lisou e extraiu a amostra numa única etapa, sendo possível a deteção do SARS-CoV-2 através da fluorescência em múltiplos canais. O segundo teste foi o *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* em tempo real (rRT-PCR). Neste, houve primeiramente a extração do ácido nucleico através do uso de *beads* magnéticas, seguindo-se para a fase de amplificação através do rRT-PCR que serviu para detetar a presença dos genes S, RdRP e N.

Este estágio serviu para realizar todo o processo analítico de amostras com suspeita de SARS-CoV-2. Foi feita uma análise de cada um dos testes de modo a entender os seus princípios teóricos, metodologia, resultados possíveis e respetiva interpretação.

Em suma, foi concluído que o teste rRT-PCR é o método mais adequado para o diagnóstico de COVID-19. No entanto, os testes VitaPCR™ e de deteção de antígeno, foram considerados melhores como métodos de *Point of Care* (POC), prestando um grande auxílio no controlo da pandemia e diminuição da sobrecarga nos hospitais.

Palavras-Chave:

SARS-CoV-2 ; Antígeno; rRT-PCR; COVID-19;

Abstract

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has come to pose major threats to the world in many ways. In this situation, regular testing of the entire population is essential.

There are already several tests available for the detection of Severe Acute Respiratory Syndrome - coronavirus 2 (SARS-CoV-2), however we paid special attention to antigen and molecular diagnostic techniques. In the first technique, the sample was placed in a chromatography cassette, which had an area coated with the anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody. The second technique was divided into two tests. The first was the VitaPCR™ test, where the sample was stored in a specific buffer, which lysed and extracted the sample in a single step, making it possible to detect SARS-CoV-2 through fluorescence in multiple channels. The second test was the real-time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR). In this one, the nucleic acid was first extracted using magnetic beads, followed by the amplification phase through rRT-PCR, which served to detect the presence of the S, RdRP and N genes.

This stage served to carry out the entire analytical process of samples with suspected SARS-CoV-2. An analysis was made of each of the tests in order to understand their theoretical principles, methodology, possible results and respective interpretation.

In summary, it was concluded that the rRT-PCR test is the most suitable method for the diagnosis of COVID-19. However, VitaPCR™ and antigen detection tests were considered better as Point of Care (POC) methods, providing a great help in controlling the pandemic and reducing the burden on hospitals.

Key-words:

SARS-CoV-2 ; Antigen; rRT-PCR; COVID-19;

Índice

1. Introdução Teórica.....	1
1.1 Evolução do coronavírus e início da pandemia mundial de Covid-19.....	1
1.2 SARS-CoV-2	5
1.2.1. Caracterização do SARS-CoV2	5
1.2.2. Proteínas estruturais	7
1.2.3. Proteínas não estruturais	10
1.2.4. Ciclo de vida do SARS-CoV-2.....	12
1.2.6. Patogénese da infeção por SARS-CoV-2.....	14
1.3 Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2.....	16
1.4 Testes rápidos de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2.....	20
1.5 Testes de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2	26
2. Objetivos.....	31
3. Material e Métodos	32
3.1. Amostra	32
3.2. Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2	33
1.2.1. Materiais e reagentes fornecidos:	33
1.2.2. Procedimento:	33
3.3. Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2.....	34
3.3.1. Materiais e reagentes fornecidos pelo kit:.....	34
3.3.2. Materiais e reagentes não fornecidos pelo kit:	34
3.3.3. Procedimento:	35
3.4. Teste rRT-PCR	36
3.4.1. Materiais e reagentes (extração).....	36
3.4.2. Procedimento.....	36
3.4.3. Materiais e reagentes (rRT-PCR)	39
4. Resultados.....	42
4.1 Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2.....	43
4.2 Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2.....	45
4.3 Teste rRT-PCR.....	47
5. Discussão dos resultados	50
5.1 Diagnóstico por deteção de antígeno (presença/ausência do antígeno do SARS-CoV-2).....	50
5.2 Testes Moleculares de Amplificação de Ácidos Nucleicos -TAAN	53
6. Conclusões.....	60
7. Conclusions	61
8. Proposta de Projeto de Investigação	62
9. Referências Bibliográficas	66
10. Anexos	70

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. (adaptado de 4)	11
Tabela 1.2- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste de antígeno com zangaratoas nasais. (adaptado de 22).....	19
Tabela 1.3- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste de antígeno com zangaratoas nasofaríngeas. (adaptado de 22).....	19
Tabela 1.4- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste para SARS-CoV-2	24
Tabela 1.5- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com zangaratoas orofaríngeas. (adaptado de 26)	24
Tabela 1.6- Classificação dos valores de cts (adaptado de referência 33)	27
Tabela 1.7- Resultados do desempenho clínico do kit allplex™ sars-cov-2 / flua/flub/rsv assay (adaptado de 43)	30
Tabela 3.1- Perfil térmico da reação. (adaptado de 43)	41
Tabela 3.1- Perfil térmico da reação. (adaptado de 43)	100
Tabela 4.1- Cronograma de tarefas e respetiva duração, realizadas durante o estágio.	43
Tabela 10.1- Preparação das placas para usar no processamento de amostras de 200 µL. (adaptado da 43)	97
Tabela 10.2- Preparação da mix de beads magnéticas de ligação. (adaptado da 42) 98	
Tabela 10.3- Preparação da mastermix. (adaptado da 43)	99

Índice de Figuras

Figura 1.1- Genoma do SARS-CoV-2 ⁴	6
Figura 1.2- Estrutura do SARS-CoV-2 (adaptado de 16)	6
Figura 1.3- Estrutura da proteína estrutural S.(adaptado de 4)	7
Figura 1.4- Proteína estrutural N e respetiva sequência proteica.(adaptado de 4)	9
Figura 1.5- Proteína estrutural E (adaptado de 4)	9
Figura 1.6- Proteína estrutural M (adaptado de 4).....	10
Figura 1.7- Ciclo de vida do SARS-CoV-2 ⁴	12
Figura 1.8- Sintomas associados a infeção por SARS-CoV-2 (adaptado de 7)	15
Figura 1.9- Estrutura interna de uma cassete de teste de um teste rápido para deteção de antígeno do SARS-CoV-2. (adaptado de 18).....	17
Figura 1.10- Metodologia rRT-PCR. Esta iniciou-se com a extração do RNA viral a partir das amostras a analisar. Seguidamente com o auxílio da transcriptase reversa, obteve-se a sequência de DNA complementar que foi amplificada com a técnica de RT-PCR. Terminando a amplificação os resultados são analisados e interpretados pelo software e pelo operador.	21
Figura 1.11- Exemplo de resultado onde alvo foi detetado sem a presença do sinal de controlo interno devido à inibição molecular.	22
Figura 1.12- Extração do material genético das amostras com o kit de isolamento magmax™ viral/pathogen ou magmax™ viral/pathogen ii.	29
Figura 3. 1- Colheita de exsudado nasofaríngeo. (adaptado de 17)	32
Figura 3. 2- Colheita de exsudado orofaríngeo. (adaptado de 17).....	32
Figura 3. 3- Procedimento efetuado no teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2. (adaptado de 17)	33
Figura 3.4- <i>Procedimento efetuado no teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2</i> ..	35
Figura 4.1- Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado negativo.....	44
Figura 4.2- Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado positivo	44
Figura 4.3- Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado inválido	45
Figura 4.4- Teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com resultado positivo (rna universal do tipo SARS: detetado)	45
Figura 4.5- Teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com resultado positivo (rna universal do tipo SARS: não detetado)	46
Figura 4.6- Teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com resultado presuntivo positivo	46
Figura 4.7- Teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com resultado negativo	47
Figura 4.8- Teste para SARS-CoV-2 VITAPCR™ Gen 2 com resultado inválido	47
Figura 4.9- Resultados de uma reação de rRT-PCR exportados para o programa de interpretação.....	47
Figura 4.10- Amostra com resultado negativo após uma reação de rRT-PCR	48
Figura 4.11- Amostra com resultado positivo após uma reação de rRT-PCR.....	48
Figura 4.12- Amostra com resultado inválido após uma reação de rRT-PCR.....	49
Figura 5.1- Resultado negativo na reação de rRT-PCR, com os controlos de qualidade validados	101
Figura 5.2- Resultado da reação de rRT-PCR com uma má curva de amplificação. Existe uma amplificação tardia e de apenas um dos genes alvo. Devido aos valores de Ct apresentados devemos de ver a informação clínica do utente e de preferência repetir a análise da amostra, mesmo que neste caso os controlos de qualidade se encontravam validados.	102

- Figura 5.3-** Resultado positivo com valores de Ct baixos e controlos de qualidade validados. Os valores de Ct apresentados estão associados a uma elevada carga viral..... 102
- Figura 5.4-** Resultado inconclusivo. Apesar de ter havido amplificação dos três genes detetáveis, os valores de Ct não são coerentes e estão muito próximos da borderline ($ct \leq 35$)..... 103
- Figura 5.5-** Resultado inválido. Não houve qualquer tipo de amplificação dos genes alvo nem do controlo endógeno. Isto significa, uma vez que temos um valor de controlo exógeno aceitável, que apesar da reação de rRT-PCR ter sido bem executada, não havia amostra pois não houve amplificação do controlo endógeno. 103

Listas de abreviaturas

ARDS: Síndrome de disfunção respiratória aguda

COVID-19: Coronavirus *disease* 2019

Ct: Ciclo térmico

CTD: Domínio C-terminal

DMV: Vesículas celulares de membrana dupla

E: Especificidade analítica

IC: Controlo interno

LOD: Limite de deteção

MERS-CoV: Síndrome respiratório do médio oriente

MPRO: *Main Protease*

NF: Nasofaríngeo

NSP: Proteína não estrutural

NTD: Domínio N-terminal

OF: Orofaríngeo

ORF: *Open reading frame*

P: Precisão analítica

PLPRO: *Papain-like Protease*

POC: *Point of Care*

pp1a: Poliproteína 1a

pp1ab: Poliproteína 1ab

RBD: Domínio de ligação ao recetor

RBM: Motivo específico de ligação ao recetor

RNA: Ácido ribonucleico

RNP: Ribonucleoproteína

rRT-PCR: *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* em tempo real

RTC: Complexo replicação-transcrição

S: Sensibilidade analítica

SARS-CoV: Síndrome respiratório agudo grave

SARS-CoV-2: Síndrome respiratório aguda grave - coronavírus 2

TRAg: teste de deteção rápida de antígeno

1. Introdução Teórica

O estágio foi realizado no Labocentro S.A.- Laboratório de Análises Clínicas, pertencente ao grupo Clara Saúde. O Grupo Clara Saúde foi fundado em 2010 pelo atual Líder, Dr. Carlos Clara. Este grupo divide-se em quatro áreas, sendo estas as análises clínicas, a anatomia patológica, a radiologia e as clínicas médicas.¹

A principal missão é prestar aos seus utentes os melhores, mais rápidos e mais úteis serviços de saúde e diagnóstico, assim como satisfazer pessoal e profissionalmente os membros da sua equipa e contribuir para o crescimento dos seus parceiros.² O grupo Clara Saúde é certificado pela Bureau Veritas de acordo com a norma ISO 9001:2015 e composto por uma equipa de profissionais devidamente qualificados, tendo como objetivo fornecer um serviço de qualidade e com o máximo rigor, aos seus clientes.²

Falando especificamente do laboratório onde se realizou o estágio, este é composto por várias secções de trabalho como a triagem, a bioquímica, a hematologia, a biologia molecular, a autoimunidade e a microbiologia. Posto o tema abordado no estágio e relatório, a componente prática foi feita nas secções da triagem e da biologia molecular.³

1.1 Evolução do coronavírus e início da pandemia mundial de Covid-19

Os coronavírus sempre foram os principais causadores de infeções moderadas em indivíduos imunocompetentes, até ao ano de 2003. No entanto, o aparecimento dos vírus do síndrome respiratório agudo grave (SARS-CoV) e do síndrome respiratório do médio oriente (MERS-CoV) surpreenderam toda a comunidade científica, uma vez que estes poderiam causar infeções graves e até levar à morte dos indivíduos infetados.^{4,5,6,7} Entre 2002 e 2003, a SARS-CoV resultou em 8.096 casos relatados e 774 mortes (taxa de mortalidade de ~10%).^{4,5,6,7} Mais tarde, até ao final de janeiro de 2020, foram registados 2.500 casos de MERS-CoV, e mais de 800 mortes associadas (taxa de morte por caso ~34%) em todo o mundo.^{4,5,6,7} No final de dezembro de 2019, foram identificados, pela primeira vez em humanos, na cidade chinesa de Wuhan, província de Hubei, casos confirmados de pneumonia grave. O agente etiológico foi isolado e identificado como um novo betacoronavirus, chamado Síndrome respiratório

aguda grave - coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que partilha ~80% de semelhança na sequência do genoma com a SARS-CoV.^{4,5,6,7}

Os primeiros doentes com COVID-19 foram diagnosticados em Portugal a 2 de março de 2020.⁸ Desde então já houveram mais de 5.500.000 casos confirmados e mais de 25 000 mortes registadas em Portugal.⁹ Nestes dois anos de pandemia, Portugal enfrentou seis vagas pandémicas, que vieram afetar o país em diversos níveis, sendo que a intensidade, o impacto e a maneira de lidar com cada uma delas foi variável.¹⁰

Tudo começou em março de 2020 com a primeira vaga pandémica. O facto de a doença ser ainda desconhecida, bem como as suas consequências, colocou o país em alerta. Assim, Portugal foi colocado em quarentena, mudando a vida de toda a população.¹⁰

Com o passar dos meses a situação pandémica tendia a estabilizar, mas em setembro de 2020 agravou-se novamente, levando o Governo a decretar o estado de calamidade em meados de outubro. Em novembro de 2020, foi declarado um novo estado de emergência (segunda vaga pandémica).¹⁰

O mês de janeiro de 2021 foi um verdadeiro pesadelo no que toca ao impacto do Serviço Nacional de Saúde, com os óbitos e internamentos a atingirem valores recorde. Desde modo, houve então a terceira vaga da pandemia. Ainda com apenas uma pequena fatia da população vacinada contra a Covid-19 esta “explosão” de casos teve fortes repercussões com os hospitais sem mãos a medir para a avalanche de internamentos. A chegada de novas vacinas, aliada ao aceleração do processo vacinal fez com que os casos tendessem a diminuir. Como todos os vírus, o SARS-CoV-2, ao longo do tempo foi adquirindo várias mutações, dando origem a diversas variantes. Para combater este problema, o processo vacinal foi acelerado e a 9 de outubro de 2021 Portugal atingiu a marca dos 85% da população com a vacinação completa. Mesmo com este grande feito, houve o aumento de novos casos, fazendo com que fosse necessário acelerar o reforço da terceira dose para os mais velhos.¹⁰

Entre abril e maio de 2022, o país entrou na sexta vaga da pandemia. Apesar de o índice de transmissibilidade do coronavírus estar a baixar, a Direção geral de saúde e o Instituto Nacional de Saúde doutor Ricardo Jorge alertaram, que a epidemia de COVID-19 mantém uma incidência muito elevada, com tendência crescente.¹¹

A nível estatístico, existem dois parâmetros que são avaliados nos estudos epidemiológicos de modo a perceber como está a pandémica em Portugal. Primeiramente temos o número básico de reprodução (R_0), que é um indicador da

transmissibilidade da infeção e em segundo, o número médio de casos secundários resultantes de um caso infetado, medido em função do tempo ($R(t)$). Segundo o relatório feito pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, O R_0 teve uma estimativa de 2,02 e o $R(t)$ teve uma estimativa entre 0,8 e 2,12. Ao longo dos dois anos de pandemia estes valores foram subindo e descendo, no entanto atualmente, com base nos dados recolhidos, o valor médio do $R(t)$ para os dias de 18/10/2022 a 22/10/2022 foi de 0,98.¹² Apesar do $R(t)$ apresentar valores inferiores a 1, considera-se que a transmissibilidade esteja a aumentar. Apesar do aumento que houve nos internamentos, mantém-se o reduzido impacto da COVID-19 nos serviços de saúde e na mortalidade. Desta forma foi recomendado a vacinação de reforço, o uso das medidas de proteção individual e a comunicação frequente destas medidas à população.¹³

O SARS-CoV-2 causa COVID-19, que foi o nome, atribuído pela Organização Mundial da Saúde, à doença provocada pelo vírus que pode causar infeção respiratória grave como a pneumonia.^{5,6,7,14}

A doença tem como principais sintomas:

- Febre;
- Tosse;
- Dor de cabeça;
- Dores musculares;
- Dificuldade respiratória/dispneia;
- Perda total do olfato (anosmia) ou parcial (hiposmia);
- Ausência do paladar (ageusia) ou perturbação do paladar (disgeusia);

No entanto, em crianças, sintomas como dor de cabeça (cefaleias), vómitos e diarreia também são considerados para despiste da COVID-19.^{5,6,7,14}

Até à data, houve mais de 160 milhões de casos confirmados da COVID-19 e mais de 3 milhões de mortes relacionadas em todo o mundo.^{4,5,6,7}

A doença pode durar até 5 semanas, mas depende de cada doente, do seu sistema imunitário e dos fatores de risco associados.^{5,6,7,14}

Hoje em dia a nível de tratamento da doença provocada pelo vírus SARS-CoV-2, pode incluir diferentes tipos de medicamentos:^{5,6,7,14}

- Antivirais
- Anticorpos monoclonais
- Oxigenoterapia

Desde o início da pandemia têm sido feitos esforços para o desenvolvimento de novos tratamentos para a COVID-19. Os medicamentos entretanto desenvolvidos permitem completar uma estratégia de resposta à COVID-19 assente na prevenção da doença grave, hospitalização e morte. ^{5,6,7,14} No entanto, tem havido falta de terapias eficazes para tratar o COVID-19. Devido à propagação desenfreada e contínua do COVID-19, é urgente identificar e caracterizar os alvos de drogas e vacinas para a SARS-CoV-2. ^{4,5,6,7}

1.2 SARS-CoV-2

1.2.1. Caracterização do SARS-CoV2

Os coronavírus são vírus envelopados que possuem um genoma formado por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA), não segmentado, de sentido positivo com 26 a 32 kb de comprimento.^{4,5,6,7,15} Estes vírus são caracterizados por apresentarem um formato esférico com um diâmetro que varia entre 80 a 120 nm. Estes pertencem à família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae*. De acordo com as variações na sequência do genoma e reações serológicas, os membros coronavírus na subfamília são classificados em quatro géneros:^{4,5,6,7,15}

1. Alphacoronavirus;
2. Betacoronavirus;
3. Gammacoronavirus;
4. Deltacoronavirus.

Os coronavírus são caracterizados por elevadas taxas de recombinação genética e de mutação, que resultam na sua diversidade ecológica. Com isto, estes vírus têm uma alta capacidade de infetar e adaptar-se prontamente a uma grande variedade de hospedeiros.^{5,6,7,15} Foram encontrados sete coronavírus para infetar humanos. Os coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1 são responsáveis por 10 a 30% das infeções do trato respiratório superior anualmente, caracterizadas por doenças respiratórias leves, como a constipação comum. No entanto, o SARS-CoV, o MERS-CoV e o SARS-CoV-2 são capazes de causar doenças respiratórias humanas graves, potencialmente resultando numa alta mortalidade.^{5,6,7,15}

Cerca de um terço do genoma do SARS-CoV-2 é composto por open reading frames (ORFs) e codifica 29 proteínas virais.^{4,5,6,7,15} Os outros dois terços da extremidade 5' do genoma SARS-CoV-2 codifica duas poliproteínas sobrepostas:^{4,5,6,7,15}

- Poliproteína 1a (pp1a);
- Poliproteína 1ab (pp1ab).

A pp1a é codificada pela ORF1a e engloba desde a proteína não estrutural (NSP) 1 à NSP11. A expressão da ORF1a e da ORF1b, por um mecanismo ribossomal de *frameshift* na qual o codão STOP da ORF1a é ignorado, fazendo com que a leitura só termine no codão STOP da ORF1b, originando a pp1ab, que engloba as NSP, da NSP1 à NSP16.^{4,5,6,7,15} Estas duas poliproteínas são digeridas por duas proteases

virais dando origem a 16 NSPs, que são essenciais para a replicação e transcrição do vírus (figura 1.1).^{5,6,7,15}

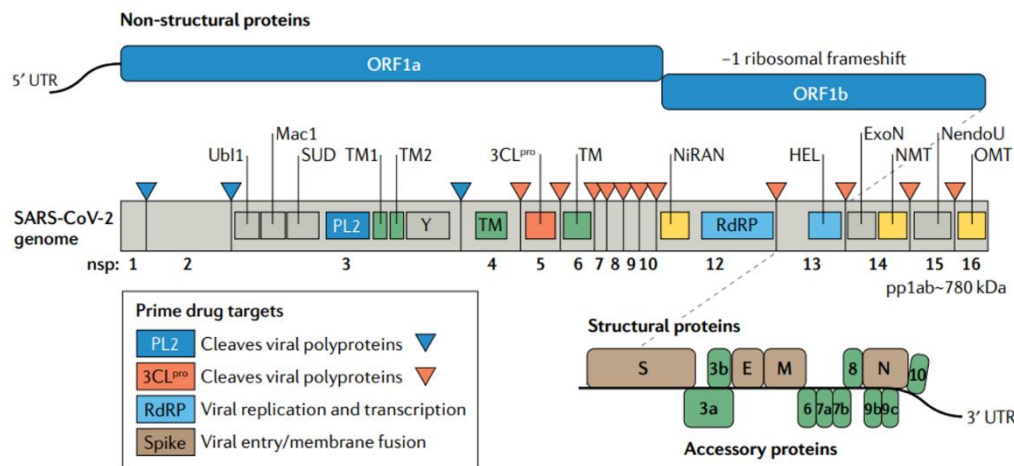


Figura 1.1- Genoma do SARS-CoV-2⁴

Os ORFs no terminal do genoma viral codificam um conjunto de proteínas estruturais, que podem ser observadas na figura 1.2. Estas por sua vez são:^{4,5,6,7,15}

- proteína da nucleocápside (N);
- proteína spike (S);
- proteína da membrana (M);
- proteína do envelope (E).

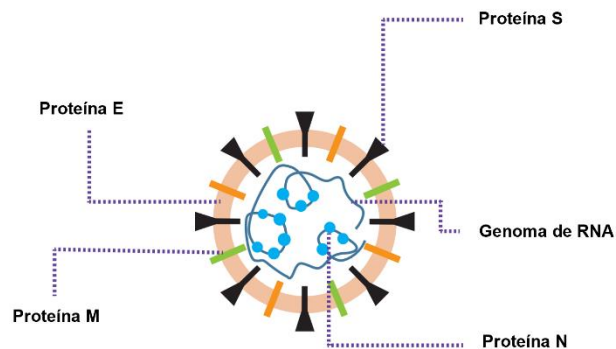


Figura 1.2- Estrutura do SARS-CoV-2 (adaptado de 16)

Estas proteínas são responsáveis pela estrutura do vírus e também participam na supressão da resposta imune do hospedeiro. Entre os genes estruturais existem ainda vários genes que codificam outras proteínas (ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b, ORF14 e ORF10), que estão envolvidas na regulação da infecção viral, mas podem não ser incorporadas no vírus, exceto as proteínas estruturais ORF3a e ORF7a.^{4,5,6,7,15} Existem ainda as proteínas acessórias que vão diferir das NSPs, pois para além de possuírem funções indiretas, não apresentam homologia com proteínas de outros grupos de vírus.^{4,5,6,7}

O RNA genómico expressa o gene numa sequência característica na forma 5'-gene replicase-S-E-M-N-3', onde em cada extremidade estão regiões não traduzidas (UTRs, *Untranslated regions*). A componente estrutural 3'-UTR é necessária para a replicação e transcrição do RNA viral. Desta forma, este conjunto de proteínas

estruturais, não estruturais e/ou acessórias são responsáveis pelos aspetos estruturais e funcionais do SARS-CoV-2. ^{4,5,6,7}

1.2.2. Proteínas estruturais

1.2.2.1. Proteína S

As **proteínas S** são, das proteínas estruturais do SARS-CoV-2, as que apresentam maior dimensão. São glicoproteínas de fusão e estão envolvidas na interação vírus-hospedeiro durante a entrada do vírus na célula. Estas facilitam a ligação da partícula viral à célula hospedeira de forma a mediar a fusão da membrana e entrada na célula. Adicionalmente, são proteínas de classe I, ou seja, são ativadas por um processo de clivagem. ^{4,5,6,7} Estas proteínas podem ser divididas por uma protease semelhante à furina em duas subunidades funcionais, S1 e S2, que são responsáveis pela mediação da fusão de membranas. ^{5,6,7,15} São caracterizadas pela sua estrutura trimétrica como se pode observar na figura 1.3. Cada proteína S é composta por três S1 ligadas a três S2, formando um trímero. A S1 está envolvida na ligação ao recetor celular e envolve o domínio N-terminal (NTD) e o domínio de ligação ao recetor (RBD). Cada RBD do SARS-CoV-2 contém um motivo específico de ligação ao recetor (RBM) de interação com a ACE2. A S2 medeia o processo de fusão entre o invólucro viral e a membrana da célula e compreende o péptido de fusão, a *heptad repeat 1* e a *heptad repeat 2* (HR1 e HR2, respetivamente), a hélice central, o domínio conector, o domínio transmembranar e a cauda citoplasmática. ^{4,5,6,7}

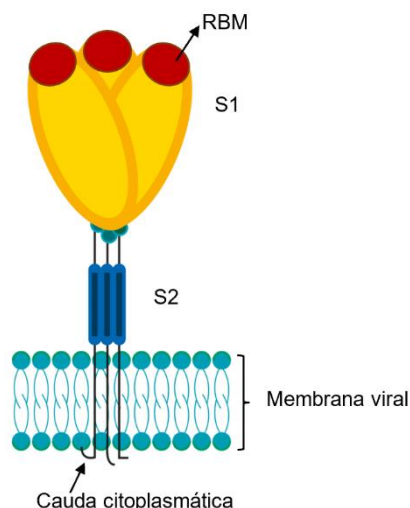


Figura 1.3- Estrutura da proteína estrutural S.(adaptado de 4)

A nível estrutural, a proteína S pode apresentar-se sob duas formas:

→ Fechada, onde esta mantém a sua estrutura nativa e os três RBMs não estão projetados de forma a reconhecer o recetor; ^{4,5,6,7}

→ Aberta, onde os três RBMs já estão projetados de forma a reconhecer o recetor. ^{4,5,6,7}

A forma aberta é a forma necessária para que ocorra fusão da membrana viral com a da célula hospedeira e caracteriza-se pela exposição do RBD, aumentando a afinidade para a ACE2. O processo desta alteração é explicado pela ação de convertases do tipo furina, denominadas proteases, que reconhecem um local de clivagem, identificado por S1/S2. Esta clivagem traduz-se na libertação da S1 e, conseqüente, a transição da S2 para uma forma conformacional favorável a mediar o processo de fusão. No entanto, para que ocorra a entrada do vírus é necessário que a S2 sofra uma clivagem num segundo local, designado S2', cujo reconhecimento pela protease hospedeira leva à ativação da S2 e conseqüente fusão da membrana viral com a da célula. Este processo é realizado principalmente por uma protease da célula chamada protease transmembranar de serina 2. ^{4,5,6,7}

Como já foi mencionado antes a proteína S trata-se de uma proteína altamente glicosilada no NTD. Desta forma, os oligossacáridos presentes nesta região constituem um papel importante no reconhecimento de anticorpos, evitando que o SARS-CoV-2 sofra respostas imunológicas do hospedeiro. ^{4,5,6,7,15}

1.2.2.2. Proteína N

A **proteína N** é a única proteína estrutural dentro do vírus. É um componente crucial que protege o genoma do RNA viral e o envolve num complexo de ribonucleoproteínas (RNP). ^{4,5,6,7,15}

Esta caracteriza-se estruturalmente por possuir três regiões diferentes:

- um NTD;
- uma região central característica;
- um domínio C-terminal (CTD).

A combinação destas regiões é crucial esta para ligar-se ao RNA genómico e, conseqüentemente formar uma RNP. ^{4,5,6,7} Esta desempenha um papel importante no ciclo replicativo do SARS-CoV-2 e intervém na regulação do metabolismo das células infetadas. Assim, esta proteína desempenha um papel importante contra a resposta imune do hospedeiro, combatendo as atividades antivirais, podendo ser considerada um supressor viral do silenciamento do RNA. ^{4,5,6,7,15}

A figura 1.4 mostra a sua localização e a sua sequência proteica.

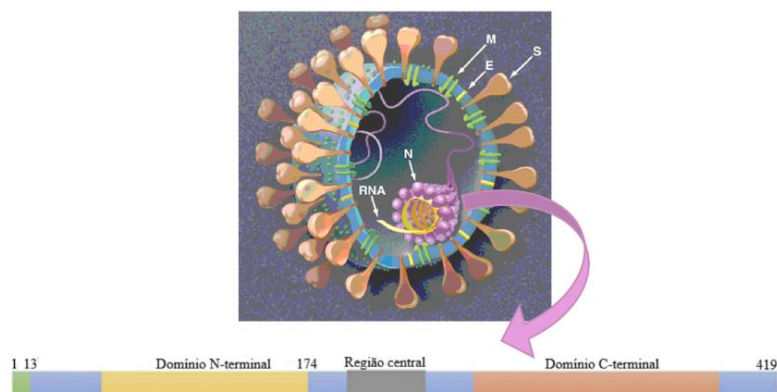


Figura 1.4- Proteína estrutural N e respetiva sequência proteica.(adaptado de 4)

1.2.2.3. Proteína E

A **proteína E** é considerada a proteína estrutural mais pequena de todas. A figura 1.5 mostra a sua localização no vírus. Esta desempenha funções importantes relacionadas com a infeção dos coronavírus, nomeadamente na patogénese e morfogénese. Este tipo de proteína é estruturalmente estável e caracteriza-se por ser composta por um longo e hidrofóbico domínio NTD e um CTD. Esta proteína forma canais iónicos à superfície dos vírus que vão conferir uma maior patogenicidade. ^{4,5,6,7}

Após a entrada do vírus nas células hospedeiras, a proteína E regula a lise viral e a subsequente libertação do genoma. Esta proteína participa na ativação do inflamassoma do hospedeiro. Como a proteína E pode funcionar como um canal de iões, está envolvida na regulação do bombeamento Ca^{2+} para fora do retículo endoplasmático, o que pode levar à ativação da inflamação celular, aumentando assim a resposta antiviral do hospedeiro. ^{5,6,7,15}

Assim, como esta proteína possui domínios de natureza hidrofóbica, pode assumir funções de viroporinas e deste modo, será também bastante essencial na gemulação e posterior libertação da partícula viral da célula hospedeira, mediando os processos patogénicos e induzindo citotoxicidade. ^{4,5,6,7}

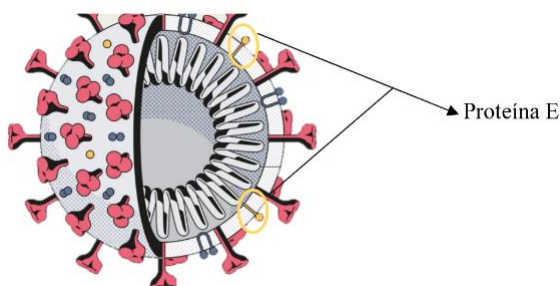


Figura 1.5- Proteína estrutural E (adaptado de 4)

1.2.2.4. Proteína M

A **proteína M** é a mais abundante na partícula viral. Esta exerce funções importantes na morfogénese dos coronavírus, contribuindo para a regulação da transcrição e organização do RNA genómico em partículas virais.^{4,5,6,7}

Vários estudos defendem que esta proteína liga-se à proteína S viral e ao recetor da célula hospedeira para promover a fusão entre as respetivas membranas. No entanto, por outro lado, também foi demonstrado que esta proteína ativa o desenvolvimento de viriões no compartimento intermédio retículo endoplasmático-complexo de Golgi que interagem com a RNP formada a partir da proteína N.^{4,5,6,7}

A nível estrutural, a proteína M é constituída por três domínios transmembranares flanqueados, por um pequeno NTD glicosilado e por um longo CTD. A glicosilação do NTD ocorre no complexo de Golgi após a expressão da proteína M e desempenha uma função vital no tropismo do SARS-CoV-2 e na ativação da via de sinalização de interferões. Esta encontra-se localizada na membrana viral como pode ser observado na figura 1.6.^{4,5,6,7}

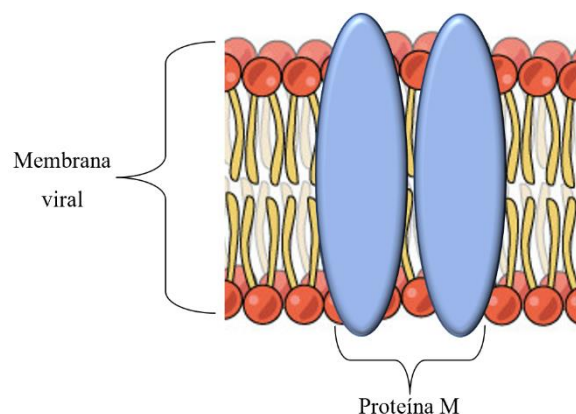


Figura 1.6- Proteína estrutural M (adaptado de 4)

1.2.3. Proteínas não estruturais

Para além das proteínas estruturais mencionadas anteriormente, existem ainda dezasseis proteínas não estruturais (NSP), como já foi dito. Estas são codificadas por genes que se localizam na região 5' do genoma do SARS-CoV-2.^{4,5,6,7,15}

A tabela 1.1 mostra cada uma delas e resume as suas respetivas funções.^{4,5,6,7,15}

Tabela 1.1- Proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. (adaptado de 4)

Nome	Função
NSP1	Inibe a síntese proteica na célula hospedeira, desencadeando uma resposta imunitária
NSP2	Não se conhece totalmente, no entanto sabe-se que interage com os complexos Pro-hibitina 1 (PHB1) e Pro-hibitina 2 (PHB2) hospedeiros que estão envolvidos na biogénese mitocondrial
NSP3	Responsável pela clivagem em três locais da região N-terminal da pp1a e pp1ab, produzindo as proteínas maduras NSP1, NSP2 e NSP3
NSP4	Auxilia no complexo replicação-transcrição (RTC) e induz a formação de vesículas celulares de membrana dupla (DMV) que facilitam a replicação viral
NSP5	Responsável pela formação das restantes NSP (da NSP4 à NSP16), clivando-as em onze locais da região N-terminal da pp1a e pp1ab
NSP6	Induz a formação de autofagossomas do retículo endoplasmático e interfere na degradação de fatores virais nos lisossomas
NSP7	Cofator da NSP12. Em conjunto com a NSP8 e NSP12, formam o RTC, estimulando a atividade RNA polimerase da NSP12
NSP8	Cofator da NSP12. Atua como primase, de forma a iniciar o processo de replicação viral
NSP9	Envolvida na replicação do RNA viral ao ligar-se ao RNA de cadeia simples
NSP10	Cofator nas atividades da NSP14 e NSP16
NSP11	Desconhecida.
NSP12	Responsável pela replicação e transcrição do RNA viral. Forma, em conjunto com várias NSP, o RTC
NSP13	Atua como helicase de RNA de cadeia dupla, auxiliando a replicação e transcrição do RNA viral
NSP14	Essencial na atividade de <i>proofreading</i> durante a replicação do RNA e no capping do mRNA
NSP15	Atividade de endorribonuclease e importante na limitação da exposição de RNA de cadeia dupla a sensores hospedeiros cruciais na defesa contra vírus
NSP16	Essencial no <i>capping</i> do mRNA

1.2.4. Ciclo de vida do SARS-CoV-2

No primeiro passo do ciclo de vida SARS-CoV-2, a proteína S que se encontra na superfície externa do vírus, vai ser responsável pela ligação do vírus ao recetor enzima conversora de angiotensina 2. Seguidamente, dá-se a fusão da membrana celular viral com a hospedeira, levando à entrada do vírus na célula hospedeira. Dá-se a internalização do vacúolo contendo o vírus e conseqüentemente a fusão da membrana com o vírus. Posteriormente, o vírus é libertado no citoplasma da célula hospedeira e há a tradução do genoma viral de modo a produzir pp1a e pp1ab.^{5,6,7,15} Após esta etapa ocorre a clivagem de pp1a e pp1ab, levando à formação das 16 NSPs maduras através de duas proteases de codificação de vírus:^{5,6,7,15}

1. Main Protease (M^{pro});
2. Papain-like Protease (PL^{pro}).

Desta forma existe a formação do complexo de replicação- transcrição (RTC) e leva à replicação do genoma viral e à transcrição das proteínas estruturais codificadas pelo mRNA. A tradução dos mRNA subgenómicos acontece e leva à formação de um novo virião derivado do retículo endoplasmático rugoso. Por fim, existe a libertação do vírus da célula hospedeira através da exocitose para iniciar outra ronda de infeções.

4,5,6,7,15

A figura 1.7 resume de forma esquemática o ciclo de vida do SARS-CoV-2.

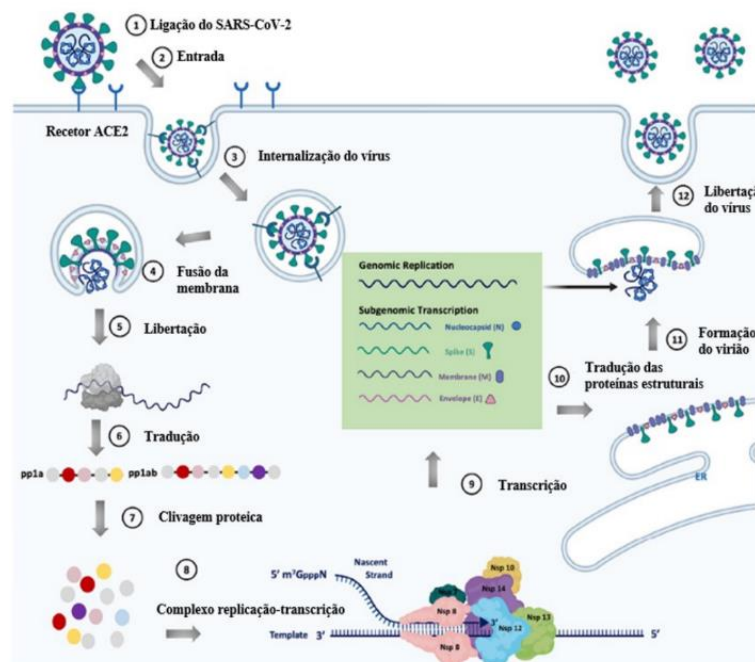


Figura 1.7- Ciclo de vida do SARS-CoV-2. ⁴

1.2.5. Transmissão de SARS-CoV-2

O conhecimento e identificação dos fatores que promovem a transmissão do SARS-CoV-2 são cruciais para conter a pandemia e futuros surtos de coronavírus. Assim como acontece com outros coronavírus, o principal mecanismo de transmissão do SARS-CoV-2 ocorre através do contacto direto ou indireto de partículas virais com a mucosa oral, nasal ou conjuntival. Além disso, contrariamente ao SARS-CoV, este vírus pode ser também transmitido por indivíduos assintomáticos. ^{4,5,6,7}

Transmissão direta

O SARS-CoV-2 transmite-se principalmente de pessoa para pessoa. Todos os indivíduos libertam fluidos respiratórios de diferentes tamanhos através da respiração, da fala, da tosse e do espirro que, por sua vez, podem ser inalados e causar infeções. Este tipo de transmissão ocorre maioritariamente através de aerossóis e gotículas contaminados. Considera-se que a transmissão por gotículas ocorre através de contactos próximos não protegidos com indivíduos infetados até um metro de distância. ^{4,5,6,7}

Atualmente, medidas que se baseiam no distanciamento físico superior a dois metros, no uso correto de máscara, na limitação do número de pessoas em locais fechados e com boa ventilação levaram a uma diminuição da transmissão de SARS-CoV-2 por esta via. ^{4,5,6,7}

Transmissão indireta

Por outro lado, o SARS-CoV-2 pode ser transmitido através do contacto com objetos e superfícies contaminados seguido do toque no rosto, olhos, boca ou nariz. Já foram realizados vários estudos que tinham como principal objetivo a medição da viabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies. Os resultados demonstraram que este vírus é capaz de permanecer infeccioso durante longos períodos (um a sete dias) em aço inoxidável, plástico e vidro. No entanto, o vírus pode permanecer viável durante períodos mais curtos (algumas horas até dois dias) em superfícies de papel e cartão. É de realçar que a sua viabilidade está dependente de fatores como a humidade e temperatura. ^{4,5,6,7}

Até à presente data, o risco de transmissão por esta via ainda não é totalmente conhecido e depende de vários fatores como: ^{4,5,6,7}

→ Concentração viável de vírus numa determinada superfície;

→ Viabilidade do SARS-CoV-2 ao longo do tempo;
→ Quantidade mínima necessária que tem de ser transmitida aquando do toque na boca, olhos ou nariz para que cause infeção.

Porém, várias diretrizes internacionais recomendam boas práticas de higiene para reduzir a propagação do vírus, tais como a lavagem regular das mãos e a limpeza e desinfeção de superfícies passíveis de serem contaminadas. ^{4,5,6,7}

1.2.6. Patogénese da infeção por SARS-CoV-2

A COVID-19 apresenta uma grande variedade de sintomas e manifestações que os doentes podem apresentar, variando desde uma infeção assintomática até doença grave e morte. ^{4,5,6,7} A figura 1.8 mostra alguns exemplos dos sintomas de COVID-19. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention*, qualquer pessoa pode apresentar sintomas leves a graves. Alguns dos sintomas mais comumente descritos de COVID-19 são tosse, febre, mialgia, dispneia e cefaleia. ^{4,5,6,7,14} No entanto, apesar de menos frequentes, também podem existir sintomas como diarreia, náuseas, anosmia, disgeusia (alterações no paladar) e dor de garganta. ^{4,5,6,7,14}

De acordo com os estudos epidemiológicos já realizados, concluiu-se que o período de incubação do SARS-CoV-2 varia entre 1 a 14 dias e que 95% dos indivíduos sintomáticos manifestam sintomas até 14 dias após a exposição. No que diz respeito às cargas virais, estas podem ser semelhantes tanto em infeções assintomáticas como em infeções sintomáticas. ^{4,5,6,7,14}

Relativamente ao período de infecciosidade, para fins de rastreio de contactos, este varia conforme os sintomas: ^{5,6,7,14}

1. Casos sintomáticos:

- desde 48 horas antes da data de início de sintomas de COVID-19, até ao dia em que é estabelecido o fim do isolamento do caso confirmado; ^{5,6,7,14}

2. Casos assintomáticos:

- desde 48 horas antes da data da colheita da amostra biológica para o teste laboratorial até ao dia em que é estabelecido o fim do isolamento do caso confirmado; ^{5,6,7,14}
- quando for possível estabelecer uma ligação epidemiológica: desde 48h após exposição ao caso confirmado, até ao dia em que é estabelecido o fim do isolamento do caso; ^{5,6,7,14}

Em casos graves, a infeção por SARS-CoV-2 pode levar a síndrome de disfunção respiratória aguda (ARDS) e a manifestações extrapulmonares, como lesão renal aguda e trombose. Pode ainda levar a falência de órgãos e até mesmo à morte.

4,5,6,7,14

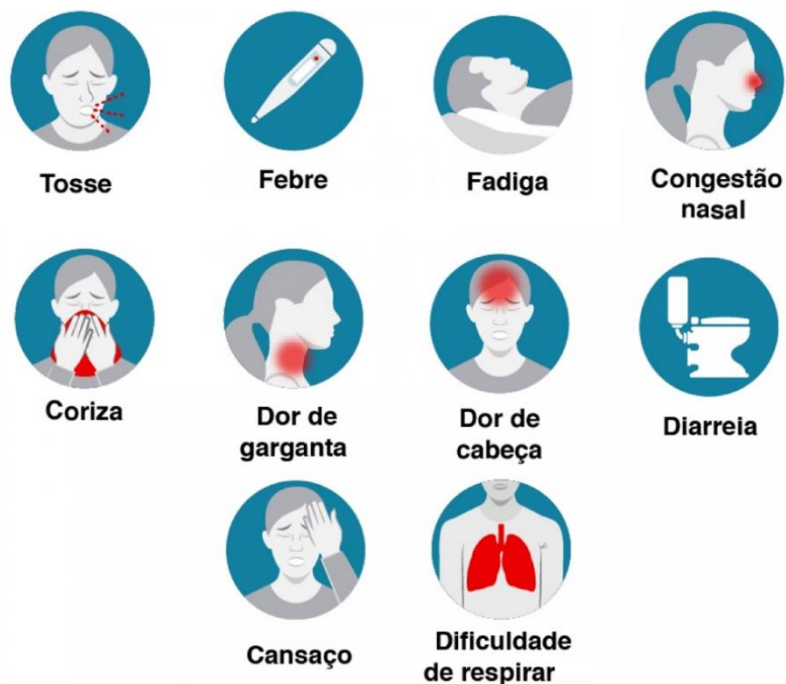


Figura 1.8- Sintomas associados a infeção por SARS-CoV-2 (adaptado de 7)

Outro ponto bastante importante são os fatores de risco que têm sido associados a um aumento da gravidade da doença, sendo estes a idade superior a 70 anos, obesidade, diabetes, doenças renais, imunodepressão grave, doenças pulmonares, doenças cardíacas, cirrose hepática, síndrome de *Down* e doença falciforme. ^{5,6,7,14}

1.3 Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2

O desenvolvimento de um sistema de teste mais rentável e de alta qualidade é muito importante para prevenir a propagação viral e monitorizar os níveis de infeção em doentes com COVID-19.¹⁷ Atualmente já existem diversos tipos de testes disponíveis para a deteção de SARS-CoV-2 baseando-se, por exemplo, na deteção de antígenos, anticorpos ou material genético.

Os imunoenaios de fluxo lateral são a plataforma portátil POC (*Point Of Care*) para a deteção rápida de um analito.¹⁸ Um teste POC é um teste laboratorial realizado perto do local de cuidados do paciente. Estes têm um papel muito importante durante as infeções contagiosas de uma comunidade porque permite que estas diagnostiquem infeções sem a complexa infraestrutura laboratorial.¹⁹

Para um diagnóstico rápido da infeção por SARS-CoV-2, são utilizados os testes de deteção rápida de antígeno (TRAg) para determinação qualitativa do antígeno SARS-CoV-2.²⁰ Estes detetam o antígeno viral através do anticorpo SARS-CoV-2 revestido e imobilizado nas cassetes de teste. Consequentemente, os TRAg podem aliviar a carga de trabalho em hospitais e laboratórios de diagnóstico, assim como melhorar o tempo de resposta.²⁰ Inicialmente, de acordo com a OMS, o papel dos TRAg para deteção de antígeno para SARS-CoV-2 precisava de ser avaliado e não era recomendado para diagnóstico clínico.¹⁶ No entanto, atualmente após vários estudos tanto a OMS, como a DGS já aceitam os TRAg como teste de diagnóstico clínico de COVID-19.²¹

O teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 é um imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral destinado ao deteção qualitativa do antígeno da proteína da nucleocápside (geralmente detetável em amostras do trato respiratório superior durante a fase aguda da infeção) do SARS-CoV-2 em exsudados nasais ou nasofaríngeos de indivíduos com razões para suspeitar de infeção por COVID-19.^{22,23} Este teste de diagnóstico *in vitro*, baseia-se no princípio das reações antígeno-anticorpo, em que a amostra a analisar é colocada numa cassette de ensaio e os resultados são apresentados depois de alguns minutos.^{18,22}

Quando as amostras são processadas e adicionadas à cassette de teste, os antígenos SARS-CoV-2, se presentes na amostra, vão reagir com as partículas revestidas com anticorpo anti-SARS-CoV-2 coloridas. O complexo antígeno-anticorpo migra em direção à membrana por ação capilar, sendo capturado por anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 imobilizados na região da linha de teste e uma linha colorida aparece na membrana na região de teste (T).^{19,22} Para servir como um

controle de procedimento, uma linha vermelha deve de ser sempre visível na região de controle (C) após a adição da amostra de forma adequada na cassete de teste (figura 1.9).^{19,22} Os resultados do teste são interpretados visualmente em 15-30 minutos com base na presença ou ausência de linhas visualmente coloridas.^{19,22}

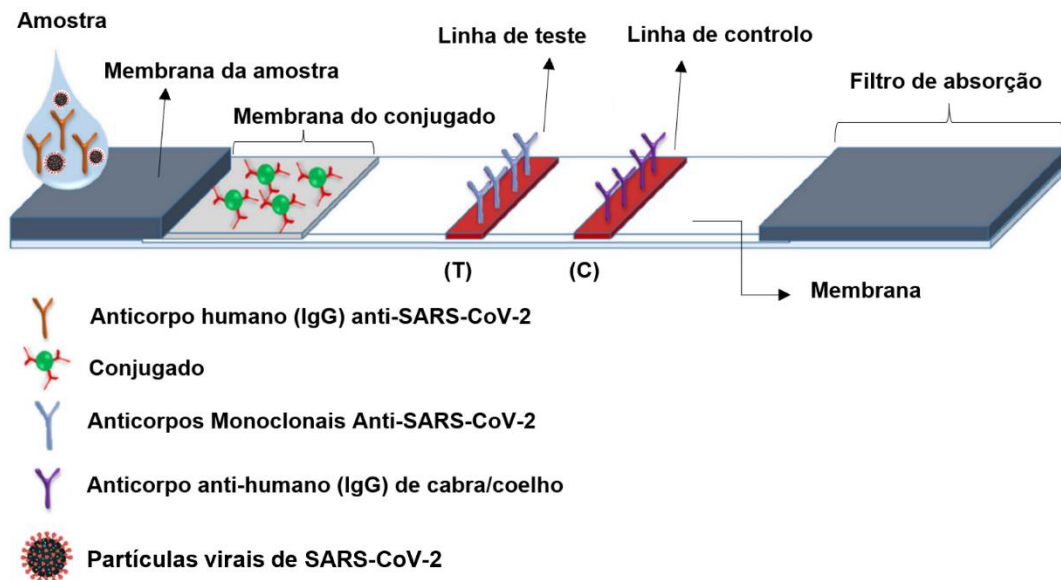


Figura 1.9- Estrutura interna de uma cassete de teste de um teste rápido para detecção de antígeno do SARS-CoV-2. (adaptado de 18)

Os resultados positivos indicam a presença de antígenos virais, no entanto, deve de ser feita sempre uma correlação clínica com o histórico do paciente e outras informações pertinentes de modo a perceber o estado da infeção. Os indivíduos com teste positivo devem isolar-se e consultar o médico.²²

Por outro lado, os resultados negativos são presumíveis, o que remete a uma confirmação com um ensaio molecular, caso seja necessário. Estes não excluem a infeção por SARS-CoV-2 e não devem ser usado como base única para decisões de tratamento ou gestão do paciente, incluindo decisões de controle de infeção.²²

Neste relatório vamos falar especificamente do teste Flowflex™, desenvolvido pela ACON Laboratories, Inc.

O desempenho deste teste, de acordo com a respetiva bula, baseia-se nos valores de:²²

Sensibilidade analítica (S) → Probabilidade condicional de um teste ser positivo dado que o individuo é doente (concordância positiva).²⁴

Esta calcula-se de acordo com a seguinte equação:

$$S = \frac{\text{Número total de verdadeiros positivos}}{\text{Número total de positivos}}$$

Especificidade analítica (E) → Probabilidade condicional de um teste ser negativo dado que o indivíduo é não doente (concordância negativa).²⁴

Calculando-se pela seguinte equação:

$$E = \frac{\text{Número total de verdadeiros negativos}}{\text{Número total de negativos}}$$

Precisão (P) → Mantém a reprodutibilidade (baixa dispersão de resultados) em várias medições sucessivas da mesma amostra. Medida de reprodutibilidade obtida por execução do teste várias vezes, na mesma amostra.²⁴

Esta foi dividida em:

Intra-ensaio:

A precisão interna do ensaio foi determinada utilizando 60 réplicas de amostras (amostra negativa e positiva de antígeno do SARS-coV-2). As amostras foram identificadas corretamente > 99% das vezes.²²

Inter-ensaio:

A precisão entre as séries foi determinada utilizando 60 ensaios independentes na mesma amostra (amostra negativa e positiva de antígeno do SARS-CoV-2). Foram testados três lotes diferentes do teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 usando estas amostras e as amostras foram identificadas corretamente > 99% das vezes.²²

Para amostras nasais, segundo o que consta na bula do kit, o desempenho foi definido com 605 zaragatoas colhidas de doentes sintomáticos individuais com suspeitas de COVID-19. Posto isto, os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 1.2.²²

Tabela 1.2- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste de antígeno com zangaratoas nasais. (adaptado de 22)

Método		rRT-PCR		Resultados
Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2	Resultados	Negativo	Positivo	Totais
	Negativo	433	5	438
	Positivo	2	165	167
Resultados Totais		435	170	605

Desta forma, definiu-se uma **sensibilidade analítica de 97,1%**, uma **especificidade analítica de 99,5%** e uma **precisão de 98,8%**.²²

Já para amostra nasofaríngeas, também segundo a bula do kit, o desempenho foi definido com 299 colhidas também de doentes sintomáticos individuais com suspeitas de COVID-19. Neste caso, os resultados podem ser observados na tabela 1.3.²²

Tabela 1.3- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste de antígeno com zangaratoas nasofaríngeas. (adaptado de 22)

Método		rRT-PCR		Resultados
Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2	Resultados	Negativo	Positivo	Totais
	Negativo	175	3	178
	Positivo	1	120	121
Resultados Totais		176	123	299

Assim, foi definida uma **sensibilidade analítica de 97,6%**, uma **especificidade analítica de 99,4%** e uma **precisão de 98,7%**.²² Todas estas percentagens foram definidas com um **intervalo de confiança de 95%**.²²

O **limite de deteção (LOD)** foi determinado utilizando diluições limitantes de uma amostra viral inativa. Esta foi enriquecida com conjunto de amostra nasal e nasofaríngea negativa humana em diversas concentrações, sendo que cada nível foi testado 30 vezes. Assim foi determinado um **LOD de $1,6 \times 10^2$ TCID₅₀/mL**.²²

Para garantir a máxima qualidade e veracidade nos resultados obtidos, existem algumas **medidas de controlo de qualidade** como é o caso da linha de controlo que está nas cassetes de teste, como já foi falado. Para além disto os kits por norma

trazem zaragatoas de controlo positivo e negativo que servem para realizar os testes de controlo quando são utilizados novos lotes de testes e/ou quando um novo operador executa o teste. Estas também podem ser utilizadas em intervalos periódicos conforme o exigido pelos requisitos locais e/ou pelos procedimentos de controlo de qualidade do utilizador (para consultar a bula de forma detalhada ver Anexo 1- Flowflex™ Teste Rápida de deteção de antígeno do SARS-CoV-2: folheto informativo).²²

A principal vantagem dos imunoenaios de fluxo lateral é que a facilidade de realizar testes fora do laboratório clínico e a rapidez dos resultados. Em resposta à emergência de saúde pública devido ao COVID-19, os investigadores de todo o mundo esforçaram-se por desenvolver imunoenaios de fluxo lateral para detetar anticorpos em SARS-CoV-2 ou antígenos virais.¹⁸ Por outro lado, o teste rápido de deteção de antígeno do SARS-coV-2 apresenta algumas limitações que podem ser consultadas no Anexo 2- limitações dos testes rápidos de deteção de antígeno.

1.4 Testes rápidos de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2

Os testes de antígeno vieram ajudar muito na pandemia mundial de COVID-19 pois são fáceis de realizar e fornecem um diagnóstico rápido. No entanto, estes testes apresentam algumas limitações o que os torna pouco fiáveis para o diagnóstico do COVID-19. Desta forma, os testes rRT-PCR continuam a ser o método ideal para o diagnóstico de COVID-19.²⁵

Já foram realizados vários estudos de modo a avaliar alguns testes moleculares que demorem menos de 1 hora a diagnosticar COVID-19. Porém, devido à pandemia, existe uma escassez global de reagentes e kits, o que leva a uma incerteza sobre a disponibilidade de vários desses testes.²⁵

O teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 é um teste rápido de diagnóstico molecular *in vitro*. Este é realizado com o equipamento VitaPCR™ utilizando uma tecnologia de *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* em tempo real (rRT-PCR) para uma deteção qualitativa do RNA viral do SARS-CoV-2 em exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos de pacientes com casos suspeitos de COVID-19 (Figura 1.10).^{26,27,28,29}

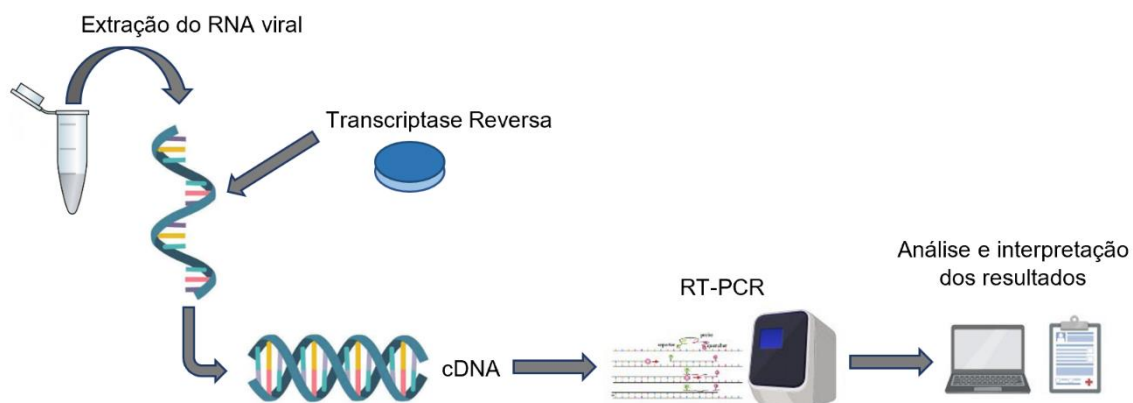


Figura 1.10- Metodologia rRT-PCR. Esta iniciou-se com a extração do RNA viral a partir das amostras a analisar. Seguidamente com o auxílio da transcriptase reversa, obteve-se a sequência de DNA complementar que foi amplificada com a técnica de rRT-PCR. Terminando a amplificação os resultados são analisados e interpretados pelo software e pelo operador.

Este tipo de teste rápido molecular, vai identificar o vírus alvo podendo ajudar no controlo efetivo do surto global. Os resultados servem para uma deteção presuntiva do SARS-CoV-2 pois a identificação definitiva requer testes e procedimentos de confirmação adicionais. Assim, mesmo após um resultado negativo, a infeção por SARS-CoV-2 não é excluída, ou seja, estes não devem de ser utilizados como a única base para diagnóstico, tratamento ou outras decisões para a gestão do paciente.²⁶

Já foram realizados alguns estudos com este novo teste, nomeadamente um estudo realizado entre 28 de setembro e 1 de outubro de 2020 com 534 doentes que se apresentaram ao Instituto de Infeção Mediterranea (Marselha, França), para o diagnóstico do COVID-19.²⁴ O estudo tinha como objetivo avaliar o VitaPCR™ SARS-CoV-2, comparando-o com o método de RRT-PCR de referência que usavam na sua rotina.²⁵ De acordo com os resultados obtidos observou-se que o VitaPCR™ SARS-CoV-2 apresentava uma elevada sensibilidade para a deteção SARS-coV-2 em amostras nasofaríngeas. O teste não demonstrou apenas que era rápido, mas que também era fácil de manusear. O facto de os resultados serem automaticamente interpretados, limita os possíveis erros da interpretação humana. A formação necessária para os operadores é simples e não dura muito tempo. Como o aparelho não é volumoso pode ser instalado num laboratório deslocalizado, perto de pacientes a testar. Por fim, também mostrou ser um sistema seguro, uma vez que o vírus é inativado pelo tampão de colheita fornecido pelo kit.²⁵

De um modo geral, o VitaPCR™ mostrou ser um teste altamente sensível que permite obter resultados em menos de meia hora. Desta maneira, será possível descentralizar os testes de SARS-CoV-2 dos hospitais.²⁵

O teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 está concebido para a deteção do RNA específico de SAR-CoV-2 e do RNA universal do tipo SARS, sendo que ambos os alvos de deteção estão localizados nas regiões do gene da nucleocapsíde (N) do vírus.^{26,27,28,29} A deteção das sequências alvo é feita através da utilização de uma sonda de deteção específica para o SARS-CoV-2 (marcada com um fluoróforo), com medição em tempo-real. É também utilizada uma sonda universal para o vírus SARS e uma para deteção do RNA de controlo interno, para garantir o processamento da amostra e monitorizar a presença de fatores de inibição no processo rRT-PCR. Após este passo, segue-se a amplificação da sequência-alvo com a ajuda dos primers complementares específicos através de uma metodologia de rRT-PCR. Durante todo o processo de reação, é possível visualizar as curvas de progresso do rRT-PCR para os genes-alvo SARS-CoV-2 e SARS universal, bem como para o controlo interno. No final da análise, é dado o CT de cada curva de amplificação. Tudo isto é feito no equipamento VitaPCR™, após a colheita e preparação da amostra, sendo que o tempo de resposta da análise é cerca de 20 minutos.^{26,27}

De modo a garantir que os resultados são fidedignos, o teste também inclui um RNA de cadeia simples artificial para servir como controlo interno (CI), gene da β -globulina humana, de modo a monitorizar todo o processo. Este está contido em cada tubo de reagente e vai monitorizar a validade dos reagentes das reações de PCR associadas com a amostra. O controlo interno vai sempre exibir sinal, porém em algumas circunstâncias é possível que o alvo seja detetado sem o sinal do controlo interno devido à inibição molecular (figura 1.11).^{26,28}

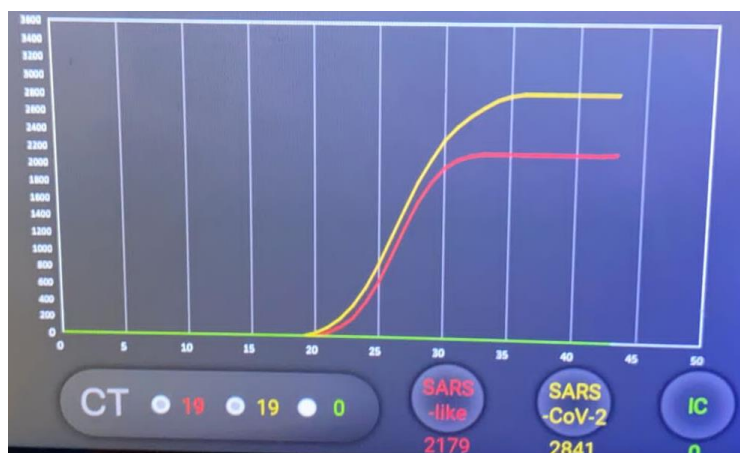


Figura 1.11- Exemplo de resultado onde alvo foi detetado sem a presença do sinal do controlo interno devido à inibição molecular.

Para além de um controlo de qualidade interno, também existe um controlo de qualidade externo.²⁶ O controlo positivo consiste numa transcrição do RNA do segmento do gene N do SARS-CoV-2 cuja sequência é usada como alvo para a sonda universal e para a sonda específica. Adiciona-se 40 µl de controlo positivo no tampão de colheita das amostras e procede-se a respetiva análise onde o resultado final terá de ser positivo. Este vai servir para monitorizar a falha substancial do reagente, incluindo a integridade do primer e da sonda de deteção.²⁶ O tampão de colheita de amostra (SCB) pode ser usado como controlo negativo, onde se realiza a análise e o resultado final terá de ser negativo. Desta forma vamos monitorizar as contaminações do reagente e/ou ambientais.²⁶ Estes testes de controlo de qualidade devem ser sempre usados quando chega uma nova encomenda de kits ou quando se troca de operador.²⁶

No final da reação/análise da amostra existem 5 tipos de resultados possíveis:

- SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Detected);
- SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Not Detected);
- Presumptive Positive (universal SARS-like: Detected);
- Negative;
- Invalid;

O desempenho clínico deste teste, segundo a bula, baseia-se também nos valores de sensibilidade analítica, especificidade analítica e precisão analítica.²⁶ Para fazer esta avaliação foram usadas amostras artificiais devido a dificuldade existente para se obter amostras de pacientes infetados com SARS-CoV-2.²⁶ Neste teste, foi usado como amostra artificial um vírus recombinante que contém o RNA SARS-CoV-2 (Seracare, AccuPlex SARS-CoV-2, número de material 0505-0129). Este foi preparado para fortificar 30 amostras de exsudados nasofaríngeos (NF) ou orofaríngeos (OF) individuais negativos com concentrações diferentes. Foi acrescentado de modo aleatório, de forma casual e em *spiking* no tampão de colheita de amostra onde são lavados os exsudados individuais. Vinte exsudados NF ou OF foram acrescentados em *spiking* a 1,5x LOD, 5 a 3x LOD e 5 a 5x LOD. Por fim, outros 30 exsudados NF ou OF negativos foram deixados sem adição.²⁶

Resumidamente, foram adicionados exsudados NF ou OF em amostras artificiais com várias concentrações e em seguida procedeu-se com o teste de avaliação desta secção.²⁶ Todas as 60 amostras foram distribuídas aleatoriamente a operadores imparciais de modo a serem analisadas com o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 e gerar a percentagem de concordância positiva (sensibilidade

analítica), de concordância negativa (especificidade analítica) e de concordância geral (precisão analítica).²⁶

As tabelas 1.4 e 1.5 mostram os resultados obtidos, segundo a bula, para as amostras de exsudados NF e OF.²⁶

Tabela 1.4- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com zaragatoas nasofaríngeas. (Adaptado de 26)

Exsudados Nasofaríngeos (NF)		Amostra clínica artificial (resultado esperado)	
Variável	Estado	Positivo	Negativo
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	Positivo	30	0
	Negativo	0	30
Sensibilidade analítica (%)*		100% (88,4-100)	
Especificidade analítica (%)*		100% (88,4-100)	
Precisão analítica (%)*		100% (88,4-100)	

*Todas estas percentagens foram definidas com um **intervalo de confiança de 95%**.

Tabela 1.5- Resultados obtidos para avaliar o desempenho do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com zaragatoas orofaríngeas. (Adaptado de 26)

Exsudados Orofaríngeos (OF)		Amostra clínica artificial (resultado esperado)	
Variável	Estado	Positivo	Negativo
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	Positivo	30	0
	Negativo	0	30
Sensibilidade analítica (%)*		100% (88,4-100)	
Especificidade analítica (%)*		100% (88,4-100)	
Precisão analítica (%)*		100% (88,4-100)	

*Todas estas percentagens foram definidas com um **intervalo de confiança de 95%**.

Este teste, Também apresenta limitações que podem ser consultadas no Anexo 3- limitações dos testes rápidos de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2. Mesmo com as limitações apresentadas, a plataforma VitaPCR™ apresenta uma

elevada sensibilidade, especificidade e precisão. Porém, após a realização de vários estudos confirmou-se que em caso de carga viral significativa (ou seja, valores gene N com Ct < 33 por referência rRT-PCR), o VitaPCR™ apresentou taxas de desempenho analítico mais elevadas. Em caso de carga viral moderada ou muito baixa (Ct > 33), os desempenhos analíticos da plataforma diminuíram significativamente, nomeadamente os valores de sensibilidade e precisão, enquanto a sua especificidade se manteve elevada.²⁷ Com isto, é de realçar que o VitaPCR™ demonstrou um desempenho excelente em casos de carga viral significativa, o que o torna adequado para ser utilizado em vários cenários onde é necessário um diagnóstico molecular rápido do SARS-CoV-2.^{27,28,29} No entanto, é de frisar que os ensaios efetuados para demonstrar o desempenho clínico do kit foram feitos com amostras artificiais, o que veio a influenciar os resultados obtidos de forma positiva. Este facto pode vir a justificar a excelente performance do kit em amostras com carga viral elevada e o seu decréscimo de performance em amostras com carga viral moderada ou muito baixa. Para consultar a bula de forma detalhada ver [Anexo 4- VitaPCR™: Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2.](#)

O teste e a plataforma utilizada são de utilização simples e demonstraram uma excelente apreciação para o uso prático da rotina. Este necessita de aproximadamente 2-5 minutos de tempo dispensado por um operador e a transferência da amostra para o tubo de reagente, assim como a intuição da interface do computador foram consideradas as fases com mais potencial para gerar erros.²⁷ Existe uma fácil implantação da plataforma VitaPCR™ em instalações onde os operadores não necessitam de ser especialistas em PCR de alta complexidade, o que mostra que a colocação da plataforma VitaPCR™ em áreas como os serviços de emergência pode ser uma solução para a substituição de testes de antígenos insuficientemente sensíveis para o diagnóstico do COVID-19.²⁷ A implementação de ensaios moleculares POC para o RNA SARS-CoV-2 pode proporcionar benefícios nos cuidados prestados aos doentes internados em hospitais com doença respiratória relacionada com o COVID-19 em termos de confirmação mais rápida da infeção por coronavírus, levando a um período de permanência mais curto e a práticas de isolamento mais rápidas dos doentes testados positivos.^{27,28,29}

Concluindo, foi demonstrado que o VitaPCR™ apresenta uma elevada usabilidade e boa apreciação da sua curta duração de análise (20 min) e necessita apenas de um pequeno local que será ocupado pelo equipamento.^{27,28} Estes vai permitir com que haja uma redução de custos, consumíveis, do tempo de resposta e

tudo isto com a mesma sensibilidade. Vai ainda permitir com que haja a possibilidade de internamento de pacientes no mesmo dia em que fazem o teste, o que é de extrema importância para os utentes.²⁹ Além disso, os desempenhos analíticos da plataforma VitaPCR™ foram elevados e próximos das de referência rRT-PCR em caso de carga viral significativa.^{27,28} Com isto, é notório que o teste VitaPCR™ SARS-CoV-2 é um teste rápido molecular preciso, adequado para a prática clínica para o diagnóstico rápido de COVID-19, especialmente em doentes com sintomas suspeitos de COVID-19.^{27,28,29} Dada a atual situação epidemiológica com um aumento significativo dos testes de PCR, a implementação deste teste poderá ajudar os laboratórios/hospitais a aliviar a sua carga de trabalho e a diminuir custos.²⁹

1.5 Testes de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2

A *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* em tempo real (rRT-PCR) é um método utilizado para detetar a presença de material genético específico em qualquer agente patogénico, incluindo vírus. Esta técnica permite que os resultados sejam observados quase imediatamente, enquanto o processo ainda está em curso, ao contrário do rRT-PCR convencional que só fornece resultados no final do processo.³⁰ A Transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase é um método utilizado em laboratórios e em pesquisas para deteção de diversos vírus, assim como para a avaliação de perfis genéticos de tumores.³⁰

O rRT-PCR é um dos métodos laboratoriais mais utilizados para detetar o vírus SARS-CoV-2.³⁰ Neste processo, a enzima transcriptase reversa transforma o RNA, que carrega a informação genética do SARS-CoV-2, em DNA sintético. De seguida, é formada a cadeia complementar com auxílio da Taq polimerase, obtendo-se assim duas cadeias simples de DNA que será amplificado 100 milhões de vezes.³⁰ Com isto é possível observar com maior clareza se o conteúdo analisado corresponde ao SARS-CoV-2, o que ajuda a analisar se o vírus está presente mesmo que anticorpos ainda não tenham sido recrutados para defender o organismo.^{30,31} O facto desta técnica ser em real time vai permitir monitorizar a amplificação do DNA ao longo dos ciclos (e não apenas no fim do processo) com a ajuda de fluoróforos.

Os equipamentos de rRT-PCR têm a capacidade de emitir e receber fluorescências com um determinado valor/comprimento de onda, permitindo fazer uma

análise retrospectiva do que se fez.³² As fluorescências são sempre medidas na fase de extensão da reação de PCR, que se divide em **3 fases**. A primeira fase é a desnaturação, seguindo-se para o emparelhamento e terminando com a extensão.

Permite ainda comparar amostras de modo a perceber se houve mutações, uma vez que os níveis de fluorescência vão variar.³²

Caso haja uma amplificação exponencial pouco depois do processo começar, significa que existe uma grande quantidade de cópias de DNA, o que não se verifica quando a amplificação é tardia.³²

O teste de rRT-PCR para SARS-CoV-2 relata como negativo ou positivo na prática clínica, usando um limite específico para valores de ciclo térmico qualitativo (Ct). Este cut-off é calculado por um algoritmo que interpreta automaticamente vários parâmetros do processo de amplificação.^{33,34} Quando o sinal fluorescente excede a fluorescência de fundo, os ciclos térmicos são definidos como o limiar do ciclo. Esta é uma medida semi-quantitativa que auxilia na ampla categorização do material genético viral em amostras de pacientes após testes por rRT-PCR. Pode ser variável e classificada como baixa, média ou alta. A tabela 1.6 mostra os valores considerados para cada classificação.³³

Tabela 1. 6- Classificação dos valores de Cts (adaptado de referência 33)

Valor do Ct	Carga viral
17-24	Alta
24-35	Moderada
≥36	Baixa

Um ensaio rRT-PCR padrão executa um máximo de 40 Cts. Quanto maior for a concentração de material genético, menor será o valor de Ct, tipicamente correlacionada com alto risco de infeção. Valores altos de Ct indicam menor quantidade de material genético indicando um menor risco de infecciosidade. No entanto, a baixa carga viral também pode ser devido a um período de incubação, estadios de convalescença ou replicação primária do vírus em outros locais do corpo.^{32,}

^{33, 34, 35}

Existem alguns cenários associados a **valores altos de Cts** como é exemplo:

1. Infeção assintomática com risco de infecciosidade desconhecido onde o estágio da doença não é conhecido;^{33, 36}

2. Infecção pré-sintomática que posteriormente pode evoluir para infecção sintomática com alta carga viral e infecciosidade;^{32, 37}
3. Má colheita das amostras;³³
4. Amostras insuficientes ou degradadas.³³

Embora altos valores de Ct possam estar associados a uma baixa carga viral e infecciosidade reduzida, uma zaragatoa colhida num único ponto no tempo não fornece detalhes sobre a trajetória ou curso subsequente da doença.³³ As pessoas sintomáticas devem ser consideradas potencialmente infecciosas nos primeiros 10 dias do início da doença e as assintomáticas por 10 dias após o resultado positivo. Já indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados com uma doença crítica são mais propensos a libertar vírus e potencialmente infecciosos por mais tempo.^{33, 38, 39}

Antes de realizar a reação de rRT-PCR teremos sempre de fazer previamente a extração do material genético das amostras (que neste caso será RNA).^{40, 41, 42} Para isso é utilizado o kit de isolamento de ácidos nucleicos *MagMAX™ Viral/Pathogen ou MagMAX™ Viral/Pathogen II*. Este foi concebido para isolar e purificar o RNA de vírus e o DNA de bactérias gram-negativas em amostras biológicas como sangue, zaragatoas naso/orofaríngeas, urina e amostras em meios de transporte viral (VTM).^{40,41,42} O kit utiliza a tecnologia de *beads* magnéticas *MagMAX*, garantindo a recuperação reprodutível de ácidos nucleicos de alta qualidade compatível com uma ampla gama de aplicações, como por exemplo o PCR em tempo real.^{40,41,42}

As *beads* magnéticas oferecem muitos benefícios em comparação com outras tecnologias para isolar ácidos nucleicos. Estas ligam-se ao ácido nucleico de forma mais eficiente do que os filtros de fibra de vidro, resultando em rendimentos mais elevados e mais consistentes. Além disso, como não são utilizados filtros e coletores de vácuo, não existe o risco de obstrução do filtro devido a partículas celulares nas amostras.^{40,41,42} O *Dynabeads MyOne Silane* contido no *MagMAX Viral/Pathogen Total Nucleic Acid Isolation Kit* tem uma química de superfície otimizada semelhante a sílica com uma área de superfície altamente específica que permite uma cinética eficiente e uma alta sensibilidade na captura de ácidos nucleicos.

Estes aspetos tornam o *Dynabeads MyOne Silane* ideal para o isolamento de RNA viral e DNA presentes em baixas concentrações em amostras biológicas.^{23, 24, 25} Após o seu isolamento, estes ácidos nucleicos podem então ser eluídos em 50 µL de tampão de eluição para utilização em aplicações a jusante.^{40,41,42} A figura 1.12 esquematiza e ilustra todo o processo de extração de RNA para uma melhor compreensão.

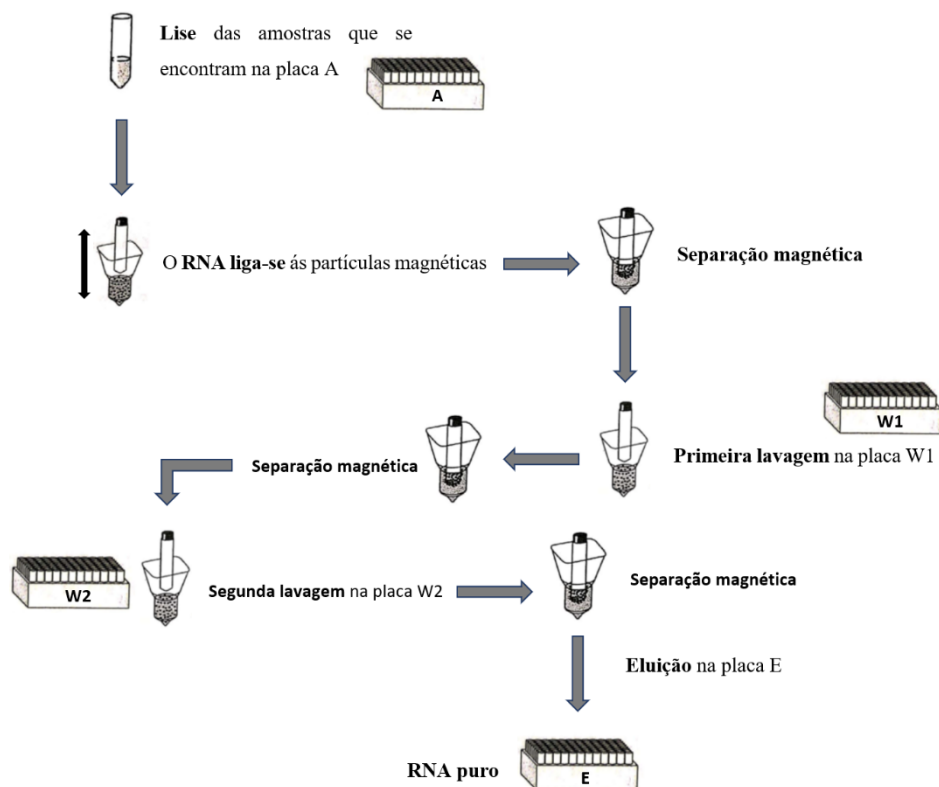


Figura 1.12- Extração do material genético das amostras com o kit de isolamento *MagMAX™ Viral/Pathogen* ou *MagMAX™ Viral/Pathogen II*.

Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay é um ensaio médico de diagnóstico *in vitro* designado para a deteção qualitativa da SARS-CoV-2, Vírus Influenza A virus (Flu A), vírus Influenza B (Flu B) e *Human respiratory syncytial virus* (RSV).⁴³ Este tem como princípio a transcrição reversa em rRT-PCR de amostras como aspirações nasofaríngeas, esfregaços nasofaríngeos, lavagens broncoalveolares, esfregaços orofaríngeos e saliva.⁴³ Através deste método conseguimos fazer uma amplificação e diferenciação simultânea dos ácidos nucleicos alvo do gene S, gene RdRP e gene N do SARS-CoV-2, Flu A, Flu B e RSV com dois Controlos Internos (IC Endógeno e IC Exógeno).⁴³ O IC endógeno é um gene humano que é utilizado para verificar se as colheitas das amostras foram adequadas enquanto que o IC exógeno é utilizado para monitorizar todo o processo de extração do ácido nucleico e para verificar alguma possível inibição do PCR.³⁷ Deste modo, estes dois controlos vão permitir demonstrar se a recolha de amostras foi adequada e validar o ensaio de cada amostra numa única reação.⁴³

Para além dos controlos internos de qualidade vamos ainda ter os controlos externos de qualidade (positivo e negativo). Deste modo garantimos a veracidade dos resultados obtidos em toda a reação de PCR efetuada.⁴³

Relativamente ao seu desempenho clínico, segundo a bula do kit, este foi avaliado com um total de 292 espécimes. Estes consistiam de 8 amostras de aspiração nasofaríngea, 122 amostras de esfregaço nasofaríngeo, 7 amostras de lavagem broncoalveolar, 75 amostras de esfregaço orofaríngeo e 80 amostras de escarro. Posto isto, o desempenho clínico do *Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay* foi avaliado através da comparação com outro SARS-CoV-2 real-time PCR assay e o *respiratory virus real-time PCR assay* que foram CE-IVD aprovados antes. O resultado mostrou mais de 95% de acordo nas amostras clínicas. Assim, foi confirmado que a qualidade do *Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay* é válida. A tabela 1.7 resume os resultados obtidos e contidos na bula (para consultar a parte da bula respetiva ao desempenho clínico do kit em mais detalhe, ver [Anexo 5- Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay: Desempenho Clínico](#)).⁴³

Tabela 1.7- Resultados do desempenho clínico do kit *Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay* (adaptado de 43)

SARS-CoV-2		Comparador Aprovado CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay	Positivo	152	4*	156
	Negativo	4**	132	136
	Total	156	136	292

Precisão: 97,26% (95% CI: 94,67% a 98,81%)

Sensibilidade: 97,44% (95% CI: 93,57% a 99,30%)

Especificidade: 97,06% (95% CI: 92,64% a 99,19%)

* Sequência e confirmação positiva real

** As amostras mostraram os últimos valores Ct (37 a 40), que são indicativas de cargas virais abaixo de LoD.

O programa *Seegene Viewer* vai permitir ao operador a interpretação dos resultados de um modo simultâneo ou de modo individual. Assim como dos controlos internos e externos de qualidade.⁴³ Os valores de Ct obtidos através do software de análise *Seegene Viewer* vão indicar a presença ou ausência de sequências de genes específicos nas reações, indicando logo uma primeira avaliação das curvas de amplificação e o respetivo resultado.⁴³

2. Objetivos

Desde o dia 11 de março de 2020, altura em que foi declarada a pandemia mundial de SARS-CoV-2, que se está a viver até aos dias de hoje, é essencial haver uma testagem regular de toda a população.

Para isso este estágio serviu para executar e compreender todo o processo de testagem desde a colheita da amostra até à análise da mesma e emissão do resultado, sendo este o objetivo geral.

Desta forma teve-se como objetivos específicos:

1. Melhorar e adquirir novas competências relacionadas com a técnica de rRT-PCR e antígeno para a deteção de SARS-CoV-2;
2. Compreender os princípios básicos, metodologia e controlos de qualidade usados de cada técnica que foi executada;
3. Compreender todo o processo de análise de amostras suspeitas de SARS-CoV-2 desde a fase pré-analítica até a fase analítica;
4. Gerir e resolver problemas dentro de um laboratório;
5. Verificar a especificidade dos testes através interpretação crítica dos resultados obtidos em cada um dos testes realizados, de modo a perceber se os resultados são verdadeiramente positivos ou negativos.

3. Material e Métodos

3.1. Amostra

A amostra preferencial para ser usada em todos os kits é um exsudado nasofaríngeo ou orofaríngeo, acabado de colher. O exsudado nasofaríngeo foi o mais utilizado, a menos que o indivíduo não colabore-se, tivesse alguma condição impeditiva ou, em caso de criança, apresente-se idade inferior a 1 ano. Para garantir um bom desempenho e de forma otimizada as amostras não devem ser colhidas com zaragatoas com cabos em madeira ou em alginato de cálcio, pois podem conter um inibidor da reação. Estas devem ser colhidas com zaragatoas floculadas de fibra sintética com cabos de plástico. Os tubos devem ser rotulados com as etiquetas impressas pelo laboratório com o ID do paciente antes da colheita e após a confirmação dos dados.

Exsudado nasofaríngeo (Exsudado NF)

Inserir a zaragatoa cuidadosamente na narina e passar esta diretamente para trás, sem inclinar a extremidade da zaragatoa para cima ou para baixo. Rodando levemente inserir a zaragatoa nas narinas anteriores, paralelamente ao palato, fazendo avançar até à nasofaringe (figura 3.1). Deixar imóvel durante alguns segundos e seguidamente rodar lentamente ao retirá-la.



Figura 3. 1- Colheita de exsudado nasofaríngeo. (adaptado de 17)

Exsudado orofaríngeo (Exsudado OF)

Passar a zaragatoa na faringe posterior e nas amígdalas, evitando sempre a língua (figura 3.2).

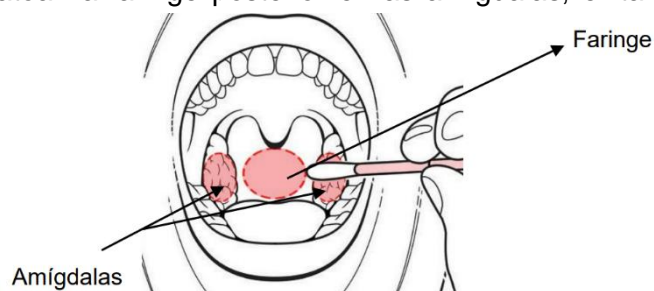


Figura 3.2- Colheita de exsudado orofaríngeo. (adaptado de 17)

3.2. Teste rápido de detecção de antígeno do SARS-CoV-2

1.2.1. Materiais e reagentes fornecidos:

→ Cassetes de teste;



→ Zaragatoas nasofaríngeas descartáveis;



→ Tubos com tampão de extração;



→ Zaragatoa de controlo positivo;

→ Zaragatoa de controlo negativo;

1.2.2. Procedimento:

A figura 3.3 resume o procedimento que deve de ser executado. Para consultar o procedimento mais detalhado, consultar [Anexo 6- Procedimento do teste rápido de detecção de antígeno do SARS-CoV-2.](#)

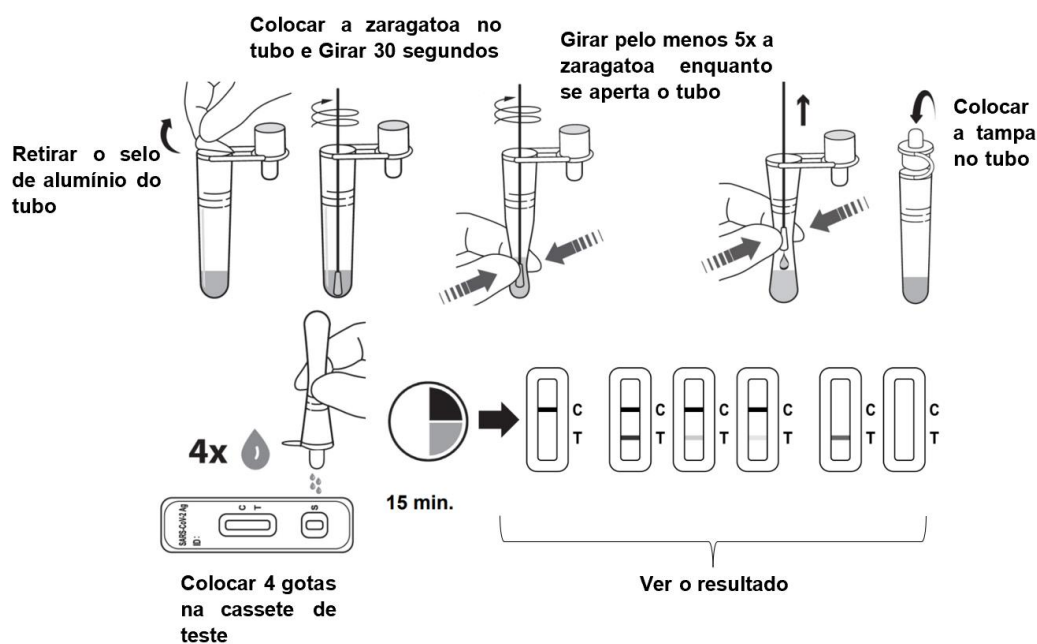


Figura 3.3- Procedimento efetuado no teste rápido de detecção de antígeno do SARS-coV-2. (adaptado de 17)

3.3. Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2

3.3.1. Materiais e reagentes fornecidos pelo kit:



→ Tampão_A de colheita de amostras VitaPCR™ (tubo de plástico com tampa de rosca que contém 4 ml de tampão de colheita de amostra);



→ Tubo de reagente (tubo de teste transparente com reagentes liofilizados para a amplificação alvo do RNA do SARS-CoV-2);



→ Tampa do tubo de reagente (tampa de plástico usada para selar o tubo de reagente após adicionar a amostra);



3.3.2. Materiais e reagentes não fornecidos pelo kit:

→ Equipamento VitaPCR™;



→ Suporte;



→ Micropipeta P100 e pontas descartáveis com filtro;



→ Adaptador de alimentação;

3.3.3. Procedimento:

(Para consultar o procedimento mais detalhado, consultar [Anexo 7- Procedimento do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2](#))

A figura 3.4 resume todo o procedimento. Após a colheita da amostra deve de se inserir o exsudado NF ou OF dentro do frasco com o tampão e girar a zaragatoa contra a parede do tubo pelo menos 15 vezes. Descartar a zaragatoa e fechar o tubo. Antes de iniciar o procedimento estas devem de se encontrar à temperatura ambiente assim como todos os componentes do teste. Para se obter melhores resultados, se for possível, analisar os exsudatos logo após a sua colheita (caso não seja possível analisar imediatamente as amostras as condições de armazenamento encontram-se no [Anexo 8- Transporte e armazenamento das amostras](#)).

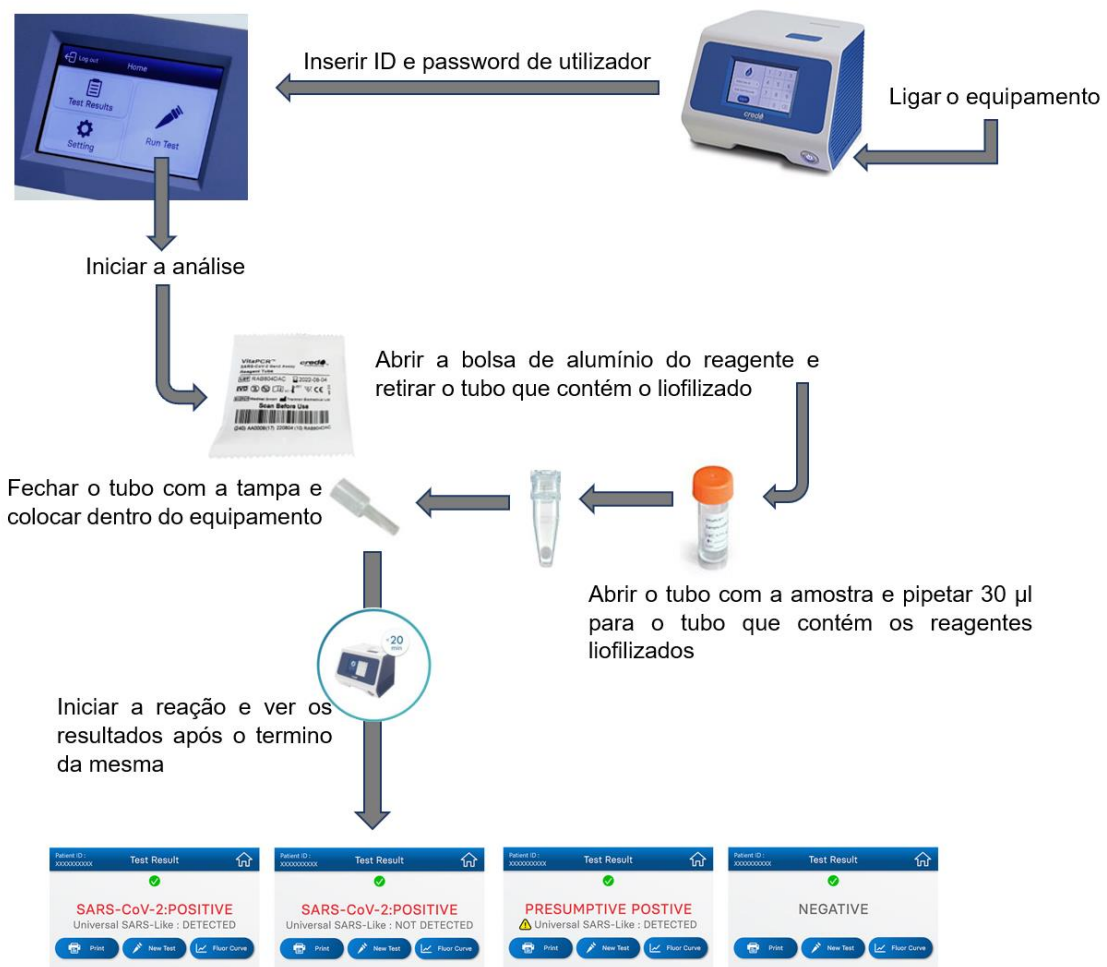


Figura 3. 4- Procedimento efetuado no teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 (adaptado de 21)

3.4. Teste RT-PCR real time

3.4.1. Materiais e reagentes (extração)

- Micropipetas p10, p20, p200 e p1000;
- Pontas descartáveis;
- 4 placas KingFisher™ Deepwell 96;
- 1 placa com pontas KingFisher™ 96 para as *beads* magnéticas DW e uma placa kingfisher™ 96 KF;
- Parafilm;
- *MagMax™ viral/pathogen wash solution*;
- Etanol puro;
- *Ambion™ nuclease-free water*;
- *MagMax™ viral/pathogen elution buffer*;
- *MagMax™ viral/pathogen binding beads*;
- *MagMax™ viral/pathogen binding solution*;
- Controlo interno de amostra do kit de RT-PCR real time *Werfen* (RP-V IC 2);
- *MagMax™ DNA multi-sample ultra 2.0 proteinase K*;

3.4.2. Procedimento

3.4.2.1. Preparação das placas

(Para consultar o procedimento mais detalhado, consultar Anexo 9- Procedimento de extração de RNA- Método automatizado - amostras de 200µL)

Antes de se iniciar o processo de extração tem de se determinar o número de reações necessárias com base no número de amostras a processar, adicionando sempre o controlo exógeno por amostra.

De seguida prepara-se etanol a 80% utilizando etanol absoluto e água sem nuclease para o número de reações necessárias, de modo a que dê para utilizar cerca de 500 µL por reação, mais 10% de excesso de reação. Este por sua vez vai ser utilizado como reagente para a placa do *wash 2*.

É muito importante rotular sempre as placas de extração, que serão:

- Placa *wash 1*;
- Placa *wash 2*;
- Placa de eluição;
- Placa de amostra;

As placas wash 1, wash 2 e de eluição podem ser previamente preparadas antes da extração, sendo estas seladas e armazenadas no frio caso a extração não seja feita até 1 hora após a preparação destas (consultar tabela 10.1, no anexo 6).

Placa Wash 1:



Placa Wash 2:

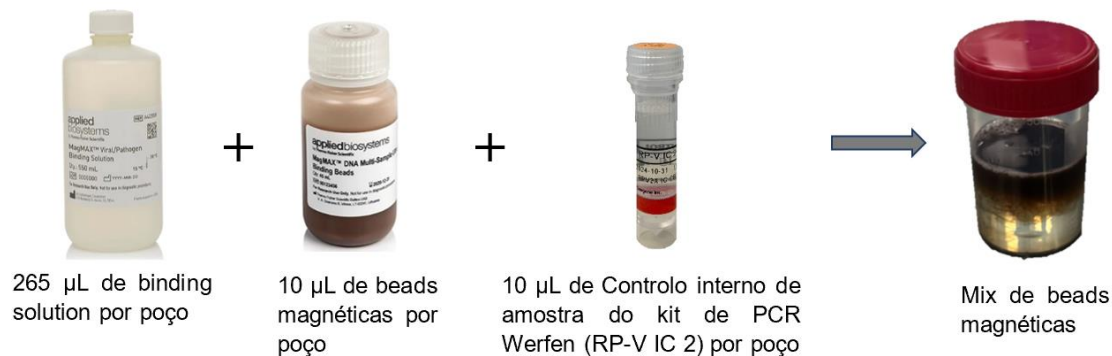


Placa de Eluição:



Antes de se preparar a placa de amostra tem de se preparar a *beadmix* que vai ser um dos componentes que vai colocado na placa em questão.

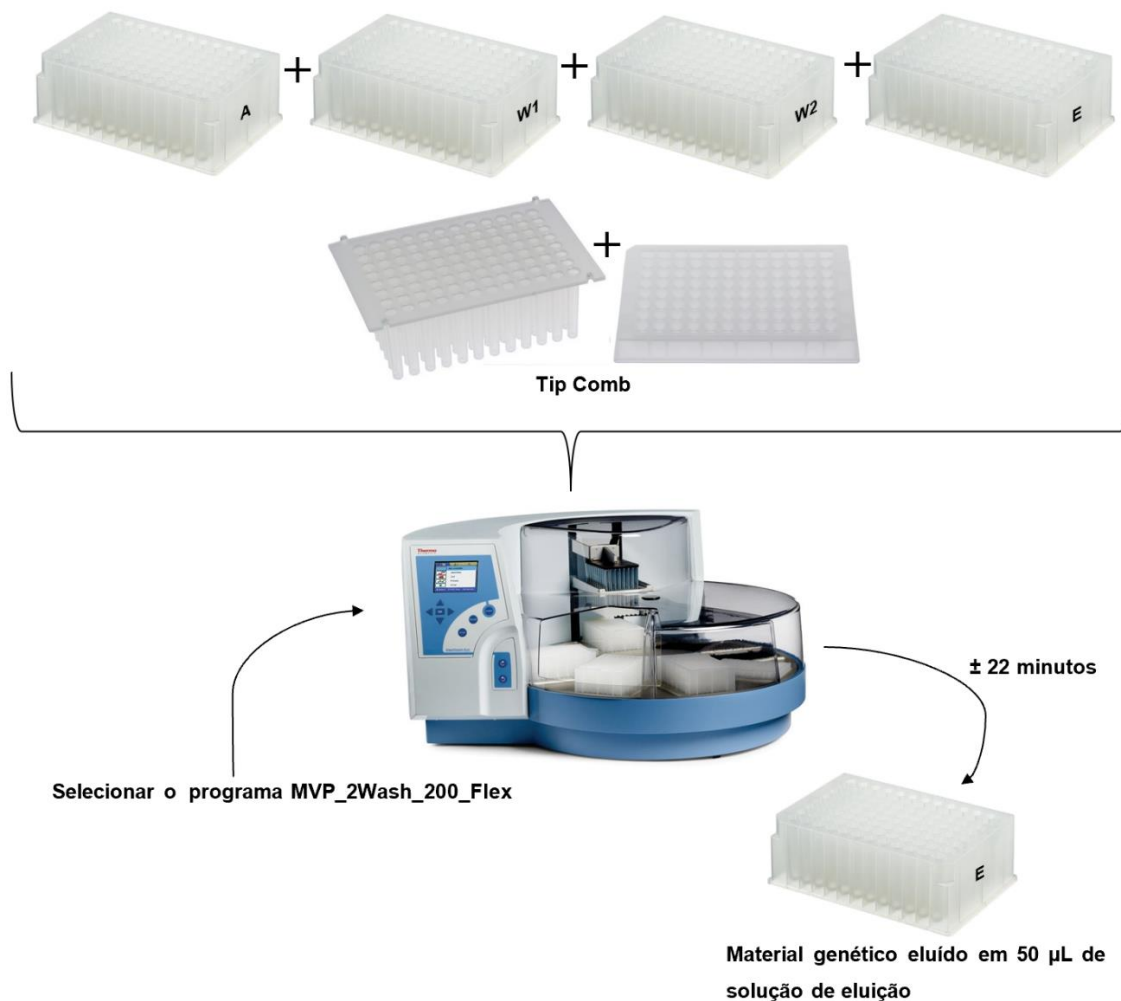
Beadmix:



Placa de Amostra:



Após o termino da preparação das placas, estas devem ser colocadas no aparelho de extração de modo a ser possível iniciar o processo automatizado para extração de material genético em amostras de 200µL.



3.4.3. Materiais e reagentes (rRT-PCR)

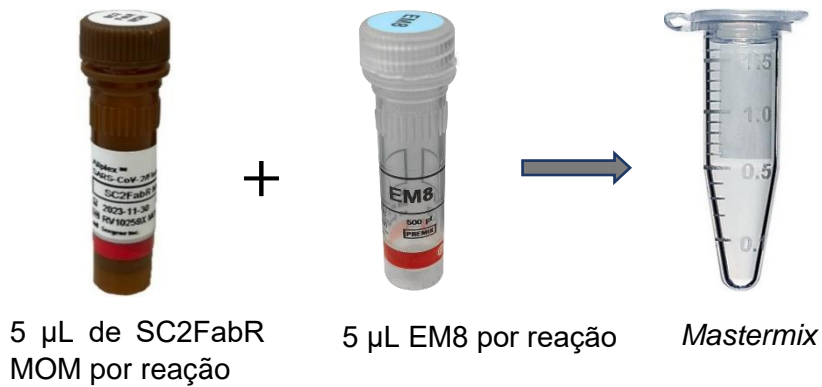
3.4.3.1. Procedimento

(Para consultar o procedimento mais detalhado, consultar [Anexo 10- Procedimento de RT-PCR real time com o kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay](#))

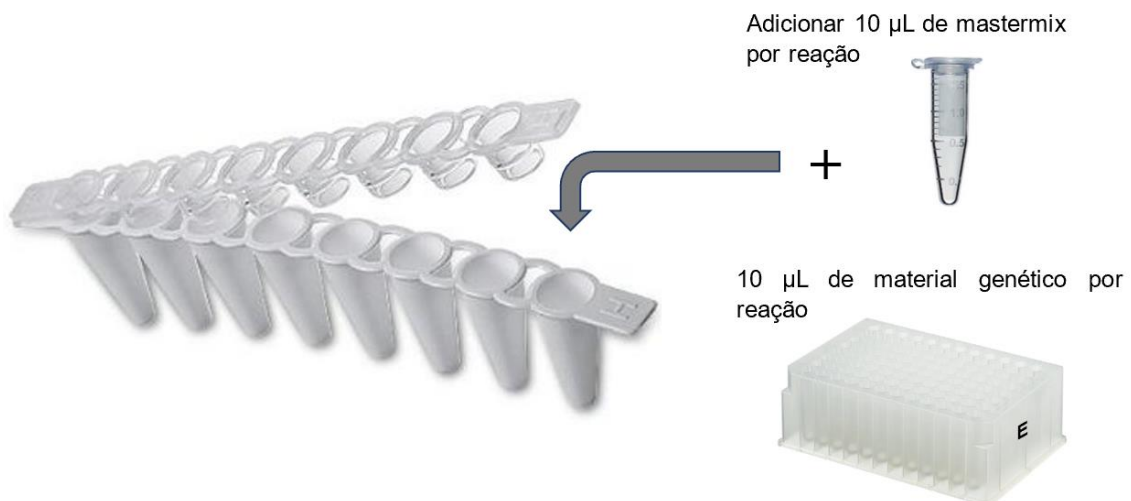
Para a preparação do rRT-PCR numa etapa temos de ter em atenção alguns aspetos tais como a descongelação prévia de todos os reagentes e a sua centrifugação de modo a recolher gotas residuais dentro da tampa.

Após a extração do material genético das nossas amostras, de modo a iniciar a nossa reação de rRT-PCR, o primeiro passo será sempre a preparação da nossa mastermix de acordo com o número de reações que vamos ter (amostras e controlos).

Preparação da *mastermix*:



Após a preparação da *mastermix*, segue-se a **preparação das tiras de PCR.**



Para garantir a qualidade e fiabilidade do nosso processo devem de ser sempre adicionados controlos de qualidade:

→ 10 μ L de *RNase-free Water* (**Controlo Negativo**)

→ 10 μ L de SC2FabR PC (**Controlo Positivo**)



O equipamento deve de ser configurado de modo a ter as características que pretendemos para a nossa reação de rRT-PCR. O **perfil térmico** deverá de ser o apresentado na tabela 3.1.

Tabela 3. 1- Perfil térmico da reação. (adaptado de 43)

Etapa	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min.
2		95°C	15 min.
3	3	95°C	10 s
4		60°C	40 s
5		72°C	20 s
6	Repetir etapa 3-5 mais 2x		
7	42	95°C	10 s
8*		60°C	15 s
9*		72°C	10 s
10	Repetir etapa 7-9 mais 41x		

*Etapa de leitura da placa.



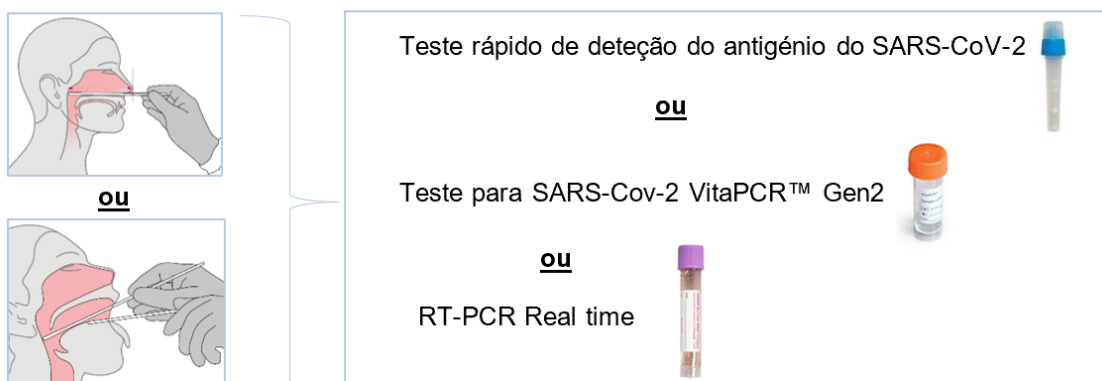
RESULTADOS

4. Resultados

Após a explicação de todas as metodologias utilizadas no estágio realizado e antes de se falar nos resultados que se podem obter em cada uma delas, é de grande relevância falar sobre a rotina diária que foi feita durante o período de estágio.

O *workflow* diário do estágio realizado foi dividido em duas partes:

Parte da manhã:



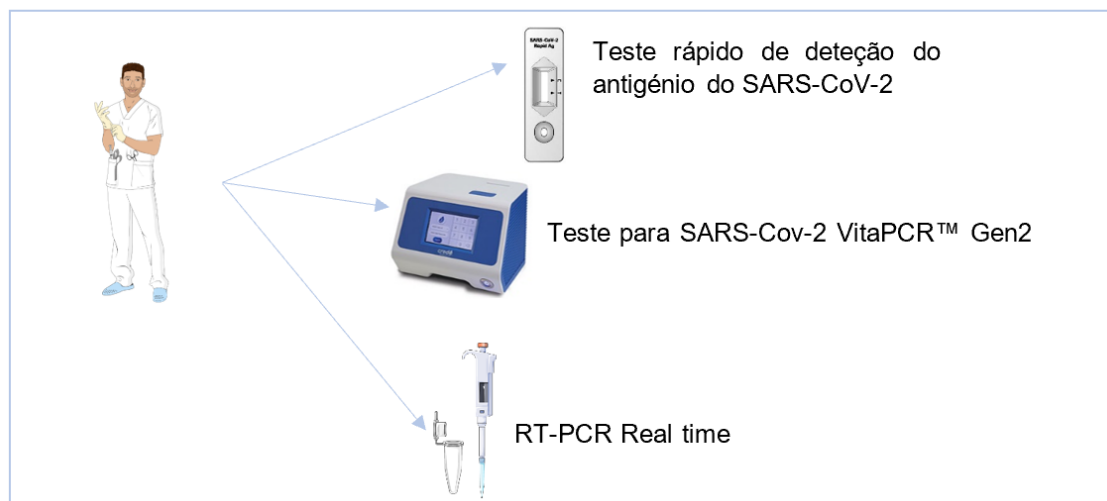
Colheita das amostras

Colocação das amostras no tubo corresponde a técnica que iria

→ As amostras foram seguidamente processadas e analisadas em laboratório por outros técnicos.

Parte da Tarde:

→ Análise das amostras, colhidas na parte da tarde, em laboratório de acordo com a técnica específica a ser utilizada e interpretação crítica dos resultados obtidos.



Durante o período do estágio foram realizados no laboratório, 104 114 testes de antígeno, 13 343 testes VitaPCR™ e 115 645 testes rRT-PCR.

De um modo geral o estágio pode ser resumido de acordo com o seguinte cronograma (tabela 4.1).

Tabela 4. 1- Cronograma de tarefas e respetiva duração, realizadas durante o estágio.

	setembro	outubro	novembro	dezembro	janeiro	fevereiro
Tarefa 1						
Tarefa 2						
Tarefa 3						
Tarefa 4						
Tarefa 5						

Tarefa 1: Aprendizagem dos métodos existentes no laboratório para a testagem de SARS-CoV-2 (testes de antígeno, rRT-PCR e o VitaPCR™ real time PCR);

Tarefa 2: Pesquisa e recolha de informação científica relativa ao SARS-CoV-2 e os todos os métodos de testagem efetuados;

Tarefa 3: Tratamento e interpretação dos resultados obtidos;

Tarefa 4: Discussão crítica dos resultados obtidos nos testes de antígeno, rRT-PCR e VitaPCR™ real time PCR, bem como da sua metodologia e eficiência;

Tarefa 5: Escrita de uma proposta de investigação com base no tema do estágio realizado.

4.1 Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2

Os resultados possíveis e apresentados por este método dividem-se em três tipos:

1. Negativo

Este tipo de resultado caracteriza-se pelo aparecimento de apenas uma linha vermelha, que aparece na região da linha de controle identificada com a letra “C” (figura 4.1).

Este resultado significa que não houve nenhum antígeno SARS-CoV-2 que foi detetado. No entanto, um resultado negativo não descarta COVID-19 e não deve ser usado como a única base para tratamento ou gerenciamento das decisões dos pacientes, incluindo decisões relativas ao controle da infeção.

A quantidade de antígenos numa amostra pode diminuir conforme a duração da doença aumenta. Os resultados negativos devem ser tratados como presuntivos e confirmados com um ensaio molecular (rRT-PCR, por exemplo), para o tratamento do paciente.



Figura 4. 1- Teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado negativo

2. Positivo

O resultado positivo caracteriza-se pelo aparecimento de duas linhas vermelhas distintas. Uma linha vermelha na região da linha de controle (**C**) e a outra linha vermelha na região da linha de teste (**T**) (figura 4.2).

Com isto percebemos que a presença do antígeno SARS-CoV-2 foi detetada e o paciente tem uma grande probabilidade de estar infetado com o vírus, sendo também considerado contagioso.

A intensidade da cor vermelha na linha de teste (T) pode variar dependendo do nível do antígeno SARS-CoV2 presente na amostra. Portanto, qualquer tom de vermelho na região da linha de teste (T) deve ser considerado positivo.

O resultado pode e deve ser sempre confirmado com um ensaio molecular (rRT-PCR, por exemplo), para o diagnóstico e tratamento do paciente.

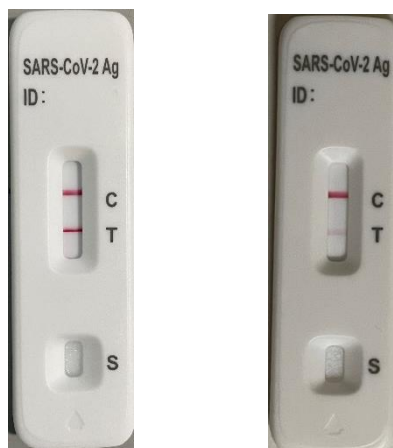


Figura 4. 2- Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado positivo

3. Inválido

Neste resultado a linha de controle não aparece. Isto pode acontecer devido a um volume de amostra insuficiente ou uma operação incorreta, por exemplo (figura 4.3).

Desta forma, o teste deve de ser repetido com uma nova cassete de teste, caso ainda haja amostra. Se o problema persistir ou já não houver amostra deve de se colher uma nova amostra e repetir o teste.



Figura 4. 3- Testes rápidos de deteção de antígeno do SARS-CoV-2 com resultado inválido

4.2 Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2

Neste teste os resultados aparecem escritos no ecrã do equipamento e dividem-se nos seguintes tipos:

1. SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Detected)

A presença de RNA de SARS-CoV-2 é confirmada. São detetados tanto o RNA específico do SARS-CoV-2 com o RNA universal do tipo SARS (figura 4.4). O controlo interno é detetado de modo a validar o resultado.



Figura 4. 4- Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com resultado positivo (RNA universal do tipo SARS: detetado)

2. SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Not Detected)

Aqui o RNA de SARS-coV-2 também foi detetado mas o RNA universal do tipo SARS não foi. Isto pode ser causado por uma carga viral baixa na amostra ou a acumulação de mutações ao longo do tempo (figura 4.5). Mais uma vez o controlo interno é detetado, validando o resultado.



Figura 4. 5- Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com resultado positivo (RNA universal do tipo SARS: não detetado)

3. Presumptive Positive (universal SARS-like: Detected)

Um resultado deste tipo indica que o RNA específico de SARS-CoV-2 não foi detetado devido a uma carga viral baixa na amostra ou a acumulação de mutações ao longo do tempo, por exemplo. No entanto, o RNA universal do tipo SARS foi detetado, assim como o controlo interno (figura 4.6).

Neste caso, as amostras devem de ser testadas novamente.

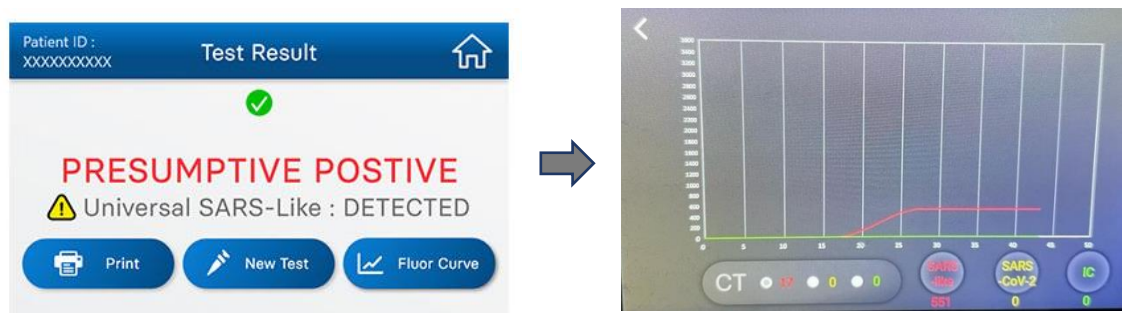


Figura 4. 6- Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com resultado presuntivo positivo

4. Negative

Aqui nem o RNA específico de SARS-CoV-2, nem o RNA universal do tipo SARS foram detetados. O controlo interno é o único a ser detetado de modo a validar o resultado (figura 4.7).

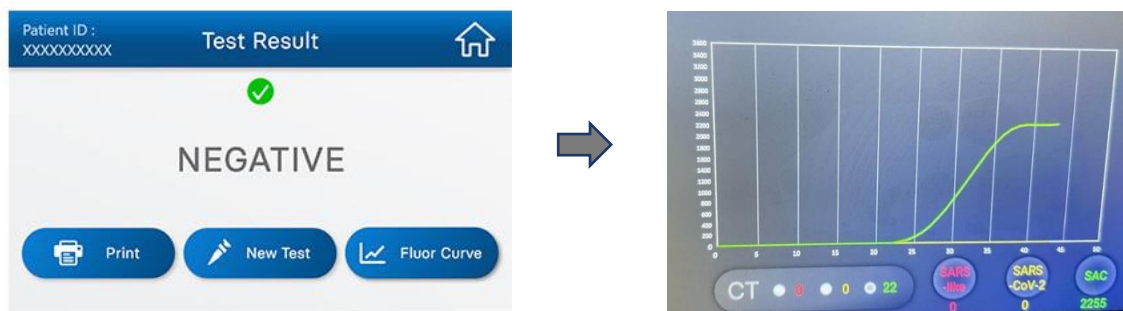


Figura 4. 7- Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com resultado negativo

5. Invalid

Neste caso, nada foi detetado na amostra incluindo o controlo interno (figura 4.8). Deve de se repetir a colheita da amostra e a análise.



Figura 4. 8- Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com resultado inválido

4.3 Teste rRT-PCR

No rRT-PCR os resultados, após a sua exportação para o programa de interpretação, aparecem como está demonstrado na figura 4.9.

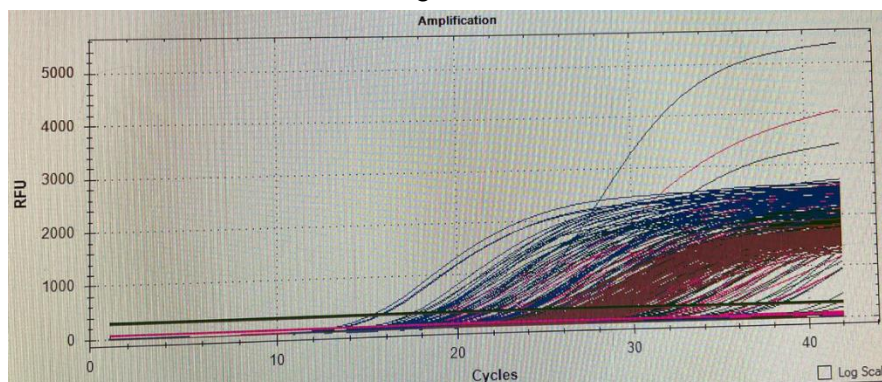


Figura 4. 9- Resultados de uma reação de rRT-PCR exportados para o programa de interpretação

Porém os resultados podem e devem de ser vistos e interpretados de forma individual. Estes podem ser divididos em 3 grupos:

→ **Resultados negativos**, onde não houve qualquer tipo de amplificação (figura 4.10) a não ser o controlo endógeno (gene humano) e exógeno (adicionado na etapa de extração - RP-V IC 2);

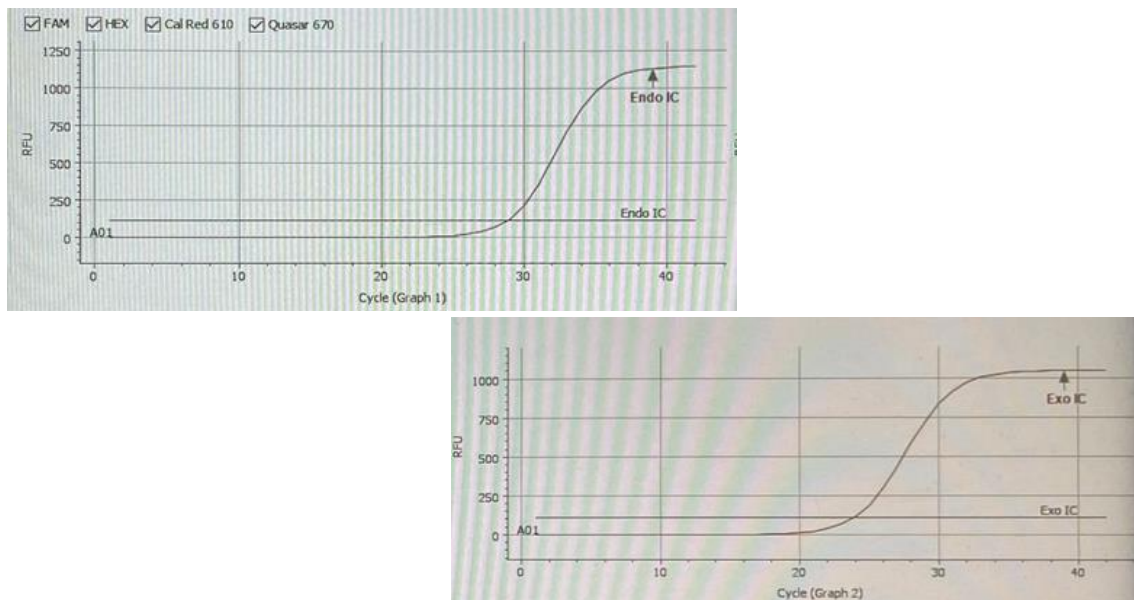


Figura 4. 10- Amostra com resultado negativo após uma reação de rRT-PCR com Ct de 28,85 (controlo endógeno) e Ct de 23,92 (controlo exógeno)

→ **Resultados positivos**, onde houve amplificação de pelo menos dois dos três genes que o kit amplifica (S, RdRP e N) assim como dos controlos endógeno e exógeno (figura 4.11);

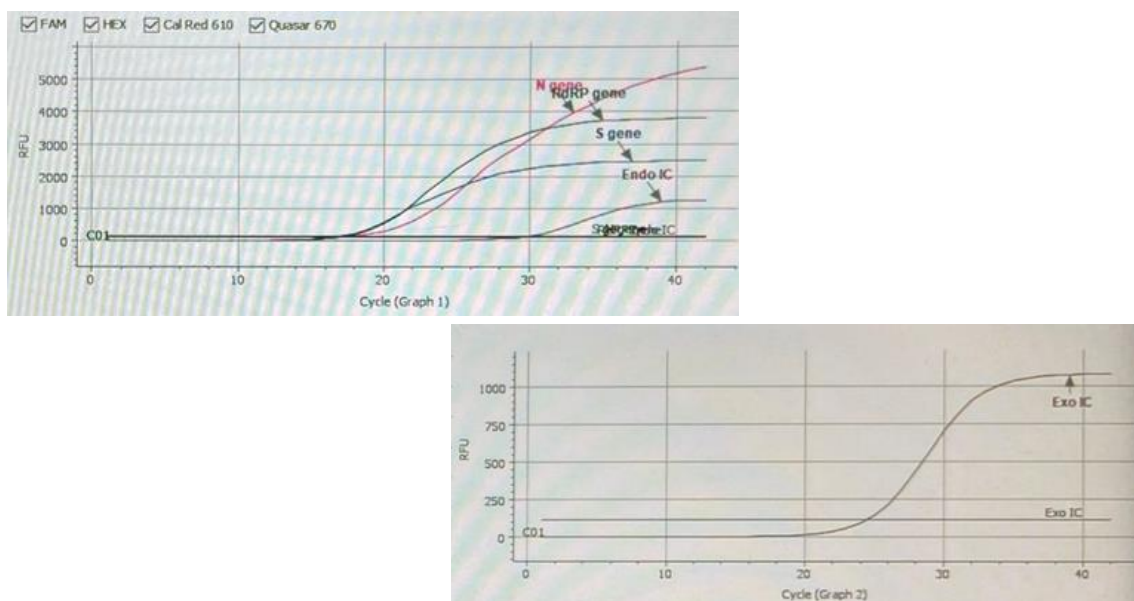


Figura 4. 11- Amostra com resultado positivo após uma reação de rRT-PCR

→ **Resultados inválidos**, onde houve amplificação de algum genes que o kit amplifica (S, RdRP e N) mas de um modo tardio (para aquilo que se considera como positivo) assim como dos controlos endógeno e exógeno (figura 4.12). Por outro lado se não houver qualquer tipo de crescimento dos controlos de qualidade o resultado também é considerado inválido;

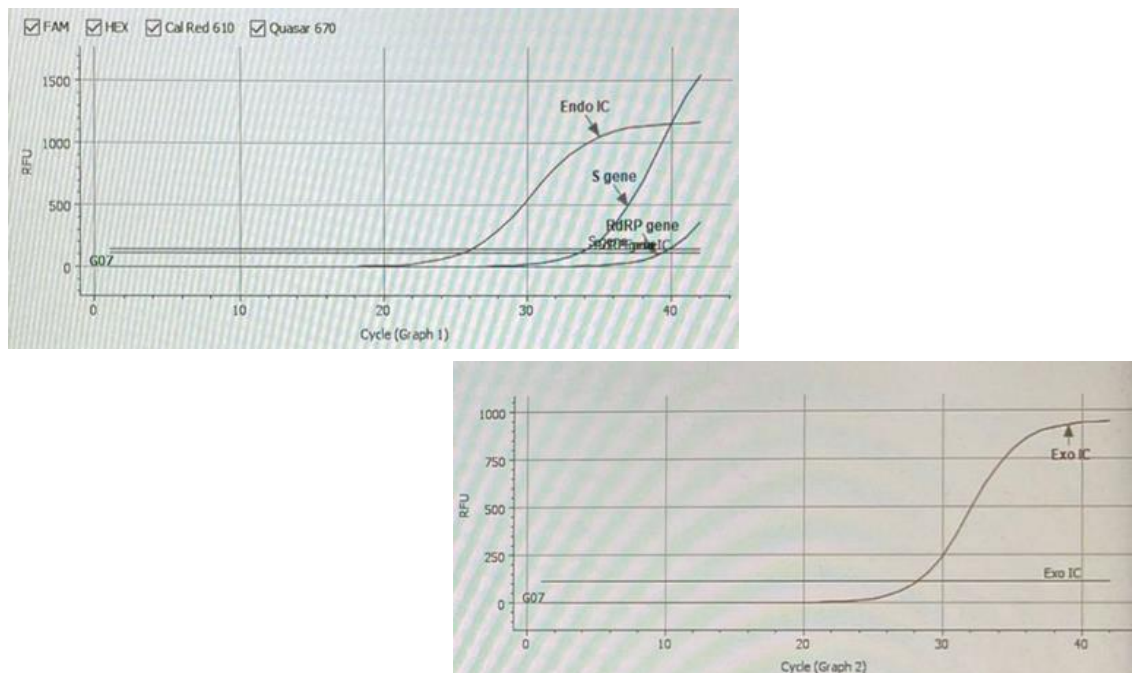


Figura 4. 12- Amostra com resultado inválido após uma reação de rRT-PCR

O processo completo faz o total de 42 ciclos (Ct). Porém os resultados são vistos apenas até ao 40º ciclo.

Os resultados são considerados válidos apenas quando ambos os controlos (endógeno e exógeno) são amplificados assim como os controlos de qualidade (positivo e negativo). Porém esta amplificação não deverá ser tardia (Ct < 32). Caso seja a análise deve de ser repetida.

5. Discussão dos resultados

As amostras desde que chegam ao laboratório até serem analisadas são submetidas a alguns processos. Primeiramente é feita uma triagem de modo a conferir alguns dos fatores que podem influenciar todo o processo de análise. Nesta fase são avaliados aspetos da fase pré-analítica como:

- Identificação correta da amostra;
- Armazenamento, conservação e transporte correto da amostra, desde o local onde se realiza a colheita até ao laboratório onde se realiza a análise;

Caso algum destes aspetos não esteja conforme, é necessário pedir uma repetição de colheita da amostra.

Após o término de qualquer umas das técnicas abordadas neste relatório, os resultados devem de sofrer uma análise e interpretação crítica antes de serem enviados para os utentes. Posto isto, sabemos que existem e devem ser considerados vários fatores também nas fases analítica e pós-analítica como:

- Correto manuseamento da amostra, de modo a evitar contaminações;
- Validação dos controlos de qualidade após a análise da amostra;
- Situação clínica do utente (sintomatologia, contacto direto com um caso confirmado de COVID-19, etc);

A discussão divide-se em duas partes. A primeira parte é dedicada apenas ao teste rápido de antígeno (TRAG- teste rápido de antígeno) e a segunda aos testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos-TAAN (VitaPCR™ e rRT-PCR).

5.1 Diagnóstico por deteção de antígeno (presença/ausência do antígeno do SARS-CoV-2)

Nos TRAG (Teste rápido de deteção do antígeno do SARS-CoV-2), conforme abordado no ponto 4. do relatório, os resultados podem ser apresentados nas seguintes três formas: negativo, positivo e inválido²²

O aparecimento da linha de controlo (C) na cassete de teste tem de ser sempre visualizado, caso contrário o controlo interno não foi validado e deste modo o resultado não é fiável.²²

No entanto, este não é o único ponto que se deve de ter em consideração quando se está a interpretar os resultados dos TRAG.

É sempre imperativo esperar o tempo que o kit em uso indica para a visualização de um resultado (neste caso são 15-30 minutos), pois podemos ter uma positivação tardia do antígeno. Após o término dos 30 minutos, se houver alguma alteração no resultado, esta não deve ser considerada. No entanto, este aspeto é especialmente importante no caso de um **resultado negativo ou inválido**, pois sendo o resultado positivo, o mesmo não poderá passar para negativo, ou seja, uma vez que apareceram as duas linhas coradas (na zona de controlo e na zona de teste) estas não desaparecem e o resultado não seria alterado.²²

Em todos os casos, deve ser vista uma linha corada na região da zona C, e em caso de ser positivo, apresenta também uma linha corada na região da zona T. No entanto, estas linhas nem sempre tem a mesma tonalidade. Esta tonalidade pode ser mais ténue ou mais intensa. A tonalidade mais ténue pode ocorrer em duas situações, falta de amostra ou baixa carga viral. Se a amostra não for colhida da forma correta pode haver uma quantidade reduzida de amostra e desta forma a linha de controlo pode apresentar uma cor mais clara (validando na mesma o resultado) mas indicado que provavelmente esta não foi feita da melhor maneira. Em caso de aparecer uma linha corada, também mais ténue, na região da zona T, indica um resultado positivo com baixa carga viral ou assim como explicado anteriormente, uma colheita que não foi feita da melhor forma.⁴⁴

Uma quantidade de amostra reduzida também pode gerar um resultado falso negativo. Uma colheita efetuada de forma errada, por exemplo, numa pessoa que está positiva, pode resultar numa amostra que apresenta uma carga viral insatisfatória que não é detetada pelo TRAG. Nesta situação teremos um resultado falso negativo. Uma vez que os utentes antes de realizarem qualquer teste de diagnóstico de SARS-CoV-2 preenchem um formulário com a sua sintomatologia, contactos de risco e a realização prévia de um autoteste, este também deve de ser tido em consideração aquando da interpretação dos resultados. Outro cenário possível devido a uma quantidade reduzida de amostra é o não aparecimento de qualquer linha corada, o que será interpretado com um resultado inválido.^{22,44}

Os resultados falsos negativos, para além do que já foi dito, também podem ocorrer devido a uma redução da sensibilidade comparativamente à técnica de rRT-PCR. Esta redução é maior no caso de o individuo ser assintomático.⁴⁵

Outro fator que pode influenciar negativamente os resultados é a análise da amostra após 1 hora da colheita da mesma. O kit aconselha a que as amostras sejam analisadas imediatamente após a colheita ou até no máximo 1 hora após a realização

da mesma. Quando este período de análise não é cumprido a amostra pode já não ser viável para análise e conseqüentemente afetar os resultados. Fatores como a temperatura e a humidade interferem com a qualidade da nossa amostra e também do kit. As amostras devem permanecer à temperatura ambiente (15-30°C) e o kit deve permanecer armazenado entre 2-30°C, porém deve estar à temperatura ambiente antes de ser utilizado.^{22,44}

Relativamente à possibilidade da existência de um resultado falso positivo, estes apesar de não tão comuns, também existem. Um estudo realizado em janeiro de 2022 mostrou que alguns dos fatores que podem levar a resultados falsos positivos são problemas de fabrico nos lotes dos kits ou problemas de qualidade na forma como o teste foi executado.⁴⁶

Um estudo realizado em abril de 2021, verificou uma diferença de resultados da mesma amostra, analisada por TRAG e rRT-PCR. Foram detetadas amostras com um resultado falso positivo. A maioria destes positivos exibiu uma intensidade da linha na zona de teste mais fraca do que a intensidade da linha na zona de controlo. Os autores justificaram esta discrepância entre resultados com o facto de ter existido diferenças no armazenamento de amostras entre os dois testes.⁴⁴

Os autores também verificaram uma associação entre a sensibilidade do TRAG e os valores de Ct na técnica de rRT-PCR. Valores de Ct < 25 estavam associados a uma maior sensibilidade, que diminuía notavelmente em amostras com valores de Ct > 25. Este acontecimento foi justificado pelas diferenças de carga viral das amostras.⁴⁴

Estas descobertas indicaram que os TRAG podem ter uma elevada sensibilidade para detetar indivíduos contagiosos, uma vez que uma carga viral relativamente elevada pode ter importância para a transmissão da doença.⁴⁴

Posto isto, os autores concluíram que os testes rápidos de antígeno têm uma elevada sensibilidade no que diz respeito à infecciosidade da amostra, sendo uma ferramenta valiosa para diagnosticar indivíduos contagiosos e controlar a transmissão de doenças na pandemia em curso.⁴⁴

Vários estudos já foram feitos e de acordo com um que foi realizado em novembro de 2021, os testes de antígeno podem ter uma maior sensibilidade na deteção do SARS-CoV-2 no prazo de 7 dias após o início dos sintomas, o que indica que estes podem ser adequados para deteção viral durante a fase precoce da doença.⁴⁷

Os testes de antígeno detetam proteínas SARS-CoV-2, como já foi mencionado e os resultados positivos dos testes de antígeno indicam a presença do

vírus. Os testes de antígeno são mais propensos a ter um melhor desempenho em pacientes com altas cargas virais (valores de Ct \leq 25), que geralmente aparecem na fase pré-sintomática (1-3 dias antes do início do sintoma) e fases sintomáticas precoces de COVID-19 (nos primeiros 5-7 dias de doença).⁴⁷

Vários estudos publicados têm discutido o desempenho diagnóstico dos testes de antígeno para o COVID-19 de modo a fornecer provas de que os cuidados de saúde aliados controlam a pandemia.⁴⁷ Schuit et al demonstrou que os testes de antígeno SARS-CoV-2 são capazes de detetar contactos próximos de pessoas com infeção SARS-CoV-2 confirmada a partir do dia 5, após o contacto.⁴⁸ Dinnes et al relatou que as sensibilidades dos testes de antígeno para COVID-19 são mais altas na primeira semana de doença, quando as cargas virais são mais altas em indivíduos com sintomas.⁴⁹ O desempenho do teste de antígeno é inconsistente e depende do fabricante. Desta forma, o operador pode não ter impacto no desempenho do diagnóstico.⁵⁰

Em suma, vários estudos defendem que os testes de antígeno têm uma excelente especificidade e alta sensibilidade na deteção do SARS-CoV-2 em pacientes com infeção COVID-19 no prazo de 7 dias após o início dos sintomas.⁴⁷ No entanto existem vários fatores associados que podem influenciar os resultados como foi explicado anteriormente.

5.2 Testes Moleculares de Amplificação de Ácidos Nucleicos **-TAAN**

Dentro deste segundo tipo de diagnóstico, que tem como principal objetivo verificar a presença/ausência de RNA viral, foram abordados dois testes diferentes. O primeiro foi o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2, que como já foi referido no ponto 4. do relatório, divide os resultados em 5 possibilidades: negativo, positivo (universal SARS-like: detetado), positivo (universal SARS-like: não detetado), positivo presuntivo e inválido.²⁶ O rRT-PCR foi o segundo teste abordado nesta categoria, dividindo os seus resultados (como também já foi falado no ponto 4. do relatório) em: negativo, positivo e inválido.⁴³

É de realçar que o VitaPCR™ foi usado no laboratório de forma pontual, para casos que necessitavam de um resultado de rRT-PCR com urgência, como por exemplo para procedimentos cirúrgicos. Caso contrário, o teste que era realizado era o rRT-PCR.

O aparecimento da curva de controlo (IC) é obrigatório. Caso contrário o controlo interno não foi amplificado e validado, tornando o resultado pouco fiável. No caso do VitaPCR™ temos apenas um controlo interno, enquanto que no rRT-PCR temos dois (endógeno e exógeno).^{26,43}

Assim como nos TRAG, estes dois tipos de teste também têm vários fatores que se devem de ter em consideração na interpretação do resultado. Uma vez que o princípio teórico é bastante semelhante para ambos, a discussão será feita em conjunto destacando só possíveis diferenças que possam existir.

Um dos aspetos que mais vai influenciar a interpretação dos resultados de qualquer um dos testes é os valores dos Ct. Estes valores podem ser influenciados devido a diversos motivos. Posto isto, podemos fazer uma divisão dos fatores que podem vir a influenciar os valores dos Ct e conseqüentemente os resultados pelas várias fases do processo analítico:

- 1. Fase pré-analítica:** técnica de colheita, tipo de amostra, tempo após a colheita, condições de transporte e armazenamento antes do teste e a idade da amostra.^{33,51,52}
- 2. Fase analítica:** eficácia de extração do RNA, carga de RNA viral nas amostras colhidas, primers utilizados, natureza do RNA alvo, eficiência da técnica utilizada e método de determinação do valor Ct.^{33,53}
- 3. Fase pós-analítica:** interpretação e relato dos resultados.^{33,53}

Posto isto, é notório que mais uma vez o método de colheita vai influenciar o resultado, assim como a carga viral da amostra, dando origem aos mesmos cenários falados anteriormente nos TRAG. Até agora, as zaragatoas nasofaríngeas são o tipo de colheita preferido devido à sua deteção robusta para COVID-19.⁵⁴ Vários estudos já foram realizados e defendem normalmente que a colheita de exsudados nasofaríngeos é melhor que os exsudados orofaríngeos.⁵⁵ Isto deve-se ao facto do vírus se alojar na nasofaringe humana. Por outro lado, por vezes a colheita orofaríngea não é bem executada, colhendo pouca ou nenhuma amostra de interesse.^{56,57}

Um estudo realizado em dezembro de 2020, demonstrou que os desempenhos analíticos do ensaio e instrumento VitaPCR™ foram muito melhores em caso de uma elevada carga viral. Desta forma, houve um grande interesse no ensaio e no instrumento VitaPCR™ como um teste rápido de diagnóstico molecular para o COVID-19 em caso de amostras com uma carga viral elevada, por exemplo em doentes sintomáticos, e alertam a sua utilização como um teste de despiste, em

amostras com cargas virais baixas.⁵² Posto isto, a infeção COVID-19 não foi detetada em pacientes na fase inicial ou tardia da infeção tipicamente associada a uma carga viral baixa. Caso contrário, elevados desempenhos do ensaio VitaPCR™ SARS-CoV-2 foram obtidos sem necessidade de extração prévia do RNA.⁵⁸

Preferencialmente, em qualquer um dos testes, as amostras devem de ser analisadas logo após a sua colheita. No entanto nem sempre isto é possível. Posto isto, no teste VitaPCR™ é necessário ter em consideração o Anexo 8 – Transporte e Armazenamento das Amostras. Quando isto acontece, devem de ser seguidas as diretrizes apresentadas no anexo, caso contrário as amostras perdem a viabilidade, dando origem a resultados errados.²⁶ Se a técnica a ser usada for o rRT-PCR, as amostras devem de permanecer armazenadas num tubo com meio de transporte viral a uma temperatura de 4°C durante um período máximo de 5 dias ou a -70°C se for por um período superior a 5 dias.⁵⁹

Por vezes, no VitaPCR™, foram obtidos resultados positivos (universal SARS-like: não detetado), positivos presuntivos ou inválidos. Nestes casos a amostra deve ser reanalisada e antes de se repetir todo o processo, esta deve voltar a ser homogeneizada com auxílio do vortéx, pois o resultado obtido poderia ter sido consequente de uma má homogeneização. Outra razão que pode levar a estes resultados é o volume insuficiente de amostra (erros na pipetagem) ou a presença de bolhas.²⁶ Só se considera a amostra como positiva, quando se obteve um resultado positivo (universal SARS-like: detetado), com o CI validado.²⁶

Em relação ao rRT-PCR, uma das etapas que gera mais erros é a de extração de ácido nucleico, influenciando a quantidade e qualidade do RNA extraído e consequentemente o resultado final. Estes dois aspetos (quantidade e qualidade do RNA) podem ser influenciados pela presença de proteínas, de DNA ou pela degradação do RNA através de enzimas ribonuclease endógenas e exógenas (RNase), levando a uma diminuição da eficiência do RT-PCR real time. As RNases endógenas podem ser originadas a partir da lise celular e as RNases exógenas podem derivar de dispositivos contaminados ou outras superfícies, causando resultados falsos resultados negativos.⁶⁰

No final de todo o processo de rRT-PCR podemos confirmar se a extração foi bem feita e se havia amostra viável na nossa reação. Para o fazermos devemos de ver se houve amplificação do nosso controlo endógeno, que se encontra rodeado a vermelho na figura 5.1, que se encontra no Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados.⁶⁰ Na figura podemos visualizar um resultado negativo onde

não houve qualquer amplificação de nenhum dos genes alvo e houve uma boa amplificação dos controlos internos (endógeno e exógeno). O controlo endógeno vai nos dizer se o nosso processo de extração foi bem feito, enquanto que o exógeno vai ser relativo ao procedimento da reação de rRT-PCR. O controlo endógeno é um gene humano escolhido pelo fabricante. Este deve de estar sempre presente na nossa amostra e deverá de ser amplificado, caso contrário não foi colhida uma amostra adequada, o que impossibilita a realização do teste.

Esta técnica, comparativamente ao VitaPCR™, exige um ambiente muito mais controlado. O ambiente do espaço onde se realiza toda a análise também pode influenciar todo o processo. Para evitar que isto aconteça, deve haver uma organização e limpeza diária deste espaço. Devem de existir áreas específicas e separadas para os equipamentos e para os consumíveis e o fluxo de trabalho deve ser projetado de uma área limpa para uma área suja.^{60,61,62}

Em ambos os testes, amostras com menor quantidade de RNA (baixa carga viral, extração incorreta e pipetagem incorreta) podem resultar em valores Ct mais elevados (Ct > 40) e, em última análise, levam a uma interpretação errada do teste.⁵⁵ Portanto, todo o material deve estar calibrado e os métodos de extração (no caso do rRT-PCR) devem de estar qualificados e validados.^{60,63,64,65,66} O uso da enzima transcriptase reversa, como foi explicado na introdução teórica é comum aos dois testes. Esta enzima apesar de ser crucial para todo o processo, em caso de concentrações elevadas da mesma pode levar a um efeito inibidor na fase de amplificação. Desta forma, todo o protocolo e ciclos térmicos devem de estar otimizados e calibrados para todo o processo ter a melhor eficiência possível.^{60,62}

Como o SARS-CoV-2 sofre mutações rapidamente, todas as empresas precisam de garantir que os primers não sejam afetados pelas mutações existentes. Uma mutação no segmento de ligação ao primer pode levar à incapacidade de um teste de PCR para detetar essa variante.³³ As cinco regiões do genoma SARS-CoV-2 que são muito utilizadas para o desenho de primers são a nucleocápside (N), envelope (E), RNA dependente de RNA (RdRP), ORF1ab e spike (S). A ocorrência de mutações e recombinação no genoma do vírus dificulta bastante a deteção de COVID-19.⁶⁰ O uso de vários primers pode ajudar a resolver o problema de um resultado falso positivo devido a outro coronavírus que pode partilhar essa sequência genómica específica, bem como falsos negativos devido a uma variante com mutação na região de ligação do primer.^{33,67}

Em geral, o gene RdRP e o gene N são os mais usados para confirmar a infeção de SARS-CoV-2.^{60,68} No VitaPCR™ existe a deteção de apenas um gene (neste caso do gene N), enquanto que no kit de rRT-PCR utilizado há a deteção de três (gene N, S e RdRP).

Apesar de não existirem muitos estudos relativos aos erros laboratoriais na fase pós-analítica associados à deteção do COVID-19, eles existem e são importantes. Um dos erros mais comuns é a interpretação errada dos dados pelo operador.⁶⁰ As curvas de amplificação, como já foi referido inicialmente, são um dos aspetos mais importantes e que se deve ter em consideração na interpretação de um resultado. Os valores de Ct em ambas as técnicas para COVID-19 positivos devem ter um valor de $Ct \leq 35$, caso contrário devem ser considerados como resultado negativo.⁶⁰ Outro aspeto muito importante na avaliação dos resultados é o aspeto das curvas de amplificação. Estas devem de apresentar um crescimento exponencial seguido de uma fase estacionária, no entanto nem sempre acontece. Desta forma, são consideradas como más curvas (como pode ser observado na figura 5.2 do no Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados) e podem ser justificadas devido à presença de bolhas ou à realização de um mau *spin down*, por exemplo. Nesta situação, as amostras devem de ser reanalisadas. Se após a repetição da análise os resultados se repetirem, é necessária nova colheita de amostra, pois à partida o problema não tem a análise mas sim com a amostra.⁶⁰

Evidências recentes mostraram que, em alguns casos, os testes diagnósticos podem falhar na deteção de casos positivos, especialmente 3-4 dias após a infeção e após 10-12 dias de infeção, alertando-nos para o facto de que qualquer indivíduo assintomático com resultado negativo pode ser infeccioso.^{33,69} Além disso, os valores de Ct são comumente afetados por variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas como foi falado anteriormente.³³

Devido aos esforços de sequenciação, monitorização e vigilância da variação no genoma do novo coronavírus, muitas variantes preocupantes foram identificadas. A maioria dessas variantes, mais recentemente, foram identificadas e verificou-se que parecem aumentar a transmissibilidade e potencialmente ter impacto na gravidade da doença.^{33,70}

Quando as mutações ocorrem nos sítios de ligação do primer ou afetam a estrutura dos alvos dos antígenos virais que são detetados pelos testes de antígeno, elas têm o potencial de afetar a precisão dos testes de diagnóstico.^{33,71} Portanto, é melhor avaliar o efeito das mutações em todas as regiões genómicas. Essas variantes

são detetadas apenas por meio do sequenciamento das amostras após RT-PCR positivo.

33

Após a realização de vários estudos é defendido que existe uma correlação entre os valores de Ct e a doença em si.³³

Indivíduos com maior carga viral de SARS-CoV-2 demonstraram valores mais baixos de Ct (figura 5.3 do Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados), correlacionados com uma alta mortalidade em pacientes com COVID-19. A carga viral pode ser considerada um preditor de morbidade e mortalidade.^{33,72} Valores de Ct relativamente baixos após a deteção (ou seja, carga viral consideravelmente mais alta) foram relacionados a taxas de mortalidade consideravelmente aumentadas entre pacientes internados e ambulatoriais, de acordo com pesquisas observacionais feitas entre março e maio de 2020 num grande centro médico acadêmico quaternário na cidade de Nova York, EUA.³³

Um estudo publicado em junho de 2021, concluiu que indivíduos com menor período entre o início dos sintomas e a testagem tiveram pior prognóstico. Aqueles que apresentaram menos de três dias após o início dos sintomas têm um risco duas vezes maior de mortalidade. Os níveis de Ct continuaram a ser um preditor robusto das taxas de mortalidade entre os pacientes desde o diagnóstico inicial da infeção por SARS-CoV-2.^{33,73}

Em doenças graves e críticas, a carga viral permaneceu consistentemente alta ao longo do curso da doença, apresentando sempre valores de Ct baixos.⁷⁴ De acordo com uma pesquisa recente, foi defendido que poderia haver uma relação entre os valores de Ct e a gravidade da doença ou morbidade associada ao COVID 19. Esta relação foi explicada com o facto dos pacientes que morreram apresentarem valores de Ct mais baixos em comparação com os pacientes que recuperaram, no entanto, esses pacientes tiveram um período consideravelmente mais curto com sintomas antes do teste.⁷⁵ Outro estudo que foi realizado revelou que os pacientes que morreram no hospital apresentaram valores de Ct significativamente mais baixos do que aqueles que receberam alta vivos.^{33,76}

A disseminação viral prolongada, é observada em pacientes leves de COVID-19 com idade avançada, hipertensão e diabetes.^{77,78} A idade avançada, o tabagismo e quimioterapia recente tem sido diretamente correlacionados com o aumento da carga viral.⁷⁹ A imunosenescência e o estado imunocomprometido são obstáculos à montagem de uma resposta imune completa, levando a um período de incubação assintomático mais longo.^{33,80}

Em diversos estudos já foi demonstrado que os valores de Ct são maiores durante a fase sintomática, seguidos por uma diminuição constante nos primeiros 10 dias pós-infeção.⁸¹ Várias análises de amostras respiratórias relataram os maiores valores de cargas virais durante a semana inicial de sintomas ou no dia 3 a 5 do início da doença seguido por um declínio contínuo. Desta maneira quando se avalia um resultado onde há amplificação dos genes alvo deve de se ter em consideração o valor dos Ct e a informação clínica disponível.^{33,82-87}

A presença de variantes genéticas do SARS-CoV-2 pode alterar potencialmente o desempenho do teste SARS-CoV-2. Os testes moleculares projetados para detetar vários alvos genéticos do SARS-CoV-2 são menos suscetíveis aos efeitos da variação genética do que os testes projetados para detetar um único alvo genético. Neste caso o VitaPCR™ seria, entre os dois testes aqui falados, o mais provável de ter um desempenho alterado, uma vez que em apenas um alvo genético.

³³ A eficiência da reação rRT-PCR é um fator fundamental. A eficácia ideal é de 90 a 110%. A eficiência superior a 110% pode ser um fator inibidor para o PCR, que pode levar à diminuição do Ct e má interpretação. A eficiência inferior a 90% pode ser resultante de concentrações não otimizadas de primers ou uma temperatura inadequada, por exemplo.⁶⁰

Com este trabalho, podemos observar que existem diversos fatores que podem influenciar os resultados obtidos e a sua interpretação. Em muitos dos casos a amostra pode ser reanalisada de modo a obter-se um resultado mais fiável ou a confirmação do mesmo.

Apesar de ambas as técnicas aqui faladas apresentarem diversos resultados, os resultados emitidos pelo laboratório são apenas três: positivo, negativo ou inconclusivo. Os resultados inconclusivos são dados quando uma pessoa não apresenta um resultado claramente negativo/positivo. Na técnica VitaPCR™, isto acontece quando são obtidos resultados consecutivos positivo (universal SARS-like: não detetado), positivo presuntivo. Já na técnica de RT-PCR, os resultados são dados como inconclusivos quando os valores dos Cts se encontram muito próximos da nossa borderline ($Ct \leq 35$), como se pode observar na figura 5.4 do Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados ou quando não existe nenhum tipo de amplificação como pode ser observado na figura 5.5 do Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados.

Por vezes, pode haver também a necessidade de uma nova colheita de amostra. Nestas técnicas as repetições de colheita são pedidas quando, na técnica

VitaPCR™, temos resultados inválidos consecutivos e, na técnica de rRT-PCR, quando o controlo endógeno não for amplificado.

6. Conclusões

A pandemia mundial de COVID-19 levantou inquestionavelmente uma grande emergência de saúde pública em todo o mundo.⁸⁸ Até aos dias de hoje, a transmissão do COVID-19 continua incontrolável, fazendo com que o número de casos confirmados e de mortes continue a aumentar. A testagem da população e o cumprimento das normas da DGS são fatores extremamente importantes para o controle da situação pandémica. Para que isto aconteça, são necessários métodos de diagnóstico bastante sensíveis, precisos e exatos.⁸⁹ Este relatório mostrou três testes diferentes com o mesmo objetivo, deteção do SARS-CoV-2.

A procura do melhor diagnóstico, vacinas direcionadas e terapias é uma boa evidência de que a compreensão científica, a investigação e a tecnologia estão a evoluir ao ritmo da pandemia. Evidentemente, é necessária uma investigação continuada e consistente para melhorar o nosso conhecimento relativo à patogénese viral que podem levar a estratégias preventivas e terapêuticas reforçadas.⁸⁸

Como todos os vírus, o SARS-CoV-2 também apresenta diversas mutações no seu genoma, causando uma enorme preocupação no diagnóstico de COVID-19. Vários estudos já foram feitos e revelaram que esta evolução viral não só explica a diferença na resposta imune individual, como também a gravidade, patogenicidade e transmissibilidade da doença.⁹⁰ Além disso, a variabilidade genética e as mutações recorrentes apresentam um risco grave de perda de sensibilidade e precisão de qualquer um dos testes aqui abordados.⁹¹

O diagnóstico para infeção por SARS-CoV-2 depende de vários fatores, como foi falado ao longo do relatório. Todo o processo analítico é muito minucioso e podem existir diversos erros em qualquer uma das fases do processo analítico, como foi falado anteriormente, que irão influenciar os resultados e a sua interpretação.³³

Assim, conclui-se que a técnica de rRT-PCR é a técnica de diagnóstico de COVID-19 mais adequada. No entanto, por outro lado, os testes VitaPCR™ e de deteção de antígeno foram considerados melhores como métodos de *Point of Care* (POC), prestando um grande auxílio no controlo da pandemia e diminuição da sobrecarga nos hospitais.

7. Conclusions

The global COVID-19 pandemic has unquestionably raised a major public health emergency worldwide.⁸⁸ To this day, transmission of COVID-19 continues uncontrollably, causing the number of confirmed cases and deaths to continue to rise. Testing the population and complying with DGS standards are extremely important factors for controlling the pandemic situation. For this to happen, very sensitive, precise and accurate diagnostic methods are needed.⁸⁹ This report showed three different tests with the same objective, detection of SARS-CoV-2.

The search for the best diagnosis, targeted vaccines and therapies is good evidence that scientific understanding, research and technology are evolving at the pace of the pandemic. Clearly, continued and consistent research is needed to improve our knowledge of viral pathogenesis that may lead to enhanced preventive and therapeutic strategies.⁸⁸

Like all viruses, SARS-CoV-2 also has several mutations in its genome, causing a huge concern in the diagnosis of COVID-19. Several studies have already been done and have revealed that this viral evolution not only explains the difference in the individual immune response, but also the severity, pathogenicity and transmissibility of the disease.⁹⁰ In addition, genetic variability and recurrent mutations present a serious risk of loss of sensitivity and accuracy of any of the tests discussed here.⁹¹

The diagnosis for SARS-CoV-2 infection depends on several factors, as discussed throughout the report. The entire analytical process is very thorough and there may be several errors in any of the phases of the analytical process, as mentioned earlier, which will influence the results and their interpretation.³³

Concluding, the rRT-PCR technique is the most appropriate COVID-19 diagnostic technique. However, on the other hand, VitaPCR™ and antigen detection tests were considered better as Point of Care (POC) methods, providing a great help in controlling the pandemic and reducing the burden on hospitals.

8. Proposta de Projeto de Investigação

Com base em tudo o que foi descrito ao longo do relatório e da análise realizada aos três tipos de teste aqui apresentados, proponho um possível projeto de investigação. Uma vez que os autotestes são cada vez mais aliados do diagnóstico de COVID-19 e que já evoluíram desde o início da pandemia de SARS-CoV-2, o projeto apresentado pretende mostrar se realmente estes se tornaram mais fiáveis.

Titulo: Análise da concordância entre resultados positivos obtidos na realização de testes rápidos de antígeno e de RT-PCR real time.

Objetivo: O objetivo é fazer uma análise comparativa de resultados positivos obtidos nos autotestes e que serão posteriormente confirmados com a técnica de rRT-PCR.

Pertinência: Com a realização deste estudo vai ser possível ver o nível de concordância de resultados positivos entre os autotestes e o testes de rRT-PCR. Desta forma será possível concluir se os autotestes são confiáveis nesta situação ou não.

Metodologias:

Este projeto será desenvolvido no Labocentro S.A.- Laboratório de Análises Clínicas. Para se determinar a concordância de resultados positivos obtidos num autoteste pela técnica de rRT-PCR será utilizada a técnica de rRT-PCR falada neste relatório.

Grupo de estudo:

Os indivíduos que farão parte do grupo de estudo deste projeto (de forma anónima) são utentes do laboratório que cumpram os seguintes requisitos:

- Preenchimento do questionário eletrónico relativo à sua informação clínica;
- Terem previamente um resultado positivo recente (não mais que dois dias) num autoteste;
- A análise confirmatória do seu resultado positivo a ser executada será o rRT-PCR.

A escolha do nosso grupo de estudo ocorrerá durante o primeiro mês da realização deste projeto.

Amostras:

As amostras a analisar serão exsudados nasofaríngeos colhidos no Labocentro S.A.- Laboratório de Análises Clínicas por profissionais competentes e especializados para tal. A técnica de colheita será a que foi explicada no ponto 3.1 Amostra do relatório.

Análise rRT-PCR:

O método de extração do material genético será o anteriormente falado no relatório, que pode ser consultado no ponto 3.4 Teste de rRT-PCR ou para ver em mais detalhe, no Anexo 6 - Procedimento de extração de RNA- Método automatizado - amostras de 200µL.

Já para a reação de PCR em si, será também usado o método anteriormente falado no relatório, que pode ser consultado no ponto 3.4 Teste de rRT-PCR ou para ver em mais detalhe, no Anexo 7- Procedimento de rRT-PCR com o kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.

Interpretação e tratamento dos resultados:

Após a análise das amostras com a técnica de rRT-PCR, os resultados serão exportados para o programa de interpretação *Seegene Viewer*. Seguidamente, serão avaliados e discutidos por profissionais competentes que terão em consideração todos os aspetos abordados no ponto 5. Discussão dos resultados do relatório. Depois desta etapa, com o auxílio de um software de estatística, será calculada a percentagem de concordância dos resultados obtidos, de modo a ser possível tirar as nossas conclusões.

Resultados esperados:

Com base em todos os aspetos que foram abordados ao longo do relatório e de acordo com vários estudos o que se espera é que haja um nível de concordância melhor em indivíduos sintomáticos, que possivelmente terão uma maior carga viral associada.

Vários estudos suportam esta ideia como é o caso de um estudo realizado em Espanha em agosto de 2021. Este decidiu avaliar a eficácia dos testes rápidos de deteção de antígeno.⁹² Para isto, decidiram avaliar um teste rápido em indivíduos institucionalizados e trabalhadores, onde a maioria deles eram assintomáticos. Após a testagem, o ensaio identificou fiavelmente a presença de SARS-CoV-2 em indivíduos

que apresentaram baixos valores Ct na técnica de rRT-PCR. Neste estudo, a especificidade foi de 100%.⁹²

A sensibilidade global foi variou entre 85% a 90%, quando se utilizava um cut-off de 35 para os valores dos Ct.⁹²

Noutro estudo realizado em Madrid por Linares et al., a sensibilidade estava diretamente relacionado com a magnitude da carga de RNA viral presente nas amostras, assim como neste estudo.^{92,93} Por outro lado, desta vez num estudo realizado por Fenollar et al., a sensibilidade é muito baixa para indivíduos assintomáticos, ao contrário do que foi demonstrado no primeiro estudo aqui falado, que mostrou uma alta sensibilidade em ambos indivíduos sintomáticos e assintomáticos.^{92,94}

Desta forma, podemos concluir que os resultados falsos negativos foram observados apenas em valores de Ct elevados, ou seja, baixas cargas virais.⁹²

A sensibilidade dos testes de antígeno variam. Um dos fatores mais influentes, como já foi aqui dito, é a sintomatologia do indivíduo que está bastante associada à carga viral apresentada pelo mesmo.⁹⁵

Já foi defendido também que os ensaios que demonstraram satisfazer os critérios adequados, tais como os perfis de produtos-alvo prioritários da OMS para diagnósticos COVID-19 (sensibilidade $\geq 80\%$ e especificidade $\geq 97\%$), podem ser considerados como uma substituição do RT-PCR baseado em laboratório quando devem ser tomadas decisões imediatas sobre os cuidados do paciente, ou quando o rRT-PCR não possa ser entregue atempadamente.^{95,96}

Os estudos de precisão dos testes não podem avaliar adequadamente a capacidade dos testes de antígenos para diferenciar aqueles que são infecciosos e exigem isolamento daqueles que não apresentam qualquer risco, uma vez que não existe um padrão de referência para a infecciosidade.⁹⁵

Considerações Finais:

A testagem de indivíduos numa fase inicial da infeção, antes dos picos de replicação viral, ou numa fase tardia de infeção quando a replicação diminuiu, podem gerar resultados pouco fiáveis em testes com pouca sensibilidade.

Desta forma, apesar de os TRAGs terem evoluído, estes continuam a ser considerados uma ferramenta útil para o diagnóstico SARS-CoV-2 em situações onde a carga viral é elevada e os sintomas são recorrentes.

No entanto, como já foi mencionado, em caso de apresentarem um perfil adequado para a OMS, podem servir como teste de diagnóstico para COVID-19, em casos excepcionais e de urgência.

Os testes rápidos de antígeno podem contribuir de uma forma mais significativa na contenção desta pandemia. Porém, são necessários mais estudos realizados em condições ideais de modo a ser possível avaliar a sua verdadeira sensibilidade e realçar o seu verdadeiro potencial.

9. Referências Bibliográficas

1. Clara Saúde - A Pensar em si [Internet]. Clarasaude.pt. 2022 [consultado a 29 junho 2022]. Disponível em: <https://www.clarasaude.pt/conteudo.aspx?id=4>
2. Clara Saúde - A Pensar em si [Internet]. Clarasaude.pt. 2022 [consultado a 29 junho 2022]. Disponível em: <https://www.clarasaude.pt/conteudo.aspx?id=5>
3. Clara Saúde - A Pensar em si [Internet]. Clarasaude.pt. 2022 [consultado a 29 junho 2022]. Disponível em: https://www.clarasaude.pt/analises_clinicas.aspx?id=10
4. Torres H. Estratégias Terapêuticas da Covid-19: Uma abordagem molecular [mestrado integrado em ciências farmacêuticas]. Instituto Universitário Egas Moniz; 2021.
5. Wang M, Zhao R, Gao L, Gao X, Wang D, Cao J. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
6. Islam K, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
7. Anka A, Tahir M, Abubakar S, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020;93(4).
8. Nogueira PJ, de Araújo Nobre M, Elias C, Feteira-Santos R, Martinho AC-V., Camarinha C, et al. Multimorbidity Profile of COVID-19 Deaths in Portugal during 2020. *Journal of Clinical Medicine* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Jul 2];11(7):1898.
9. Renascença. Mapas e Números do Coronavírus [Internet]. Renascença. Available from: <https://coronavirus.rr.sapo.pt/>
10. ECO. Dois anos de pandemia em cinco gráficos [Internet]. ECO. 2022. Available from: <https://eco.sapo.pt/2022/03/02/dois-anos-de-pandemia-em-cinco-graficos/>
11. ECO. Sexta vaga de Covid representa 21% dos casos e 6% das mortes desde o início da pandemia [Internet]. ECO. 2022 [cited 2022 Nov 2]. Available from: <https://eco.sapo.pt/2022/06/02/sexta-vaga-de-covid-representa-21-dos-casos-e-6-das-mortes-desde-o-inicio-da-pandemia/>
12. Covid-19: curva epidémica e parâmetros de transmissibilidade Categoria - INSA [Internet]. www.insa.min-saude.pt. [cited 2022 Nov 2]. Available from: <https://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/epidemiologia/covid-19-curva-epidemica-e-parametros-de-transmissibilidade/>
13. Direção-Geral da Saúde [Internet]. www.dgs.pt. Available from: <https://www.dgs.pt/>
14. COVID-19 | SNS24 [Internet]. SNS24. 2022 [cited 8 June 2022]. Available from: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/#sec-11>
15. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(11):685-700.
16. Almeida E, Silva T. SARS-COV-2: COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES TESTES DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL - UMA REVISÃO ADAPTADA À REALIDADE PORTUGUESA. *Higeia* [Internet]. 2021 [cited 24 June 2022];:9-17. Available from: https://revistahigeia.ipcb.pt/artigos_ed_covid/02_SARS_CoV_2_Comparacao_dos_diferentes_testes_de_diagnostico_laboratorial_uma_revisao_adaptada_a_realidade_portuguesa.pdf
17. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;99:397-402.
18. Rai P, Kumar B, Deekshit V, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(2):441-455.
19. Islam K, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
20. Mak G, Cheng P, Lau S, Wong K, Lau C, Lam E et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129:104500.
21. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. [Who.int](http://www.who.int). 2022 [cited 21 June 2022]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays>
22. Folheto informativo- Flowflex™: Teste Rápido de Detecção de Antígeno do SARS-coV-2; Flowflexcovid.com. 2021 [cited 10 December 2021]. Available from: <https://flowflexcovid.com/wp-content/uploads/2021/11/ACON-Labs-Flowflex-US-COVID-19-Home-Test-HCP-Insert-En.pdf>
23. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T et al. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(9).
24. Roque R. P5. Validação de métodos qualitativos. Presentation presented at; IPL-ESTeSEL.
25. Fournier P, Zandotti C, Ninove L, Prudent E, Colson P, Gazin C et al. Contribution of VitaPCR SARS-CoV-2 to the emergency diagnosis of COVID-19. *Journal of Clinical Virology*. 2020;133:104682.
26. Folheto informativo- VitaPCR™: Teste para SARS-coV-2 VitaPCR Gen 2;
27. Fitoussi F, Dupont R, Tonen-Wolyec S, Bélec L. Performances of the VitaPCR™ SARS-CoV-2 Assay during the second wave of the COVID-19 epidemic in France. *Journal of Medical Virology*. 2021;93(7):4351-4357.
28. Trigt R, Neat J, Brouwer J, Hays A, Westerhof H. Deploying a rapid point-of-care polymerase chain reaction test for SARS-CoV-2 in a clinical research unit to ensure healthy volunteer safety. *Bioanalysis*. 2021;13(24):1799-1804.

29. Musumeci A, Vinci M, L'Episcopo F, Ragalmuto A, Neri V, Roccella M et al. Implementation of Sample Pooling Procedure Using a Rapid SARS-CoV-2 Diagnostic Real-Time PCR Test Performed Prior to Hospital Admission of People with Intellectual Disabilities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(17):9317.
30. [Internet]. 2022 [cited 25 March 2022]. Available from: <https://www.rededorsaoluiz.com.br/instituto/idor/conheca-um-dos-tipos-de-testagem-para-o-novo-coronavirus-rt-pcr/>
31. How is the COVID-19 Virus Detected using Real Time RT-PCR? [Internet]. *iaea.org*. 2022 [cited 26 March 2022]. Available from: <https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>
32. PPT: Brito M. PCR quantitativo em tempo real: aplicação no estudo de doenças. Presentation presented at; 2020; ESTeSL- Instituto Politécnico de Lisboa.
33. Rabaan A, Tirupathi R, Sule A, Aldali J, Mutair A, Alhumaid S et al. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. *Diagnostics*. 2021;11(6):1091.
34. Rao S, Manissero D, Steele V, Pareja J. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infectious Diseases and Therapy*. 2020;9(3):573-586.
35. Sarkar K, Sarkar B, Sinha R. Initial viral load of a COVID-19-infected case indicated by its cycle threshold value of polymerase chain reaction could be used as a predictor of its transmissibility - An experience from Gujarat, India. *Indian Journal of Community Medicine*. 2020;45(3):278.
36. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(5):2620-2629.
37. Karahasan Yagci A, Sarinoglu R, Bilgin H, Yanılmaz Ö, Sayın E, Deniz G et al. Relationship of the cycle threshold values of SARS-CoV-2 polymerase chain reaction and total severity score of computerized tomography in patients with COVID 19. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;101:160-166.
38. Halperin D. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Annals of Internal Medicine*. 2021;174(2):283.
39. Hou Y, Okuda K, Edwards C, Martinez D, Asakura T, Dinno K et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*. 2020;182(2):429-446.e14.
40. Klein S, Müller T, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser A, Glass B et al. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses*. 2020;12(8):863.
41. [Internet]. 2022 [cited 24 April 2022]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A42352>
42. Folheto informativo: MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
43. Folheto informativo: Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay
44. Nordgren J, Sharma S, Olsson H, Jämtberg M, Falkeborn T, Svensson L et al. SARS-CoV-2 rapid antigen test: High sensitivity to detect infectious virus. *Journal of Clinical Virology*. 2021;140:104846.
45. Munne K, Bhanothu V, Mayekar A, Birje S, Bhor V, Patel V et al. A retrospective analysis of COVID-19 diagnosis results obtained by rapid antigen tests and RT-PCR: Implications for disease management. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2021;39(4):537-539.
46. Gans J, Goldfarb A, Agrawal A, Sennik S, Stein J, Rosella L. False-Positive Results in Rapid Antigen Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2022;327(5):485.
47. Wang Y, Wu C, Bai C, Lu S, Yang Y, Lin Y et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of COVID-19 antigen tests: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2021;84(11):1028-1037.
48. Schuit E, Veldhuijzen IK, Venekamp RP, van den Bijllaardt W, Pas SD, Lodder EB, et al. Diagnostic accuracy of rapid antigen tests in asymptomatic and presymptomatic close contacts of individuals with confirmed SARS-CoV-2 infection: cross sectional study. *BMJ*. 2021;374:n1676.
49. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al.; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;3:CD013705.
50. Mistry DA, Wang JY, Moeser ME, Starkey T, Lee LYW. A systematic review of the sensitivity and specificity of lateral flow devices in the detection of SARS-CoV-2. *BMC Infect Dis*. 2021;21:828.
51. Abo-Youssef, A.M.; Afify, H.; Azouz, A.A.; Abdel-Rahman, H.M.; Abdel-Naim, A.B.; Allam, S. Febuxostat attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats via inhibiting JAK/STAT axis. *Life Sci*. 2020, 260, 118414.
52. Nakatsu, Y.; Seno, Y.; Kushiya, A.; Sakoda, H.; Fujishiro, M.; Katsako, A.; Mori, K.; Matsunaga, Y.; Fukushima, T.; Kanaoka, R.; et al. The xanthine oxidase inhibitor febuxostat suppresses development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2015, 309, G42–G51
53. Watson, J.; Whiting, P.F.; Brush, J.E. Interpreting a covid-19 test result. *BMJ* 2020, 369
54. Nasopharyngeal Swab Collection Methods for COVID-19: Suggestions from COVID-19 Diagnosticians. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2021;31(2):S146-S146.
55. Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y. Identification of Respiratory Viruses in Adults: Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(11):3439-3443.
56. Hoque M, Sarkar M, Rahman M, Akter S, Banu T, Goswami B et al. SARS-CoV-2 infection reduces human nasopharyngeal commensal microbiome with inclusion of pathobionts. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
57. Ziegler C, Miao V, Owings A, Navia A, Tang Y, Bromley J et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell*. 2021;184(18):4713-4733.e22.
58. Fitoussi F, Dupont R, Tonen-Wolyec S, Bélec L. Performances of the VitaPCR™ SARS-CoV-2 Assay during the second wave of the COVID-19 epidemic in France. *Journal of Medical Virology*. 2021;93(7):4351-4357.

59. Infecção pelo novo Coronavírus (2019-nCoV) [Internet]. Dgs.pt. 2022 [cited 26 June 2022]. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0022020-de-25012020-pdf.aspx>
60. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica Chimica Acta*. 2021;516:1-7.
61. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (consultado a 23 de junho 2022)
62. H.J. Burkardt, Standardization and quality control of PCR analyses, *Clin. Chem.Lab. Med.* 38 (2) (2000) 87–91.
63. T. Ai, Z. Yang, H. Hou, C. Zhan, C. Chen, W. Lv, Q. Tao, Z. Sun, L. Xia, Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases, *Radiology* 296 (2) (2020) E32–E40
64. S.C. Taylor, K. Nadeau, M. Abbasi, C. Lachance, M. Nguyen, J. Fenrich, The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time, *Trends Biotechnol.* 37 (7) (2019) 761–774.
65. N. Younes, D.W. Al-Sadeq, H. Al-Jighefee, S. Younes, O. Al-Jamal, H.I. Daas, H.M. Yassine, G.K. Nasrallah, Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2, *Viruses* 12 (6) (2020).
66. B. Udugama, P. Kadhiresan, H.N. Kozlowski, A. Malekjahani, M. Osborne, V.Y.C. Li, H. Chen, S. Mubareka, J.B. Gubbay, W.C.W. Chan, Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection, *ACS Nano* 14 (4) (2020) 3822–3835.
67. Peñarrubia, L.; Ruiz, M.; Porco, R.; Rao, S.N.; Vella, S.A.; Juanola-Falgarona, M.; Manissero, D.; López-Fontanals, M.; Pareja, J. In response to: Multiple assays in a real-time RT-PCR severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 2021, 105, 241–242.
68. Kishimoto, K.; Kobayashi, R.; Hori, D.; Sano, H.; Suzuki, D.; Kobayashi, K. Febuxostat as a prophylaxis for tumor lysis syndrome in children with hematological malignancies. *Anticancer Res.* 2017, 37, 5845–5849.
69. Asai, T. COVID-19: Accurate interpretation of diagnostic tests—A statistical point of view. *J. Anesth.* 2021, 35, 328–332.
70. Cascella, M.; Rajnik, M.; Cuomo, A.; Dulebohn, S.C.; Di Napoli, R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus. *StatPearls* 2020, 9, 1–17.
71. Nag, P.; Sadani, K.; Mukherji, S.; Seo, G.; Lee, G.; Kim, M.J.; Baek, S.H.; Choi, M.; Ku, K.B.; Lee, C.S.; et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano* 2020, 14, 5135–5142.
72. Fajnzylber, J.; Regan, J.; Coxen, K.; Corry, H.; Wong, C.; Rosenthal, A.; Worrall, D.; Giguél, F.; Piechocka-Trocha, A.; Atyeo, C.; et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat. Commun.* 2020, 11, 5493
73. Silva Júnior, J.V.J.; Merchioratto, I.; de Oliveira, P.S.B.; Rocha Lopes, T.R.; Brites, P.C.; de Oliveira, E.M.; Weiblen, R.; Flores, E.F. End-point RT-PCR: A potential alternative for diagnosing coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J. Virol. Methods* 2021, 288.
74. Shi, F.; Wu, T.; Zhu, X.; Ge, Y.; Zeng, X.; Chi, Y.; Du, X.; Zhu, L.; Zhu, F.; Zhu, B.; et al. Association of viral load with serum biomarkers among COVID-19 cases. *Virology* 2020, 546, 122–126.
75. Samavedam, S.; Aluru, N.; Rajyalakshmi, B.; Reddy, P.R. Prognostic Value of “Cycle Threshold” in Confirmed COVID-19 Patients. *Indian J. Crit. Care Med.* 2021, 25, 322–326.
76. Fang, Z.; Zhang, Y.; Hang, C.; Ai, J.; Li, S.; Zhang, W. Comparisons of viral shedding time of SARS-CoV-2 of different samples in ICU and non-ICU patients. *J. Infect.* 2020, 81, 147–178.
77. Wang, X.; Guo, X.; Xin, Q.; Pan, Y.; Hu, Y.; Li, J.; Chu, Y.; Feng, Y.; Wang, Q. Neutralizing antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in coronavirus disease 2019 inpatients and convalescent patients. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 2688–2694.
78. Kostakoglu, U.; Kant, A.; Atalar, S.; Ertunc, B.; Erensoy, S.; Dalmanoglu, E.; Yilmaz, I.; Sevimli, B.; Erturk, A.; Yilmaz, G. Diagnostic value of chest ct and initial real-time rt-pcr in covid-19 infection. *Pakistan J. Med. Sci.* 2021, 37, 234–238.
79. Xu, T.; Chen, C.; Zhu, Z.; Cui, M.; Chen, C.; Dai, H.; Xue, Y. Clinical features and dynamics of viral load in imported and non-imported patients with COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 94, 68–71.
80. Böhmer, M.M.; Buchholz, U.; Corman, V.M.; Hoch, M.; Katz, K.; Marosevic, D.V.; Böhm, S.; Woudenberg, T.; Ackermann, N.; Konrad, R.; et al. Investigation of a COVID-19 outbreak in Germany resulting from a single travel-associated primary case: A case series. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, 920–928.
81. Salvatore, P.P.; Dawson, P.; Wadhwa, A.; Rabold, E.M.; Buono, S.; Dietrich, E.A.; Reses, H.E.; Vuong, J.; Pawloski, L.; Dasu, T.; et al. Epidemiological Correlates of PCR Cycle Threshold Values in the Detection of SARS-CoV-2. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 72, 761–776.
82. Yu, X.; Sun, S.; Shi, Y.; Wang, H.; Zhao, R.; Sheng, J. SARS-CoV-2 viral load in sputum correlates with risk of COVID-19 progression. *Crit. Care* 2020, 24.
83. Kujawski, S.A.; Wong, K.K.; Collins, J.P.; Epstein, L.; Killerby, M.E.; Midgley, C.M.; Abedi, G.R.; Ahmed, N.S.; Almendares, O.; Alvarez, F.N.; et al. Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nat. Med.* 2020, 26, 861–868.
84. Han, M.S.; Seong, M.W.; Kim, N.; Shin, S.; Cho, S.I.; Park, H.; Kim, T.S.; Park, S.S.; Choi, E.H. Viral RNA load in mildly symptomatic and asymptomatic children with COVID-19, Seoul, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, 26, 2497–2499.
85. Kim, E.S.; Chin, B.S.; Kang, C.K.; Kim, N.J.; Kang, Y.M.; Choi, J.P.; Oh, D.H.; Kim, J.H.; Koh, B.; Kim, S.E.; et al. Clinical course and outcomes of patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection: A preliminary report of the first 28 patients from the Korean cohort study on COVID-19. *J. Korean Med. Sci.* 2020, 35.

86. Young, B.E.; Ong, S.W.X.; Kalimuddin, S.; Low, J.G.; Tan, S.Y.; Loh, J.; Ng, O.T.; Marimuthu, K.; Ang, L.W.; Mak, T.M.; et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected with SARS-CoV-2 in Singapore. *J. Am. Med. Assoc.* 2020, 323, 1488–1494.
87. Arons, M.M.; Hatfield, K.M.; Reddy, S.C.; Kimball, A.; James, A.; Jacobs, J.R.; Taylor, J.; Spicer, K.; Bardossy, A.C.; Oakley, L.P.; et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 2081–2090.
88. Fernandes Q, Inchakalody V, Merhi M, Mestiri S, Taib N, Moustafa Abo El-Ella D et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Annals of Medicine.* 2022;54(1):524-540.
89. Tsang H, Chan L, Cho W, Yu A, Yim A, Chan A et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2020;19(7):877-888.
90. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica Chimica Acta.* 2021;516:1-7.
91. Peñarrubia, L.; Ruiz, M.; Porco, R.; Rao, S.N.; Juanola-Falgarona, M.; Manissero, D.; López-Fontanals, M.; Pareja, J. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 97, 225–229
92. Escrivá B, Mochón M, González R, García C, Pla A, Ricart A et al. “The effectiveness of rapid antigen test-based for SARS-CoV-2 detection in nursing homes in Valencia, Spain”. *Journal of Clinical Virology.* 2021;143:104941.
93. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, Romanyk J, Pérez-García F, Gómez-Herruz P et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *Journal of Clinical Virology.* 2020;133:104659.
94. Fenollar F, Bouam A, Ballouche M, Fuster L, Prudent E, Colson P et al. Evaluation of the Panbio COVID-19 Rapid Antigen Detection Test Device for the Screening of Patients with COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology.* 2021;59(2).
95. Dinnes J, Deeks J, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2021;2021(4).
96. [Internet]. Cdn.who.int. 2022 [citado a 3 julho 2022]. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/who-rd-blueprint-diagnostics-tpp-final-v1-0-28-09-jc-ppc-final-cmp92616a80172344e4be0edf315b582021.pdf?sfvrsn=e3747f20_1&download=true

Anexo 2- Limitações dos testes rápidos de antígeno

Este tipo de teste, como todos, apresenta algumas limitações como:

1. As amostras devem ser testadas o mais rápido possível após a coleta das amostras. Estes só aguentam viáveis até 1 hora após a colheita, se armazenados entre 15-30°C;
2. A utilização de meios de transporte virais pode diminuir a sensibilidade do teste;
3. O não cumprimento das instruções de uso pode afetar adversamente o desempenho do teste e / ou invalidar o resultado do teste;
4. Não diferencia entre SARS-CoV e SARS-CoV-2.
5. Um resultado falso negativo pode ocorrer se o nível de antígeno na amostra estiver abaixo do limite de deteção do teste, se a amostra tiver sido mal colhida ou manuseada ou se menos de 4 gotas de fluido forem adicionadas ao poço de amostra (podendo neste caso também gerar um resultado inválido);
6. Um resultado falso negativo ou falso positivo pode ocorrer se o resultado do teste for lido antes de 15 minutos ou após 30 minutos;
7. Um resultado positivo não exclui infeção bacteriana ou coinfecção com outros vírus.

O desempenho deste teste foi estabelecido com base na avaliação de um número limitado de espécimes clínicos coletados entre março e maio de 2021. O desempenho no momento do teste pode variar dependendo das variantes em circulação, incluindo cepas emergentes de SARS-CoV-2 e sua prevalência, que mudam com o tempo. ¹⁶

Anexo 3- Limitações dos testes rápidos de diagnóstico molecular para deteção de SARS-CoV-2

Para este tipo de teste as limitações apresentadas são:

1. A colheita, armazenamento ou transporte incorreto das amostras pode resultar em resultados falsos negativos;
2. Os resultados negativos não excluem infeções de SARS-CoV-2 e não devem ser usados como base única para decisões de gestão do paciente;
3. Resultados falsos negativos podem ocorrer se os níveis de vírus forem inferiores ao limite de deteção ou se existirem mutações nas regiões alvo do teste;
4. A presença de inibidores na amostra pode levar a resultados inválidos;

5. O não cumprimento das instruções de utilização pode prejudicar o desempenho do teste;
6. Apenas uma amostra é processada por aparelho de cada vez (3 testes por hora);
7. os RNAs virais extraídos no tampão de lise são rapidamente degradados, o que impede o atraso nos testes. ^{19,20}

Anexo 4- VitaPCR™: Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2

VitaPCR™
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2

cred
DIAGNOSTICS

REF PCRAE0120

Para usar com o equipamento VitaPCR™
Para amostras de exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos. Apenas para diagnóstico *in vitro*.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 realizado com o equipamento VitaPCR™ é um teste rápido de diagnóstico molecular *in vitro* que utiliza uma tecnologia de amplificação da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) para a deteção qualitativa do RNA viral da Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) em exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos de pacientes com casos suspeitos de COVID-19 segundo o seu médico.

Os resultados servem para a identificação presuntiva de SARS-CoV-2. A identificação definitiva de SARS-CoV-2 requer testes e procedimentos de confirmação adicionais, consultando as autoridades de saúde pública ou outras autoridades às quais é necessário reportar estes processos. O diagnóstico da infeção por SARS-CoV-2 deve ser realizado com base no historial, sinais, sintomas, possibilidade de exposição e outras provas laboratoriais, além da identificação do SARS-CoV-2.

Os testes rápidos moleculares que identificam o vírus-alvo nos pacientes infetados com SARS-CoV-2 podem ajudar no controlo efetivo do surto global. A infeção por SARS-CoV-2 não é excluída por um resultado negativo. Os resultados não devem ser utilizados como a única base para o diagnóstico, tratamento ou outras decisões para gestão do paciente.

O Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 destina-se a ser utilizado por todos os profissionais de saúde.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença respiratória aguda causada por infeção por SARS-CoV-2, inicialmente denunciada à OMS em Wuhan, na China, a 31 de dezembro de 2019. O SARS-CoV-2 pertence à mesma família dos vírus da Síndrome respiratória aguda grave (SARS) e propaga-se de pessoa para pessoa. As gotículas que contêm vírus expelidas por uma pessoa infetada podem ser transmitidas através do nariz, dos olhos ou da boca, para outra pessoa.

Os sintomas da infeção por SARS-CoV-2 variam, podem causar doenças leves com rinorreia, dor de garganta, tosse e febre. Em casos graves, pode levar a pneumonia, dificuldades respiratórias ou morte.








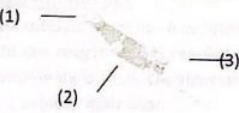

O Teste SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 realizado com o equipamento VitaPCR™ é um teste de diagnóstico molecular *in vitro* rápido que utiliza uma tecnologia de amplificação da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) para a deteção qualitativa do RNA viral do SARS-CoV-2. O produto contém iniciadores, sondas marcadas por fluoróforo e material de controlo usado em RT-PCR em Tempo Real para a deteção qualitativa *in vitro* de RNA específico do SARS-CoV-2 em amostras respiratórias.

PRINCÍPIO DO TESTE

O Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 realizado com o equipamento VitaPCR™ é um teste de diagnóstico molecular rápido *in vitro* que utiliza uma tecnologia de amplificação da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). É usado para a deteção e discriminação qualitativa do RNA viral SARS-CoV-2 em exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos obtidos de pacientes com suspeitas de COVID-19 segundo os seus médicos. O teste está concebido para a deteção do RNA específico de SARS-CoV-2 e o RNA universal do tipo SARS (incluindo SARS-CoV-2, SARS-CoV, coronavírus de morcego tipo SARS), e ambos os alvos de deteção estão localizados nas regiões do gene nucleocapsídeo (N) do vírus. O teste inclui um RNA de cadeia simples artificial como controlo Interno (CI) para monitorizar todo o processo de RT-PCR.

A deteção de sequências alvo é conseguida através de uma sonda de deteção clivada específica para SARS-CoV-2, marcada por fluoróforo, com medição em tempo-real, uma sonda universal para vírus de tipo SARS e uma sonda de deteção de RNA de controlo Interno, seguidas de amplificação da sequência por pares de iniciadores complementares específicos. Em seguida, o tubo de reagente é carregado no equipamento VitaPCR™ e o tempo de resposta da análise de uma amostra é de cerca de 20 minutos.

1

REAGENTES E MATERIAIS	
Materiais fornecidos	
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	
	Tampão_A de colheita de amostras VitaPCR™: Tubo de plástico com tampa de rosca que contém 4 ml de tampão de colheita de amostra.
	Tubo de reagente: Tubo de teste transparente com reagentes liofilizados pela amplificação alvo do RNA do SARS-CoV-2.
	Tampa do tubo de reagente: Uma tampa de plástico usada para selar o tubo de reagente após adicionar a amostra.
Guia de referência rápido para o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	
Materiais necessários, mas não fornecidos	
	Equipamento VitaPCR™
	Suporte
	Adaptador de alimentação (INPUT: AC 100-240V, 2.0A Max, 50- 60Hz. SAÍDA: DC 12V, 5A)
	Exsudado nasofaríngeo ou exsudado orofaríngeo: Para garantir um desempenho otimizado do teste, usar EXCLUSIVAMENTE zaragatoas que atendam às exigências da diretiva CE sobre os dispositivos médicos. Para evitar interferências, não utilizar zaragatoas com cabos em madeira ou em alginato de cálcio, pois podem conter um inibidor da reação. Recomendamos fortemente a utilização de zaragatoas floculadas de fibra sintética com cabos de plástico.
Manual do Utilizador do Equipamento VitaPCR™ Guia de referência rápida do equipamento VitaPCR™	
Materiais não fornecidos, mas vendidos em separado	
	Pipeta de transferência: Componente de plástico descartável de utilização única com três bulbos de ar. O bulbo de topo (1) é utilizado para aspirar e distribuir a solução. O bulbo do meio (2) é utilizado para pipetar. O bulbo inferior (3) é utilizado como câmara de descarga. É usada para transferir o extrato da amostra do tampão de colheita de amostra para o tubo de reagente.
	Pipeta ajustável e ponta com filtro: As pipetas ajustáveis distribuem sempre a mesma quantidade de líquido. É usada para transferir o extrato da amostra do tampão de colheita de amostra para o tubo de reagente.

Materiais não fornecidos, mas vendidos em separado

Controlo externo

Conjunto de Controlo Externo para SARS-CoV -2 -2
VitaPCR™ Gen 2

Os controlos externos estão disponíveis, mas não são fornecidos neste teste. Por favor contacte o seu revendedor local se for necessário.

PRECAUÇÕES

1. Para diagnóstico *in vitro*.
2. Evitar qualquer contacto entre a pele e o tampão de colheita de amostra. Colocar luvas antes de realizar o teste.
3. Usar apenas com o Equipamento VitaPCR™.
4. Tratar todas as amostras como agentes potencialmente infecciosos. Seguir as precauções universais ao manusear as amostras e os conteúdos deste kit. Seguir as orientações para manuseamento das amostras.
5. A colheita, armazenamento e transporte adequados da amostra são essenciais para obter resultados corretos. Utilizar apenas tipos de amostra validados, tal como descrito em "Uso pretendido".
6. Os exsudados dos pacientes anteriormente armazenados no VTM ou UTM não são recomendados pois invalidam o teste.
7. Não abrir o alumínio dos tubos de reagente antes de realizar o teste.
8. Não usar o *kit* após a data de validade.
9. Se os componentes do teste caírem, ficarem rachados, danificados ou abertos ao ser recebidos, NÃO OS USAR e eliminá-los. Não utilizar tesouras ou objetos afiados para abrir as bolsas de alumínio pois pode danificar os componentes do teste.
10. Se o tampão de colheita de amostra for derramado durante a abertura, limpar a área de trabalho seguindo as instruções fornecidas no Manual do Utilizador. Se for necessário ou se existir a suspeita de contaminação, repetir o teste com um novo tampão de colheita de amostra.
11. Não deixar nada no suporte nem no dispositivo após o teste. Eliminar os componentes em conformidade com as instruções de remoção descritas no Manual do Utilizador deste dispositivo, e com os requisitos locais e nacionais. Respeitar as normas nacionais ou locais para a eliminação correta dos resíduos.
12. Todos os materiais do *kit* são peças de utilização única. Não podem ser usados para várias amostras.
13. O tubo de reagente contém muitos segmentos de vírus após a reação. Deve ser eliminado e a tampa não pode ser aberta após realizar o teste.
14. As amostras do teste poderão, em casos raros, conter inibidores que fazem o teste falhar. A taxa de erro é um resultado caso a caso.
15. As amostras positivas anteriores deixadas na área de trabalho podem resultar em falsos positivos. Manusear as amostras seguindo as práticas laboratoriais normais. Limpar o dispositivo e as superfícies circunstantes seguindo o Manual do Utilizador.
16. Amostras com sangue visível podem interferir com o desempenho do teste.
17. Não tocar nas extremidades das zaragatoas das amostras. Pode ocorrer contaminação que interfere com o desempenho do teste.

CONTROLO DE QUALIDADE

Controlo Interno (IC)

Em cada tubo de reagente é incluído um controlo interno que verifica o inteiro processo de PCR. O controlo interno monitoriza a validade dos reagentes das reações de PCR associadas com a amostra. Entre todos os resultados gerais, o controlo interno exhibe constantemente o sinal. Em algumas circunstâncias especiais é possível que o alvo seja detetado sem o sinal de controlo interno devido à inibição molecular.

Controlos positivos e negativos externos

- O controlo positivo consiste numa transcrição do RNA do segmento do gene N do SARS-CoV-2 cuja sequência é usada como alvo para o iniciador/sonda universal e o iniciador/sonda específico.
- Adicionar 40 µl de controlo positivo no tampão de colheita de amostra do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 e seguir imediatamente o procedimento do teste para efetuar o teste de controlo positivo.
- O Tampão de colheita de amostra (SCB) pode ser usado como controlo negativo, seguindo o procedimento do teste para efetuar o teste de controlo negativo.
- Estes controlos são usados para testes de controlo de qualidade e sempre que chega uma nova encomenda de kits ou que se

www.credodxbiomed.com

3

cred
DIAGNOSTICS

forma um novo operador, e em conformidade com os procedimentos internos de controlo de qualidade, e com normas locais, regionais ou nacionais, grupos de acreditação ou procedimentos laboratoriais.

- Se o teste externo de controlo de qualidade falhar, repetir novamente o teste ou contactar o distribuidor local.

Controlo de qualidade					
Tipo de controlo	Tipo de controlo Nome do controlo externo	Usado para monitorizar	RNA específico do SARS- CoV-2	RNA universal do tipo da SARS	Controlo interno
Controlo positivo	Segmento do Gene N do SARS- CoV-2	Falha substancial do reagente, incluindo a integridade do iniciador e da sonda de deteção	+	+	+
Controlo negativo	Tampão de colheita de amostra	Contaminação do reagente e/ou ambiental	-	-	+

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Armazenar o kit de reagente a 5-25°C. O Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 é estável até à data de validade assinalada na embalagem exterior e nos recipientes. Certificar-se de que todos os materiais do teste atingiram a temperatura ambiente antes da utilização.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DAS AMOSTRAS

Utilizar amostras acabadas de colher para garantir um desempenho otimizado do teste. Uma colheita de amostras inadequada ou um manuseamento/armazenamento/transporte inadequado das amostras pode dar resultados errados.

Para garantir um desempenho otimizado do teste, usar EXCLUSIVAMENTE zaragatoas que atendam às exigências da diretiva CE sobre os dispositivos médicos. Para evitar interferências, não utilizar zaragatoas com cabos em madeiras ou em alginato de cálcio, pois podem conter um inibidor da reação. Recomendamos fortemente a utilização de zaragatoas floculadas de fibra sintética com cabos de plástico. Colocar os exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos recolhidos do mesmo paciente imediatamente no tampão de colheita de amostra.

Exsudado nasofaríngeo (exsudado NF)

Inserir cuidadosamente a zaragatoa na narina e passar a zaragatoa diretamente para trás, sem inclinar a extremidade da zaragatoa para cima ou para baixo. Rodando levemente, inserir a zaragatoa nas narinas anteriores, paralelamente ao palato, fazendo avançar a zaragatoa para a nasofaringe; deixar imóvel alguns segundos e depois rodar lentamente a zaragatoa ao retirá-la. Para garantir uma colheita adequada, a zaragatoa deve ter passado uma distância a meio entre o nariz e a ponta da orelha. NÃO USAR FORÇA ao inserir a zaragatoa.

Exsudado orofaríngeo (exsudado OF)

Passar a zaragatoa na faringe posterior e nas amígdalas, evitando a língua.

TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras recolhidas nas zaragatoas devem ser testadas logo que possível. Se não for possível testá-la imediatamente, remete-se às seguintes orientações para o transporte e o armazenamento:

1. Amostra em zaragatoa armazenada a 2°C- 8°C até 24 horas.
2. A amostra eluída no Tampão de colheita de amostra (SCB) pode ser armazenada a:
 - 2°C a 25°C até 7 dias (idealmente: de 2°C a 8°C refrigerada).
 - No caso de um armazenamento a longo prazo, as amostras devem ser congeladas a -80°C.

Os exsudados dos pacientes anteriormente armazenados no VTM ou UTM não são recomendados pois invalidam o teste.



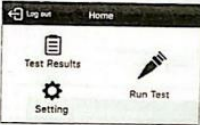



Nota: Conservar as amostras à temperatura acima indicada. Não congelar repetidamente as amostras.

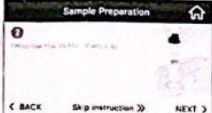
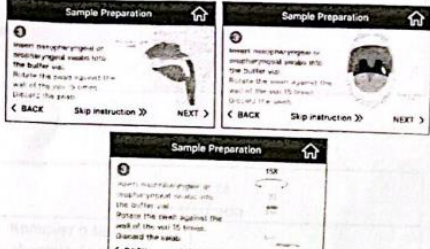
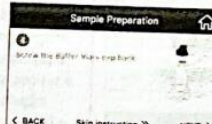

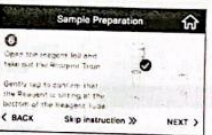
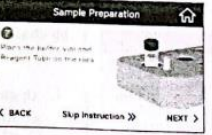
PROCEDIMENTO DO TESTE

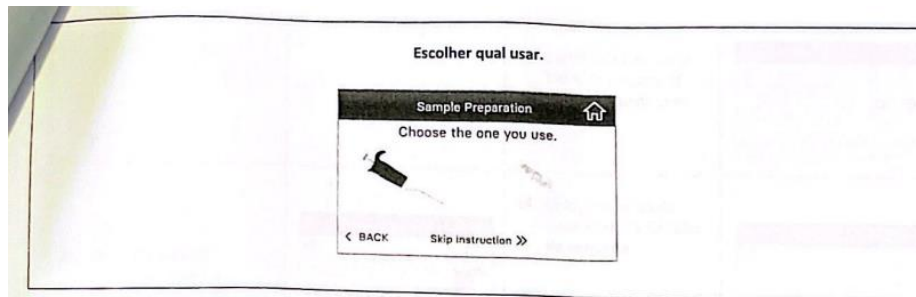
Antes do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2:

- Deixar que todas as amostras fiquem à temperatura ambiente.
- Deixar que todos os componentes do teste fiquem à temperatura ambiente.

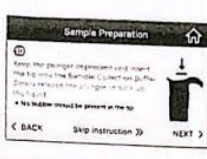
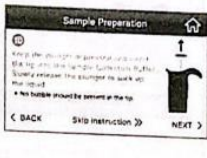

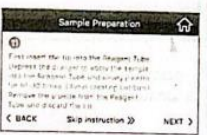

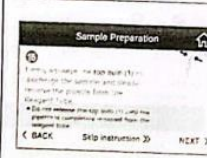

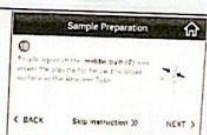

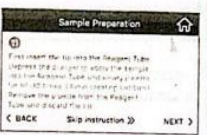

Para obter os melhores resultados, os exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos diretos devem ser testados imediatamente após a colheita.

<p>Colocar o Equipamento VitaPCR™ numa superfície plana. Ligar o equipamento VitaPCR™ pressionando o botão de alimentação na parte da frente do equipamento</p>	
<p>Selecionar o ID de utilizador (<i>Select User ID</i>) Introduzir o código de utilizador (<i>Enter User Passcode</i>). Pressionar 'Log in'.</p>	
<p>Pressionar 'Run Test'.</p>	
<p>Ligar o equipamento VitaPCR™ pressionando o botão de alimentação na parte frontal do equipamento.</p>	
<p>Ler ou introduzir manualmente o ID do paciente (<i>Patient ID</i>). Confirmar o kit de produto (<i>Product Kit</i>) e o ID do paciente (<i>Patient ID</i>).</p>	
<p>1. Rotular o frasco do tampão com o ID do paciente e a data.</p>	

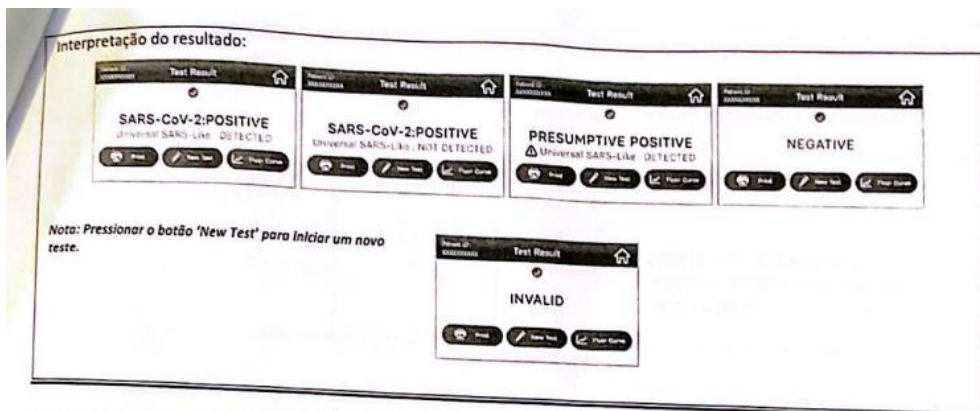
<p>2. Desapertar a tampa do frasco do tampão.</p>	
<p>3. Inserir o exsudado nasofaríngeo ou orofaríngeo dentro do frasco do tampão. Girar a zaragatoa contra a parede do frasco pelo menos 15 vezes. Eliminar a zaragatoa.</p>	
<p>4. Apertar a tampa do frasco do tampão.</p>	
<p>5. Inverter o frasco do tampão 10 vezes. Colocar o frasco do tampão no suporte.</p>	
<p>6. Abrir a bolsa de alumínio do reagente e extrair o tubo de reagente. Bater ao de leve para confirmar que o reagente se encontra no fundo do tubo de reagente.</p>	
<p>7. Colocar o frasco do tampão e o tubo de reagente no suporte.</p>	



Pipeta ajustável e ponta com filtro	Pipeta de transferência
<p>8. Remover o selo de alumínio do tubo de reagente. Desapertar a tampa do frasco do tampão.</p>	<p>8. Remover o selo de alumínio do tubo de reagente. Desapertar a tampa do frasco do tampão. Retirar a pipeta da embalagem. O bulbo de topo (1) é utilizado para aspirar e distribuir a solução. O bulbo do meio (2) é utilizado para pipetar. O bulbo inferior (3) é utilizado como câmara de descarga.</p> <p>* NÃO apertar o bulbo inferior (3) durante a operação.</p>
<p>9. Definir o volume para 30 µl se se estiver a usar uma pipeta com volume ajustável.</p> <p>Instalar a ponta da pipeta na pipeta, firmemente.</p>	<p>10. Apertar firmemente o bulbo de topo (1) sem libertar a pressão.</p> <p>11. Manter o bulbo de topo (1) apertado e colocar a ponta da pipeta por cima da superfície do líquido do Tampão de colheita de amostra.</p> <p>12. Manter a ponta da pipeta por cima da superfície do líquido e libertar delicadamente a pressão no bulbo de topo (1).</p>

<p>10. Manter o êmbolo apertado e inserir a ponta no tampão de colheita de amostra.</p> <p>Libertar lentamente o êmbolo para aspirar o líquido</p> <p>*A ponta deve estar livre de bolhas.</p>	 	<p>13. Certificar-se de que a haste da pipeta está cheia de líquido sem bolhas.</p>	
<p>11. Inserir a ponta no tubo do reagente.</p> <p>Apertar o êmbolo para distribuir a amostra no tubo de reagente e pipetar lentamente 10-30 vezes.</p>		<p>14. Colocar a ponta da pipeta dentro do Tubo de reagente.</p> <p>15. Apertar firmemente o bulbo de topo (1) para distribuir a amostra e remover lentamente a pipeta do tubo de reagente.</p> <p>* NÃO libertar o bulbo de topo (1) antes de retirar completamente a pipeta do tubo de reagente.</p>	 
<p>12. Pipetar 10-30 vezes o líquido para distribuir a amostra no tubo de reagente.</p>		<p>16. Apertar firmemente o bulbo do meio (2) e inserir a ponta da pipeta por cima da superfície do líquido no tubo de reagente.</p> <p>17. Distribuir de forma contínua e apertar o bulbo do meio (2) para pipetar 10-30 vezes e dissolver o reagente na amostra.</p>	 
<p>18. Pipetar 10-30 vezes o líquido para distribuir a amostra no tubo de reagente.</p>		<p>18. Libertar o bulbo do meio (2) e apertar firmemente o bulbo de topo (1) para distribuir todo o líquido da haste da pipeta.</p>	

<p>Remover a pipeta do tubo de reagente e eliminar a ponta.</p> <p>*Nota. Evitar a formação de bolhas</p>		<p>* NÃO libertar o bulbo de topo (1) antes de retirar completamente a pipeta do tubo de reagente.</p>	
<p>12. Recolher a tampa do reagente. Fechar o tubo com a tampa. (Pressionar a tampa até ouvir um clique).</p> <p>*Nota. Certificar-se de que não há espaço entre a tampa e o tubo do reagente.</p> <p>13. Fazer oscilar o tubo num movimento rápido, acentuado, três vezes, para remover as bolhas.</p>		<p>19. Recolher a tampa do reagente. Fechar o tubo com a tampa. (Pressionar a tampa até ouvir um clique).</p> <p>*Nota. Certificar-se de que não há espaço entre a tampa e o tubo de reagente.</p> <p>20. Fazer oscilar o tubo num movimento rápido, acentuado, três vezes, para remover as bolhas.</p>	
<p>Pressionar o botão para abrir a tampa.</p> <p>Inserir o tubo de reagente e fechar a tampa.</p> <p>Pressionar 'Run' para iniciar a reação.</p>			
<p>Verificar que no ecrã do VitaPCR™ a percentagem do processo está a aumentar. A barra de progresso torna-se azul enquanto a reação está em curso.</p> <p>Nota:</p> <ul style="list-style-type: none"> O ecrã continuará a exibir a percentagem até estar completa a 100%. O VitaPCR™ apitará no final do processamento do teste. A tampa estará bloqueada durante a reação. Não tentar reabrir a tampa do VitaPCR™ até que o ecrã indique que o teste está terminado. Para abortar o teste, pressionar 'End Run' e aguardar pelas instruções no ecrã. Não movimentar nem desconectar o VitaPCR™ enquanto o teste está a ser processado. 			



INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E RELATÓRIO

A tabela abaixo lista os resultados esperados para o Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2.

Deteção de RNA específico do SARS-CoV-2	Deteção de RNA universal de tipo SARS	Controlo Interno	Resultado	Interpretação
+	+	±	Positivo	RNA para SARS-CoV-2 detetado. São detetados tanto o RNA específico do SARS-CoV-2 como o RNA universal de tipo SARS.
+	-	±		RNA para SARS-CoV-2 detetado. (O RNA universal parecido com a SARS não detetado pode ser devido a uma carga vírémica baixa na amostra ou à acumulação de mutações ao longo do tempo.)
-	+	±	Presumível positivo	Presumível positivo para RNA de SARS-CoV-2. (O RNA específico do SARS-CoV-2 não detetado pode ser devido a uma carga vírémica baixa na amostra ou à acumulação de mutações ao longo do tempo.) A amostra deve ser testada novamente. Para amostras com um resultado presumível positivo repetido, devem ser realizados testes adicionais de confirmação, se for necessário diferenciar entre SARS-CoV-2 e SARS-CoV-1 ou outros coronavírus de tipo SARS que atualmente se desconhece se infetam humanos, para fins epidemiológicos ou de gestão clínica.

-	-	+	Negativo	RNA para SARS-CoV-2 não detetado.
-	-	-	Inválido	Inibição de RT-PCR ou falha dos reagentes. Recolher uma nova amostra e repetir o teste.

NOTA:

Devido à evolução molecular do SARS-CoV-2, existe um risco inerente para qualquer sistema de testes de PCR que a acumulação de mutações ao longo do tempo produza resultados de falsos negativos.

LIMPEZA DO DISPOSITIVO

Recomendamos limpar o Equipamento VitaPCR™ todos os dias após a utilização.

Procedimento:

1. Desligar a ficha de alimentação da tomada e do VitaPCR™.
2. Fechar a tampa.
3. Usando etanol a 70% ou um toalhete germicida descartável, limpar delicadamente as superfícies exteriores do VitaPCR™, removendo qualquer resíduo.

NOTA: Não pressionar o toalhete contra as aberturas do equipamento VitaPCR™.

4. Usando um toalhete limpo, limpar a parte frontal do VitaPCR™ duas vezes, de cima para baixo, e depois duas vezes da esquerda para a direita. Seguir o mesmo procedimento para a parte posterior, superior e inferior do VitaPCR™.
5. Não deixar que líquidos se acumulem perto das aberturas. Certificar-se de que não entram líquidos no dispositivo.
6. Deixar o equipamento secar durante pelo menos 10 minutos e verificar que está completamente seco antes de voltar a ligar o cabo de alimentação ao adaptador AC.

LIMITAÇÕES

- O desempenho do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 é determinado pelos procedimentos descritos neste documento. O não cumprimento das instruções pode prejudicar o desempenho do teste.
- O teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 deve ser usado exclusivamente para amostras de exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos.
- A colheita, armazenamento ou transporte incorretos das amostras pode resultar em falsos negativos.
- Os resultados dos testes também devem ter em conta o historial médico do paciente, os sintomas e sinais clínicos e os resultados de outros testes diagnósticos.
- Como no caso dos outros testes, os resultados negativos não excluem infeções de SARS-CoV-2 e não devem ser usados como base única para decisões de gestão do paciente.
- Os resultados de falso negativo podem ocorrer se os níveis de vírus forem inferiores ao limite de deteção.
- Os resultados de falso negativo podem ocorrer se existirem mutações nas regiões alvo do teste.
- A presença de inibidores na amostra pode levar a resultados inválidos.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Sensibilidade analítica (limite de deteção)

Os estudos de LoD determinam a concentração mais baixa detetável em que $\geq 95\%$ (19/20) das réplicas testam como positivas. O vírus recombinante que contém o RNA SARS-CoV-2 (Seracare, AccuPlex SARS-CoV-2, número de material 0505-0129) foi diluído em série na matriz clínica simulada para o estudo de determinação do LoD. O SARS-CoV-2 AccuPlex é acrescentado no tampão de colheita de amostra que consiste numa matriz clínica negativa para imitar a amostra clínica. A matriz clínica negativa é criada a partir de amostras nasofaríngeas ou orofaríngeas colhidas de pacientes, armazenadas a -20°C num tubo de plástico limpo, seco, firmemente selado, por 24 horas antes do teste. As amostras realizam o procedimento operacional padrão com o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 seguindo as instruções de utilização.

Estes dados demonstram que o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 deteta 1,0 cópias/ μl do vírus recombinante de SARS-CoV-2 com uma fiabilidade de $\geq 95\%$. Esta concentração serve como limite de deteção.

Sensibilidade analítica (limite de deteção) da deteção da região específica do SARS-CoV-2			
Concentração de RNA (cópias/ μl)	% de deteção das réplicas	Ct médio	Desvio padrão (Ct)
1,0	100 (20/20)	37,00	1,45
0,5	90 (18/20)	37,94	0,94

Sensibilidade analítica (limite de deteção) da deteção da região de tipo SARS universal			
Concentração de RNA (cópias/ μl)	% de deteção das réplicas	Ct médio	Desvio padrão (Ct)
1,0	100 (20/20)	37,95	1,10
0,5	85 (17/20)	39,47	0,94

Especificidade analítica *in silico* (reatividade cruzada)

Foi realizada uma análise BLASTn com o iniciador e a sonda do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 contra todas as sequências de ácido nucleico disponíveis publicamente na GenBank à data de 6 de março de 2020. A coleção de nucleotídeos consta de sequências GenBank, EMBL, DDBJ, PDB e RefSeq, mas exclui sequências patenteadas EST, STS, GSS, WGS e TSA, bem como as sequências HTGS de fase 0, 1 e 2 e sequências mais longas de 100Mb. Os parâmetros de pesquisa são ajustados automaticamente para sequências curtas e o limiar esperado é de 100. As pontuações de correspondência são respetivamente de 1 e -3. A penalidade para criar e estender um intervalo é respetivamente de 5 e 2.

Iniciador/sonda específicos do SARS-CoV-2

As sequências de iniciador direto (forward) e reverso (reverse) para a deteção do RNA específico do SARS-CoV-2 mostraram uma homologia de sequência elevada com os coronavírus do morcego. Contudo, a sequência da sonda não mostrou homologia de sequência com o coronavírus SARS, coronavírus parecido com a SARS do morcego e outro genoma de coronavírus (exceto o coronavírus RaTG13 do morcego), ou genoma humano. Combinando os iniciadores e a sonda, não há previsão de potenciais resultados RT-PCR de falsos positivos.

Iniciador/sonda universais de tipo SARS

A análise das sequências de iniciador e sondas direto (forward) e reverso (reverse) do RNA viral de tipo SARS universal mostraram uma homologia significativa apenas com o coronavírus SARS humano e o coronavírus de tipo SARS do morcego. Combinando os iniciadores e as sondas, não existem homologias significativas com o genoma humano, ou outros coronavírus (exceto o coronavírus do morcego RaTG13) que possam prever potenciais resultados de falsos positivos da RT-PCR.

em síntese, não são esperadas reatividades cruzadas acidentais para ambos os alvos.

Especificidade analítica (reatividade cruzada)

O desempenho de reatividade cruzada do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 foi avaliado testando os organismos inteiros ou as amostras representativas apropriadas listadas abaixo. Estes organismos foram testados em três réplicas neste estudo. Foi adicionado nas amostras de testes um alto nível deste organismo (a saber, 10^6 CFU/ml para bactérias e 10^5 TCID₅₀/ml para vírus) no tampão de colheita de amostra com a matriz clínica e, posteriormente, foi testado com o teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 segundo o mesmo procedimento operacional para ver se era identificada alguma reação de falso-positivo.

Não foi observada reatividade cruzada do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 com os organismos selecionados às concentrações testadas. Em princípio, os coronavírus SARS devem ser detetados pelos iniciadores/sondas universais de tipo SARS (os resultados foram ilustrados como "Presumível positivo").

Organismos	Concentração	Detecção de RNA específico do SARS-CoV-2	Detecção de RNA universal de tipo SARS
		Resultado (x/3)	Resultado (x/3)
Coronavírus humano 229E	$1,00 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3
Adenovírus humano tipo 1	$5,62 \times 10^8$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3
Gripe A/Califórnia/7/2009 (H1N1)	$3,16 \times 10^6$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3
Gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	$3,16 \times 10^7$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3
Gripe B/Malásia/2506/2004 (B/Victoria)	$3,16 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3
Vírus sincicial respiratório (longo A)	$1,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /ml	0/3	0/3

Estudo sobre as substâncias interferentes endógenas

Para demonstrar que a função prevista do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 é operacional enquanto a amostra é testada na presença de substâncias endógenas comuns, testámos individualmente as substâncias interferentes, adicionando as substâncias interferentes a amostras positivas com 3xLoD para detetar se ocorriam resultados inesperados. Foram executadas três réplicas para cada teste.

Substâncias interferentes: A tabela abaixo mostra a avaliação das substâncias interferentes no que se refere à capacidade de gerar resultados de falsos positivos:

Substância potencialmente interferente	Concentração	Resultados (Detetados X/3)
Mucina	0,05%	0/3
Sangue	0,1%	0/3

Substâncias interferentes: A tabela abaixo mostra a avaliação das substâncias interferentes no que se refere à capacidade de gerar resultados de falsos negativos:

Substância potencialmente interferente	Concentração	Adição 3xLoD SARS-CoV-2 Resultados (Detetados X/3)
Mucina	0,05%	3/3
Sangue	0,1%	3/3

Desempenho clínico

Devido à dificuldade em obter amostras clínicas de pacientes infetados com SARS-CoV-2, as características de desempenho do Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 foram avaliadas usando amostras clínicas artificiais. Neste teste foi utilizado o vírus recombinante que contém o RNA SARS-CoV-2 (Seracare, AccuPlex SARS-CoV-2, número de material 0505-0129). O vírus recombinante que contém o RNA de SARS-CoV-2 com título reconhecido foi preparado para fortificar 30 amostras de exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos individuais negativos com concentrações diferentes. Foi acrescentado às cegas, de forma casual e em spiking no tampão de colheita de amostra onde são lavados os exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos individuais. 20 exsudados nasofaríngeos ou orofaríngeos foram acrescentados em spiking a 1,5x LoD, 5 a 3x LoD e 5 a 5x LoD. Outros 30 exsudados NF ou OF negativos foram deixados sem adição. Em resumo, adicionámos exsudados NF ou OF em amostras artificiais com várias concentrações, e em seguida procedemos com o teste desta secção.

Todas as 60 amostras foram distribuídas às cegas a operadores imparciais para serem analisadas com o Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2 para gerar a percentagem de acordo positivo (PPA), percentagem de acordo negativo (NPA) e percentagem de acordo geral (OPA) como medição de precisão de diagnóstico estimada:




















Exsudados nasofaríngeos (NF)		Amostra clínica artificial (Resultado esperado)	
Variável	Estado	Positivo	Negativo
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	Positivo	30	0
	Negativo	0	30
Percentagem de acordo positivo (PPA) (95% CI) ¹		100% (88,4 - 100)	
Percentagem de acordo negativo (NPA) (95% CI) ²		100% (88,4 - 100)	
Percentagem de acordo geral (OPA) (95% CI) ³		100% (94,0 - 100)	
Nota:			
1 Percentagem de Acordo Positivo = [Verdadeiros positivos / (Verdadeiros positivos + Falsos negativos)] *100%			
2 Percentagem de acordo negativo = [Verdadeiros negativos / (Verdadeiros negativos + Falsos positivos)] *100%			
3 Percentagem de acordo geral = [(Verdadeiros positivos + Verdadeiros negativos) / (Verdadeiros positivos + Falsos negativos + Verdadeiros negativos + Falsos positivos)] *100%			


Amostras orofaríngeas (OF)		Amostra clínica artificial (Resultado esperado)	
Variável	Estado	Positivo	Negativo
Teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2	Positivo	30	0
	Negativo	0	30
Percentagem de acordo positivo (PPA) (95% CI) ¹		100% (88,4 - 100)	
Percentagem de acordo negativo (NPA) (95% CI) ²		100% (88,4 - 100)	
Percentagem de acordo geral (OPA) (95% CI) ³		100% (94,0 - 100)	
Nota:			
1 Percentagem de Acordo Positivo = [Verdadeiros positivos / (Verdadeiros positivos + Falsos negativos)] *100%			
2 Percentagem de acordo negativo = [Verdadeiros negativos / (Verdadeiros negativos + Falsos positivos)] *100%			
3 Percentagem de acordo geral = [(Verdadeiros positivos + Verdadeiros negativos) / (Verdadeiros positivos + Falsos negativos + Verdadeiros negativos + Falsos positivos)] *100%			

INFORMAÇÃO DE CONTACTO, ENCOMENDAS E APOIO AO CLIENTE

Para apoio técnico e relativo aos produtos, contactar
e-mail : service@credodxbiomed.com

SÍMBOLOS

	Não reutilizar		Fabricante
	Consultar as instruções de utilização		Controlo positivo
	Atenção		Controlo negativo
	Limite de temperatura		Número de catálogo
	Prazo de validade		Contém o suficiente para <n> testes
	Código do lote		Número do paciente
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Manter afastado da luz solar
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Manter seco
	Marcação CE		Representante autorizado na União Europeia
	REEE - Os equipamentos elétricos marcados com este símbolo são sujeitos à diretiva da União Europeia 2012/19/UE (REEE) e não podem ser eliminados com os resíduos municipais		

 **Trentron Biomedical Ltd.**
(Building A) 35F, No. 99, Sec. 1, Xintai 5th Rd.,
Xizhi Dist., New Taipei City 22175, Taiwan
(R.O.C.) Tel.: +886-2-2697-2728
Fax: +886-2-2697-1876
E-mail: service@credodxbiomed.com



MedNet GmbH
Borkstraße 10, 48163 Münster,
Alemanha

ver. 1.1

www.credodxbiomed.com

15

credo
DIAGNOSTICS

Anexo 5- Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay: Desempenho Clínico



Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

DESEMPENHO

1. Especificidade Analítica

A alta especificidade do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay é assegurada pelos oligos designados especificamente para os alvos de interesse. Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay foi testado para a reatividade cruzada para 120 diferentes patógenos e a deteção e amplificação do PCR só foram identificados para os alvos especificados.

Nº	Organismo	Origem	Isolado Nº	Resultado†
1	Influenza A H1N1 (Brisbane/59/07)	ZMC	0810244CF	Flu A Detectado
2	Influenza A H1N1 (New Cal/20/99)	ZMC	0810036CF	Flu A Detectado
3	Influenza A H1N1 (PR/8/34)	ZMC	0810245CF	Flu A Detectado
4	Influenza A H1N1 (Singapore/63/04)	ZMC	0810246CF	Flu A Detectado
5	Influenza A H1N1 (Solomon Islands/03/06)	ZMC	0810036CFN	Flu A Detectado
6	Influenza A H1N1 (Taiwan/42/06)	ZMC	0810247CF	Flu A Detectado
7	Influenza A virus (H1N1) (A/FM/1/47)	ATCC	VR-97	Flu A Detectado
8	Influenza A virus (H1N1) (A/NWS/33)	ATCC	VR-219	Flu A Detectado
9	Influenza A virus (H1N1) (A/WS/33)	ATCC	VR-825	Flu A Detectado
10	Influenza A H1N1pdm (California/07/09)	ZMC	0810165CF	Flu A Detectado
11	Influenza A H1N1pdm (Canada/6294/09)	ZMC	0810109CFJ	Flu A Detectado
12	Influenza A H1N1pdm (Mexico/4108/09)	ZMC	0810166CF	Flu A Detectado
13	Influenza A H1N1pdm (NY/01/09)	ZMC	0810248CF	Flu A Detectado
14	Influenza A H1N1pdm (NY/02/09)	ZMC	0810109CFN	Flu A Detectado
15	Influenza A H1N1pdm (NY/03/09)	ZMC	0810249CF	Flu A Detectado
16	Influenza A H1N1pdm Virus (Michigan/45/15)	ZMC	0810538CF	Flu A Detectado
17	Influenza A virus (H1N1-pdm09) (A/Virginia/ATCC1/2009)	ATCC	VR-1736	Flu A Detectado
18	Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07)	ZMC	0810138CF	Flu A Detectado
19	Influenza A H3N2 (HK/8/68)	ZMC	0810250CF	Flu A Detectado
20	Influenza A H3N2 (Perth/16/09)	ZMC	0810251CF	Flu A Detectado
21	Influenza A H3N2 (Texas/50/12)	ZMC	0810238CF	Flu A Detectado
22	Influenza A H3N2 (Victoria/361/11)	ZMC	0810240CF	Flu A Detectado
23	Influenza A H3N2 (Wisconsin/67/05)	ZMC	0810252CF	Flu A Detectado
24	Influenza A H3N2 Virus (Hong Kong/4801/14)	ZMC	0810526CF	Flu A Detectado
25	Influenza A virus (H3N2) (A/Aichi/2/68)	ATCC	VR-547	Flu A Detectado



Nº	Organismo	Origem	Isolado Nº	Resultado†
26	Influenza A virus (H3N2) (A/Port Chalmers/1/73)	ATCC	VR-810	Flu A Detectado
27	Influenza B (Brisbane/33/08)	ZMC	0810253CF	Flu B Detectado
28	Influenza B (Brisbane/60/08)	ZMC	0810254CF	Flu B Detectado
29	Influenza B (Florida/02/06)	ZMC	0810037CF	Flu B Detectado
30	Influenza B (Florida/04/06)	ZMC	0810255CF	Flu B Detectado
31	Influenza B (Florida/07/04)	ZMC	0810256CF	Flu B Detectado
32	Influenza B (Lee/40)	ZMC	0810257CF	Flu B Detectado
33	Influenza B (Malaysia/2506/04)	ZMC	0810258CF	Flu B Detectado
34	Influenza B (Massachusetts/2/12)	ZMC	0810239CF	Flu B Detectado
35	Influenza B (Panama/45/90)	ZMC	0810259CF	Flu B Detectado
36	Influenza B (Texas/6/11)	ZMC	0810242CF	Flu B Detectado
37	Influenza B (Wisconsin/1/10)	ZMC	0810241CF	Flu B Detectado
38	Respiratory Syncytial Virus Type A (12/2014 Isolate #2)	ZMC	0810452CF	RSV Detectado
39	Respiratory Syncytial Virus Type A (3/2015 Isolate #3)	ZMC	0810482CF	RSV Detectado
40	Respiratory Syncytial Virus Type A (2006 isolate)	ZMC	0810040ACF	RSV Detectado
41	Respiratory Syncytial Virus Type A (2014 Isolate 341)	ZMC	0810290CF	RSV Detectado
42	Respiratory Syncytial Virus Type A (2014 Isolate 342)	ZMC	0810291CF	RSV Detectado
43	Respiratory Syncytial Virus Type A (2/2015 Isolate #2)	ZMC	0810474CF	RSV Detectado
44	Respiratory Syncytial Virus Type A (2/2015 Isolate #3)	ZMC	0810475CF	RSV Detectado
45	Respiratory Syncytial Virus Type A (4/2015 Isolate #1)	ZMC	0810481CF	RSV Detectado
46	Respiratory Syncytial Virus Type A (2013 Isolate)	ZMC	0810299CF	RSV Detectado
47	Human respiratory syncytial virus A (Long)	ATCC	VR-26	RSV Detectado
48	Respiratory Syncytial Virus Type B (CH93(18)-18)	ZMC	0810040CF	RSV Detectado
49	Respiratory Syncytial Virus Type B (12/2014 Isolate #1)	ZMC	0810450CF	RSV Detectado
50	Respiratory Syncytial Virus Type B (11/2014 Isolate #2)	ZMC	0810451CF	RSV Detectado
51	Respiratory Syncytial Virus Type B (3/2015 Isolate #1)	ZMC	0810479CF	RSV Detectado
52	Respiratory Syncytial Virus Type B (3/2015 Isolate #2)	ZMC	0810480CF	RSV Detectado
53	Human respiratory syncytial virus B (Strain: 9320)	ATCC	VR-955	RSV Detectado
54	SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01	TWIST BIOSCIENCE	102019	SARS-CoV-2 Detectado
55	SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	TWIST BIOSCIENCE	102024	SARS-CoV-2 Detectado
56	SARS-Related Coronavirus 2, Isolate USA-WA1/2020, Gamma-Irradiated	BEI	NR-52287	SARS-CoV-2 Detectado
57	Human adenovirus 1	ATCC	VR-1	Não Detectado
58	Human adenovirus 18	ATCC	VR-1095	Não Detectado
59	Human adenovirus 2	KBPV	VR-58	Não Detectado



Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

Nº	Organismo	Origem	Isolado Nº	Resultado†
60	Human adenovirus 23	ATCC	VR-1101	Não Detectado
61	Human adenovirus 3	ATCC	VR-3	Não Detectado
62	Human adenovirus 4	ATCC	VR-1572	Não Detectado
63	Human adenovirus 5	KBPV	VR-61	Não Detectado
64	Human adenovirus 8	ATCC	VR-1368	Não Detectado
65	Human coronavirus 229E	ATCC	VR-740	Não Detectado
66	Human coronavirus NL63	ZMC	0810228CF	Não Detectado
67	Human coronavirus HKU1	Amostra isolada Coreana		Não Detectado
68	Human coronavirus OC43	ATCC	VR-1558	Não Detectado
69	Human metapneumovirus	KBPV	VR-86	Não Detectado
70	Human coxsackievirus A24	ATCC	VR-583	Não Detectado
71	Human coxsackievirus A9	KBPV	VR-11	Não Detectado
72	Human coxsackievirus B1	KBPV	VR-13	Não Detectado
73	Human coxsackievirus B2	KBPV	VR-14	Não Detectado
74	Human coxsackievirus B3	KBPV	VR-15	Não Detectado
75	Human coxsackievirus B4	KBPV	VR-16	Não Detectado
76	Human coxsackievirus B5	KBPV	VR-17	Não Detectado
77	Human coxsackievirus B6	KBPV	VR-18	Não Detectado
78	Human echovirus 11	KBPV	VR-22	Não Detectado
79	Human Echovirus 22 (Parechovirus)	KBPV	VR-23	Não Detectado
80	Human echovirus 25	KBPV	VR-24	Não Detectado
81	Human echovirus 30	KBPV	VR-25	Não Detectado
82	Human echovirus 6	KBPV	VR-19	Não Detectado
83	Human echovirus 7	KBPV	VR-20	Não Detectado
84	Human echovirus 9	ATCC	VR-39	Não Detectado
85	Human enterovirus 70	ATCC	VR-836	Não Detectado
86	Human enterovirus 71	ATCC	VR-784	Não Detectado
87	Human herpesvirus 1	ATCC	VR-260	Não Detectado
88	Human herpesvirus 2	ATCC	VR-734	Não Detectado
89	Human parainfluenza virus 1	ATCC	VR-1380	Não Detectado
90	Human parainfluenza virus 2	ATCC	VR-92	Não Detectado
91	Human parainfluenza virus 3	ATCC	VR-93	Não Detectado
92	Human parainfluenza virus 4A	ATCC	VR-1378	Não Detectado
93	Human parainfluenza virus 4B	ATCC	VR-1377	Não Detectado
94	Human rhinovirus 14	ATCC	VR-284	Não Detectado



Nº	Organismo	Origem	Isolado Nº	Resultado†
95	Human rhinovirus 16	ATCC	VR-283	Não Detectado
96	Human rhinovirus 8	ATCC	VR-488	Não Detectado
97	Human Rhinovirus A90	ATCC	VR-1291	Não Detectado
98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	9027	Não Detectado
99	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC	5764	Não Detectado
100	<i>Proteus mirabilis</i>	KCTC	2566	Não Detectado
101	<i>Candida albicans</i>	ATCC	10231	Não Detectado
102	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KCTC	42821	Não Detectado
103	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	33591	Não Detectado
104	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC	19615	Não Detectado
105	<i>Streptococcus mitis</i>	KCCM	42897	Não Detectado
106	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC	BAA-589	Não Detectado
107	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC	13172	Não Detectado
108	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC	53592	Não Detectado
109	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	13048	Não Detectado
110	<i>Enterobacter cloacae</i>	ZMC	801830	Não Detectado
111	<i>Haemophilus influenzae</i>	KCCM	42099	Não Detectado
112	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	BAA-1706	Não Detectado
113	<i>Legionella pneumophila</i>	KCTC	12009	Não Detectado
114	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	15293	Não Detectado
115	SARS-coronavirus, Tor2	ZMC	NATSARS-ST	Não Detectado
116	MERS-coronavirus, EMC/2012	ZMC	NATMERS-ST	Não Detectado
117	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC	25177	Não Detectado
118	<i>Streptococcus salivarius</i>	KCTC	5512	Não Detectado
119	Alphacoronavirus 1 (feline infectious Peritonitis Virus), 79-1146	BEI	NR-49097	Não Detectado
120	Porcine Respiratory Coronavirus, ISU-1	BEI	NR-48572	Não Detectado

† Ensaios de especificidade foram repetidos 3 vezes.

※ ATCC: American Type Culture Collection

BEI: BEI Resources

KBPV: Korea Bank for Pathogenic Viruses

KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms

KCTC: Korean Collection for Type Cultures

ZMC: ZeptoMetrix Corporation

2. Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (limite de deteção) do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay foi determinada com a limitação das diluições das seguintes culturas de vírus: 3 cepas de Influenza A, cada 1 cepa de Influenza B, RSV A, RSV B e a forma irradiada gama de SARS-CoV-2. Cada cepa viral foi seriamente diluída na matriz da amostra negativa. Os ácidos nucleicos foram extraídos de cada diluição com o sistema de extração automatizado (Microlab NIMBUS IVD, Universal Cartridge kit) e analisado com Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.

Alvo deteção	Origem	Cepa	Limite de Deteção (TCID ₅₀ /mL)	Positivo /Total	Taxa positiva (%)
S gene	BEI (Cat. NR-52287)	USA-WA1/2020	0,14	40/40	100
RdRP gene			0,14	40/40	100
N gene			0,14	40/40	100
SARS-CoV-2*			0,028	39/40	97,5
RSV A	Zeptomatrix (Cat. 0810040ACF)	2006 Isolate	0,525	40/40	100
RSV B	Zeptomatrix (Cat. 0810040CF)	CH93(18)-18	0,210	40/40	100
Flu B	Zeptomatrix (Cat. 0810255CF)	Florida/04/06	0,126	40/40	100
Flu A H1N1	Zeptomatrix (Cat. 0810036CF)	New Cal/20/99	4,57	40/40	100
Flu A H1N1pdm	Zeptomatrix (Cat. 0810165CF)	California/07/09	0,417	40/40	100
Flu A H3N2	Zeptomatrix (Cat. 0810240CF)	Victoria/361/11	0,0701	40/40	100

* A SARS-CoV-2 é considerada como "detectado" quando um ou mais dos três genes alvo são positivos.

3. Reprodutibilidade

O ensaio de reprodutibilidade foi preparado com a inclusão de amostras Alta Negativa (0.1 X LoD), Baixa Positiva (1XLoD) e Positiva Moderada (3XLoD). Em cada local de ensaio, o kit foi testado durante cinco dias, duas execuções por dia por dois diferentes experimentadores e triplicado de cada alvo. As taxas positivas foram observadas para cada alvo para estudo de reprodutibilidade: 100,0% para amostras positivas moderadas, ≥95% para amostras Baixas positivas. A reprodutibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay foi avaliada entre execuções, locais e lotes de produtos. Taxas positivas para todas as concentrações e valores CV alcançaram critérios inferiores a 10 (<10).

Os resultados foram satisfeitos com o conjunto de critérios acima, que confirmam os desempenhos de reprodutibilidade do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.

4. Substâncias Interferentes

Não houve efeitos nos resultados pela adição de substâncias: detecções não específicas ou inibições na amplificação do alvo. Com base nos resultados, 7 substâncias interferentes não apresentaram efeito nos resultados do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay.

Nº	Substâncias Interferentes	Origem	Concentração do Ensaio
1	Mucin (glândula submaxilar bovina, tipo I-S)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº M3895)	60 µg/ml
2	Mupirocin (Antibiótico, pomada nasal)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº 1448901)	6,6 mg/ml
3	Oxymetazoline (Spray Nasal Afrin)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº O2378)	15% (v/v)
4	Sangue	Humano	2% (v/v)
5	Tobramycin (Antibacteriano, sistémico)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº T4014)	4,0 µg/mL
6	Zanamivir (Fármaco Relenza antiviral)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº SML0492)	3,3 mg/mL
7	Oseltamivir (Fármaco Tamiflu antiviral)	Sigma-Aldrich (Cat. Nº 1479304)	25 mg/mL

5. Desempenho Clínico

Um total de 292 espécimes foi incluído neste desempenho clínico. Os espécimes consistem de 8 amostras de aspiração nasofaríngea, 122 amostras de esfregaço nasofaríngeo, 7 amostras de lavagem broncoalveolar, 75 amostras de esfregaço orofaríngeo (garganta) e 80 amostras de escarro. Desempenho clínico do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay foi avaliado através da comparação com outro SARS-CoV-2 real-time PCR assay e o respiratory virus real-time PCR assay que foram CE-IVD aprovados antes. O resultado tem mostrado mais de 95% de acordo nas amostras clínicas. Deste modo, foi confirmado que a qualidade do Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay é válida. O desempenho é resumido na tabela.

SARS-CoV-2		Comparador Aprovado CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay	Positivo	152	4*	156
	Negativo	4**	132	136
	Total	156	136	292

- ORA (Taxas gerais do acordo): 97,26% (95% CI: 94,67% a 98,81%)
- PPA (Acordo Percentual Positivo): 97,44% (95% CI: 93,57% a 99,30%)
- NPA (Acordo Percentual Negativo): 97,06% (95% CI: 92,64% a 99,19%)
- Valor Kappa: 0,95 (95% CI: 0,91 a 0,98)

* Sequência e confirmação positiva real

** As amostras mostraram os últimos valores Ct (37 a 40), que são indicativas de cargas virais abaixo de LoD.



Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

Influenza A virus (Flu A)		Comparador Aprovado CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay	Positivo	27	0	27
	Negativo	0	265	265
	Total	27	265	292

- ORA (Taxas gerais do acordo): 100,00% (95% CI: 98,74% a 100,00%)
- PPA (Acordo Percentual Positivo): 100,00% (95% CI: 87,23% a 100,00%)
- NPA (Acordo Percentual Negativo): 100,00% (95% CI: 98,62% a 100,00%)
- Valor Kappa: 1,00 (95% CI: 1,00 a 1,00)

Influenza B virus (Flu B)		Comparador Aprovado CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay	Positivo	7	0	7
	Negativo	0	285	285
	Total	7	285	292

- ORA (Taxas gerais do acordo): 100,00% (95% CI: 98,74% a 100,00%)
- PPA (Acordo Percentual Positivo): 100,00% (95% CI: 59,04% a 100,00%)
- NPA (Acordo Percentual Negativo): 100,00% (95% CI: 98,71% a 100,00%)
- Valor Kappa: 1,00 (95% CI: 1,00 a 1,00)

Respiratory syncytial virus (RSV)		Comparador Aprovado CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
Allplex™ SARS-CoV-2 / FluA/FluB/RSV Assay	Positivo	14	2*	16
	Negativo	0	276	276
	Total	14	278	292

- ORA (Taxas gerais do acordo): 99,32% (95% CI: 97,55% a 99,92%)
- PPA (Acordo Percentual Positivo): 100% (95% CI: 76,84% a 100,00%)
- NPA (Acordo Percentual Negativo): 99,28% (95% CI: 97,43% a 99,91%)
- Valor Kappa: 0,93 (95% CI: 0,83 a 1,00)
- * Sequência e confirmação positiva real

Anexo 6- Procedimento do teste rápido de deteção de antígeno do SARS-CoV-2

1. Colheu-se a amostra com uma zaragatoa descartável;
2. Colocou-se a zaragatoa dentro do tubo com tampão de extração;
3. Girou-se a zaragatoa contra a parede do tubo durante 30 segundos enquanto se apertou o tubo de modo a recolher o máximo de amostra que a zaragatoa contém. Descartou-se a zaragatoa e fechou-se o tubo;
4. Abriu-se a bolsa de alumínio que continha a cassete de teste;
5. Colocou-se 4 gotas da amostra, que estava no tubo com tampão, na cassete de teste;
6. Deixou-se durante 15 minutos e ler o resultado sendo que este podia ser:
 - Negativo;
 - Positivo;
 - Inválido.

Caso o resultado fosse inválido dever-se-ia de se realizar uma nova análise à amostra.

Anexo 7- Procedimento do teste para SARS-CoV-2 VitaPCR™ Gen 2

1. Colocou-se o equipamento VitaPCR™ numa superfície plana e pressionou-se o botão de alimentação na parte da frente do mesmo para o ligar;
2. Selecionou-se o ID de utilizador e introduziu-se o código de utilizador;
3. Pressionou-se “Log in”;
4. Pressionou-se “Run test”;
5. Leu-se/introduziu-se manualmente o ID do kit de produto;
6. Leu-se/introduziu-se o ID do paciente;
7. Confirmou-se o kit de produto e o ID do paciente;
8. Abriu-se a bolsa de alumínio do reagente e retirou-se o tubo que continha o liofilizado. Bateu-se de leve para confirmar que o reagente se encontrava no fundo do tubo;
9. Colocou-se o frasco do tampão e o tubo de reagente no suporte;
10. Removeu-se o selo de alumínio do tubo de reagente e desapertou-se a tampa do frasco do tampão que continha a amostra;
11. Definiu-se o volume de 30 µl na micropipeta e colocou-se a ponta descartável;
12. Pipetou-se 30 µl da amostra para o tubo de reagente;
13. Utilizou-se a técnica de “up and down” para homogeneizar a amostra com os reagentes liofilizados (não deve de haver quaisquer bolhas no tubo);

14. Fechou-se o tubo com a tampa do tubo de reagente;
15. Pressionou-se o botão para abrir a tampa;
16. Inseriu-se o tubo de reagente e fechou-se a tampa;
17. Pressionou-se “Run” para iniciar a reação;

Durante a reação verificou-se no ecrã do equipamento se a percentagem do processo estava a aumentar. Quando completa a reação, a percentagem atingiu os 100% e o equipamento apitou avisando que o processo tinha terminado. Após esta etapa apareceu o resultado no ecrã podendo este ser um dos seguintes:

- SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Detected);
- SARS-CoV-2: Positive (universal SARS-like: Not Detected);
- Presumptive Positive (universal SARS-like: Detected);
- Negative;
- Invalid.

A tampa estava bloqueada durante a reação, no entanto, para abortar o teste poderia se pressionar “End test” e aguardar pelas instruções no ecrã.

Caso o resultado fosse o “Invalid” dever-se-ia de realizar uma nova análise à amostra.

Anexo 8– Transporte e armazenamento das amostras

As amostras após a colheita devem de ser analisadas o mais rápido possível. Quando não é possível, estas devem ser sujeitas às seguintes condições de transporte e armazenamento:

1. Amostra em zaragatoa deveria de ser armazenada a 2°C-8°C até 24 horas;
2. A amostra eluída no tampão de colheita de amostra poderia ser armazenada em:
 - 2°C - a 25°C até 7 dias (idealmente: 2°C - 8°C refrigerada)
 - congeladas a -80°C no caso de um armazenamento de longo prazo.

Anexo 9- Procedimento de extração de RNA- Método automatizado - amostras de 200µL

Este procedimento utilizou componentes do Kit de Isolamento de Ácidos Nucleicos MagMAX™ Viral/Pathogen ou do Kit de Isolamento De Ácido Nucleico MagMAX™ Viral/Pathogen II.

Para **configurar o instrumento** teve de se seguir as seguintes etapas:

1. Verificou-se se o processador de partículas magnéticas KingFisher™ Flex com 96 deep-well head estava configurado com o Bloco de Aquecimento 96 deep-well head KingFisher™ Flex. Caso houvesse uma não utilização da cabeça magnética adequada, assim como do bloco de calor poderia se obter rendimentos mais baixos e causar potenciais danos para o instrumento;
2. O programa MVP_2Wash_200_Flex tinha sido previamente descarregado da página do produto e carregado no instrumento.

De modo a **preparar as placas de processamento** teve de se ter em atenção a tabela 10.1:

Tabela 10.1- Preparação das placas para usar no processamento de amostras de 200 µL. (adaptado da 42)

ID da placa	Posição na placa	Tipo de placa	Reagente	Volume por poço
Placa wash 1	2	KingFisher™ Deepwell 96	Tampão de lavagem	500 µL
Placa wash 2	3		Etanol 80%	500 µL
Placa de eluição	4		Solução de eluição	50 µL
Placa Tip Comb	5	Coloque uma ponta KingFisher™ 96 para as beads magnéticas DW numa placa kingfisher™ 96 KF		

Após a preparação cobriu-se as placas com um vedante temporário (como MicroAmp™ Clear Adhesive Film), depois armazenou-se à temperatura ambiente até 1 hora enquanto se preparava a placa de amostra.

Preparação da mix de beads magnéticas de ligação:

1. Homogeneizou-se a solução que continha as beads magnéticas com o auxílio de um vortéx;

2. Para o número de reações necessárias, preparou-se a Mix de beads magnéticas de ligação de acordo com a tabela 10.2:

Tabela 10.2- Preparação da mix de beads magnéticas de ligação. (adaptado da 42)

Componente	Volume por poço *
Binding solution (Solução de ligação)	265 µL
Beads magnéticas	10 µL
Controlo interno de amostra do kit de rRT-PCR Werfen (RP-V IC 2)	10 µL

* incluiu-se um excesso de 10% ao fazer o Mix de beads de ligação para utilização com múltiplas reações.

3. Misturou-se bem por inversão e armazenou-se à temperatura ambiente.

Preparação da placa de amostras:

1. Adicionou-se 5 µL de Proteinase K a cada poço na placa KingFisher™ Deepwell 96;
2. Adicionou-se 200 µL de amostra a cada poço (homogeneizou-se com auxílio de um vortéx, antes de se colocar no poço);
3. Homogeneizou-se a bead mix e adicionou-se 285 µL a cada poço de amostra;

Processamento das amostras:

1. Selecionou-se a MVP_2Wash_200_Flex no processador de partículas magnéticas Flex KingFisher™ com 96 cabeças de poço profundo;
2. Iniciou-se a corrida e colocou-se as placas preparadas na posição correta, quando o equipamento assim o solicitou;
3. Depois de concluída a execução (aproximadamente 22 minutos), retirou-se imediatamente a placa de eluição do instrumento e cobriu-se a mesma com a Película Adesiva Limpa MicroAmp™.

De modo a evitar possíveis evaporações, teve de se selar imediatamente a placa que continha o eluído e armazenou-se no gelo para utilização imediata em RT-PCR. As amostras foram eluídas em 50 µL de Solução de Eluição.

Anexo 10- Procedimento de rRT-PCR com o kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

Após a contabilização do número de reações que se ia fazer e da extração do seu material genético, a preparação da mastermix foi a primeira etapa, baseando-se na seguinte tabela:

Tabela 10.3- Preparação da mastermix. (adaptado da 43)

Reagente	Quantidade por poço
SC2FabR MOM	5 µL
EM8	5 µL

Esta por sua vez teve de ser homogeneizada e centrifugada.

Para preparar as nossas **tiras de rRT-PCR**, tendo cada tira a capacidade de 8 amostras, colocou-se 10µL da nossa mastermix em cada poço onde iria ocorrer uma reação e ainda 10 µL do material genético que se encontrava na nossa placa de eluição, obtida no final do processo de extração. Estas foram homogeneizadas e centrifugadas antes de colocadas no aparelho de rRT-PCR.

De modo a garantir a qualidade das nossas reações, a cada corrida de PCR foram adicionados controlos internos (para além do que já foi colocado no processo de extração).

Para o **Controlo Negativo (NC)**, utilizou-se 10 µL de “RNase-free Water”, substituindo o nosso ácido nucleico da amostra. Já para o **Controlo Positivo (PC)**, utilizou-se 10 µL de “SC2FabR PC”, no lugar do ácido nucleico da amostra.

Desta forma tínhamos 3 controlos de qualidade, o NC, o PC e o RP-V IC 2.

O equipamento teve de ser configurado de modo a ter as características que pretendia-mos para a nossa reação de rRT-PCR.

A configuração do CFX96™- Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) pode ser dividida em três etapas:

- Protocol Setup (configuração do protocolo);
- Plate Setup (configuração da placa);
- Start run (iniciar execução).

Para a **configuração do protocolo** seguiu-se as seguintes etapas:

1. No menu principal, selecionou-se “File”→ “New”→ “Protocol” para abriú-se o “Protocol Editor”;

2. No “Protocol Editor”, definiu-se o perfil térmico, de acordo com a tabela 7:

Tabela 3.1- Perfil térmico da reação. (adaptado de 43)

Etapa	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min.
2		95°C	15 min.
3	3	95°C	10 s
4		60°C	40 s
5		72°C	20 s
6	Repetir etapa 3-5 mais 2x		
7	42	95°C	10 s
8*		60°C	15 s
9*		72°C	10 s
10	Repetir etapa 7-9 mais 41x		

*Etapa de leitura da placa.

3. Clicou-se na caixa próxima à “Sample Volume” para a entrada direta de 20 µl;
4. Clicou-se em “OK” e gravou-se o protocolo para abrir a janela “Experiment Setup”.

Seguidamente fez-se a **configuração da placa**:

1. Clicou-se em “Plate” na janela “Experiment Setup”, selecionou-se “Create New” para abrir a janela “Plate Editor”;
2. Clicou-se em “Select Fluorophores” (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670) que eram usados e clicou-se em “OK”;
3. Selecionou-se os poços onde o tubo PCR foi posicionado e selecionou-se os tipos de amostras no menu suspenso “Sample Type”:
 - Unknown (desconhecido): Clinical samples (amostras clínicas);
 - Negative Control (controlo negativo);
 - Positive Control (controlo positivo);
4. Clicou-se nas caixas de seleção apropriadas (FAM, HEX, Cal Red 610 e Quasar 670) para especificar os fluoróforos a serem detetados nos poços selecionados;
5. Escreveu-se “Sample Name” e pressionou-se a tecla enter;

6. Em “Settings” no menu principal “Plate Editor”, escolheu-se o “Plate Size” (96 wells) e “Plate Type” (BR White);
7. Clicou-se em “OK” para guardar a nova placa;
8. Voltou-se para a janela “Run Setup” e clicou-se em “Next” para Iniciar Execução.

Por último, teve de se iniciar a execução do que se configurou. Posto isto, seguiu-se as seguintes etapas:

1. No separador “Start Run” em “Experiment Setup”, clicou-se em “Close Lid” para fechar a tampa do instrumento;
2. Clicou-se em “Start Run”;
3. Armazenou-se o ficheiro de execução nos “Meus Documentos” ou numa pasta designada. Escreveu-se o nome do ficheiro, clicou-se em “SAVE” e a execução foi iniciada.

Após o término de todo o processo exportou-se os resultados e procedeu-se a sua interpretação.

Anexo 11- Figuras complementares à discussão dos resultados

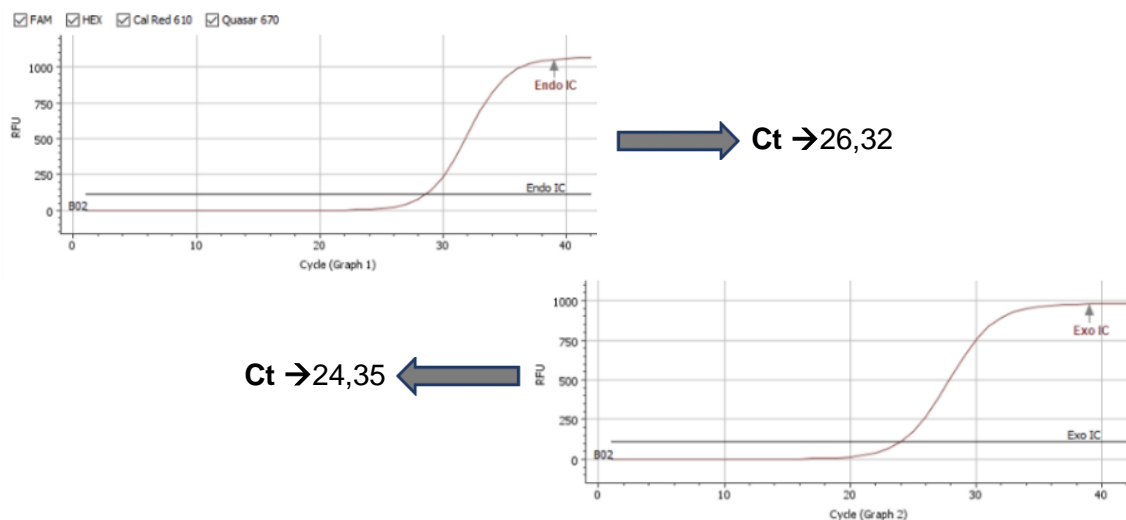


Figura 5.1- Resultado negativo na reação de rRT-PCR, com os controlos de qualidade validados

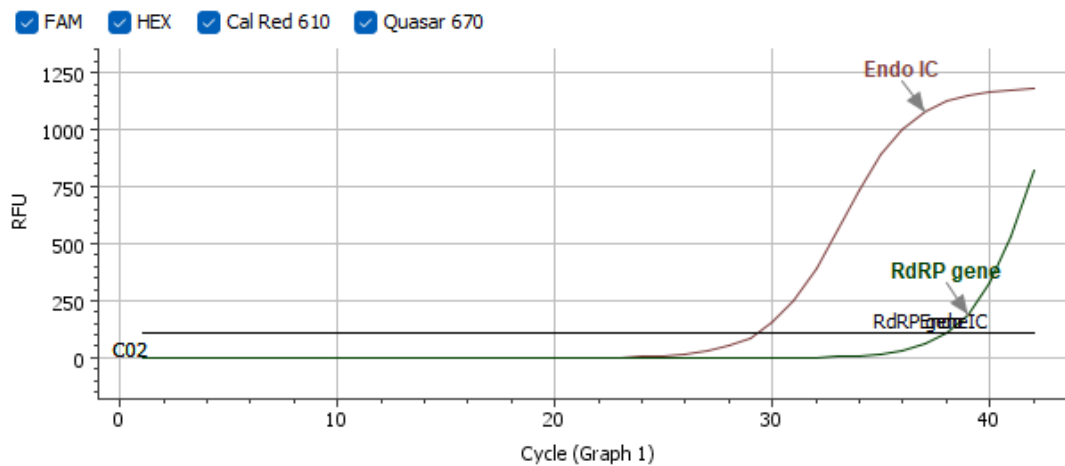


Figura 5.2- Resultado da reação de rRT-PCR com uma má curva de amplificação. Existe uma amplificação tardia ($Ct \rightarrow 38,5$) e de apenas um dos genes alvo. Devido aos valores de Ct apresentados devemos de ver a informação clínica do utente e de preferência repetir a análise da amostra, mesmo que neste caso os controlos de qualidade se encontravam validados.

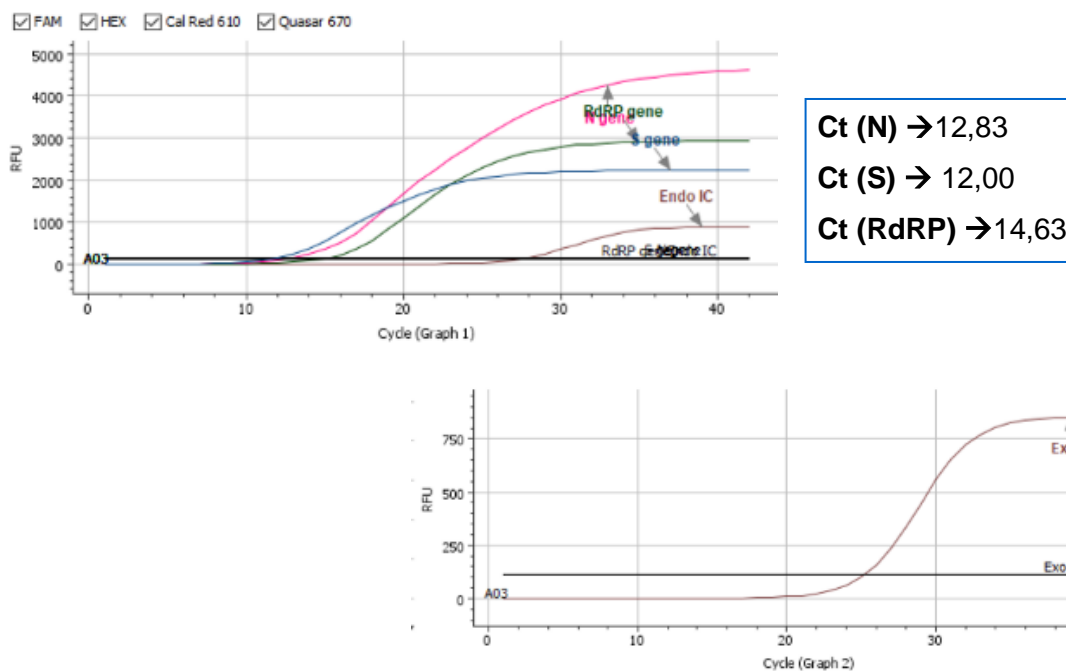


Figura 5.3- Resultado positivo com valores de Ct baixos e controlos de qualidade validados. Os valores de Ct apresentados estão associados a uma elevada carga viral.

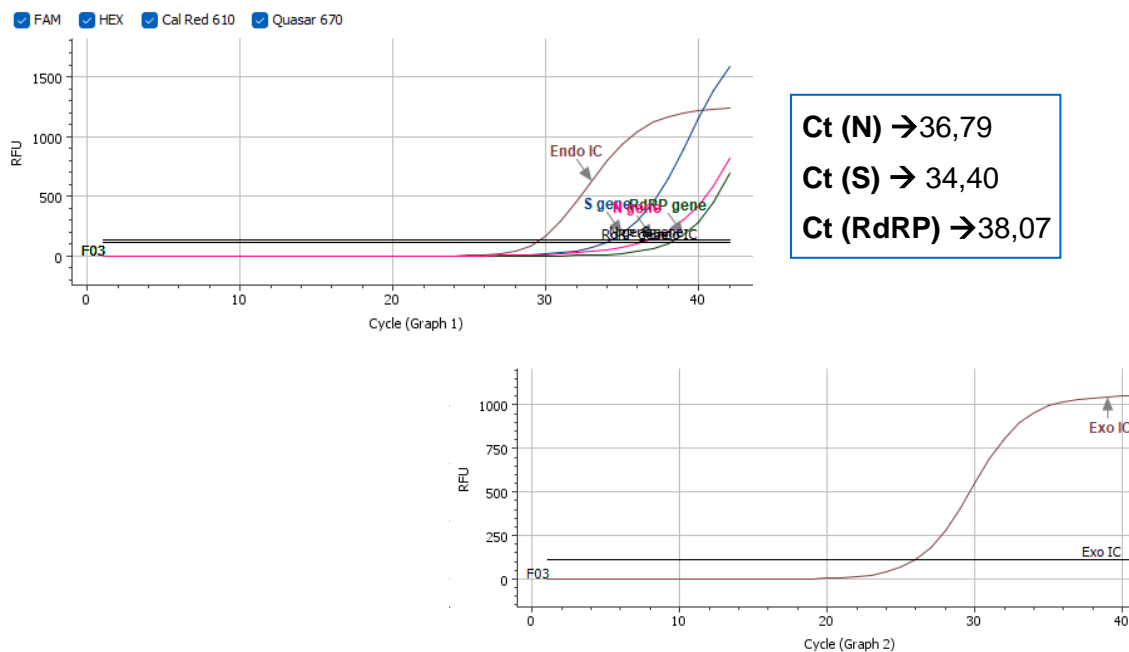


Figura 5.4- Resultado Inconclusivo. Apesar de ter havido amplificação dos três genes detetáveis, os valores de Ct não são coerentes e estão muito próximos da borderline (Ct≤35).

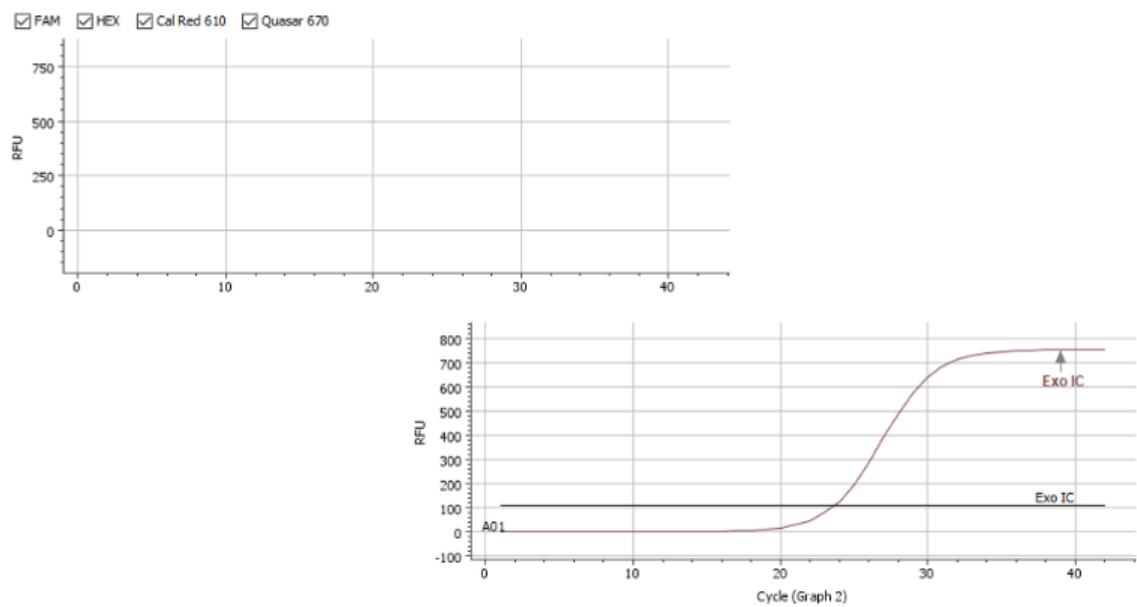


Figura 5.5- Resultado Inválido. Não houve qualquer ipo de amplificação dos genes alvo nem do controlo endógeno. Isto significa, uma vez que temos um valor de controlo exógeno aceitável (Ct→ 23,71), que apesar da reação de RT-PCR ter sido bem executada, não havia amostra pois não houve amplificação do controlo endógeno.