

**IVD**
**Instruções de uso (português)**
**1 Finalidade**

O ampliCube Coronavirus Panel é um teste qualitativo in vitro para a detecção específica do RNA do Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (MERS-CoV), do RNA do recém-surgido SARS-CoV-2, do SARS-CoV, assim como do Bat SARS-like CoV (CoV do tipo SARS de morcego) e do RNA do coronavírus humano (HCoV) (NL63, OC43, 229E, HKU1) a partir de esputo, esfregaço, LBA (lavado broncoalveolar), secreção traqueal ou fezes de origem humana.

**2 Área de utilização**

A Síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (MERS-CoV) e os coronavírus humanos (HCoV) das espécies NL63, OC43, 229E e HKU1 fazem parte da família *Coronaviridae* e são importantes patógenos causadores de infecções respiratórias leves até síndrome respiratória aguda grave. Cerca de um terço de todos os resfriados é causado pelo HCoV, sendo a diarreia um sintoma comum. O MERS-CoV é responsável pela síndrome respiratória do Oriente Médio, uma doença que se manifesta como doença respiratória aguda, geralmente grave, semelhante à gripe, com pneumonia e falta de ar. O diagnóstico diferencial de MERS-CoV deve ser considerado, especialmente caso tenha ocorrido contato com pessoas infectadas por MERS-CoV nas últimas 2 semanas antes do início da doença em um país da Península Arábica.

Os SARS-coronavírus, como o SARS-CoV-2 (agente etiológico da pandemia COVID-19), propagam-se principalmente por meio de gotículas respiratórias, transmitindo-se de pessoa para pessoa. Os sintomas variam desde febre, tosse e dificuldades respiratórias até pneumonia e síndrome respiratória aguda, podendo acabar levando à morte de pessoas com comorbidades.

O ampliCube Coronavirus Panel é utilizado para a detecção e a diferenciação entre MERS-CoV, SARS-CoV (especialmente SARS-CoV-2) e HCoV.

**3 Princípio de teste**

O teste consiste em um sistema PCR de RT (transcriptase reversa) de tempo real (real time). Ele utiliza primers específicos e sondas marcadas para a transcrição de RNA em cDNA, amplificação e detecção do RNA de MERS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV e HCoV (NL63, OC43, 229E, HKU1).

Para assegurar que os ácidos nucleicos extraídos da amostra do paciente não contenham substâncias inibidoras de PCR RT, um controle interno (IC) é adicionado à amostra durante a extração dos ácidos nucleicos. Esse IC é transcrito em cDNA, amplificado e detectado na mesma preparação de PCR. Desse modo, é possível excluir resultados de teste falsos negativos devidos a uma inibição da reação de PCR RT. Ao mesmo tempo, o IC serve como comprovação da extração de ácidos nucleicos da amostra do paciente.

As sondas para a detecção específica dos ácidos nucleicos do agente patogênico estão marcadas com os corantes repórter FAM (MERS-CoV), HEX (SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV) e ATTO Rho 12 (HCoV), as sondas para a detecção do controle interno, com ATTO 647N. Assim, é possível detectar simultaneamente todas as sequências-alvo numa única preparação de reação.

O valor Ct (*cycle threshold*) descreve a parte da curva em que a fluorescência apresenta, pela primeira vez, um aumento exponencial acima do nível de fundo.

**4 Reagentes**
**4.1 Conteúdo da embalagem**

Os reagentes contidos em um pacote são suficientes para 50 determinações.

Cada conjunto de reagentes contém:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl de mistura Primer & Probe para MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV e controle interno ( <b>tampa verde</b> )
<b>ENZYME</b>	600 µl de mistura de enzimas ( <b>tampa branca</b> ) Contém transcriptase reversa e polimerase de DNA. (O componente apresenta uma coloração azul.)
<b>CONTROL INT</b>	250 µl de controle interno ( <b>tampa incolor</b> )
<b>CONTROL +</b>	170 µl de controle positivo ( <b>tampa vermelha</b> )
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl de controle negativo ( <b>tampa azul</b> )
<b>INSTRU</b>	1 Instruções de uso

**4.2 Reagentes, materiais e aparelhos adicionalmente necessários**

- A MIKROGEN oferece reagentes para a calibração de corante dependendo do termociclador de PCR em tempo real usado: MIKROGEN ampliCube Color Compensation (LightCycler® 480 II (Roche) N° artigo 50502), MIKROGEN ampliCube Color Compensation (cobas z 480 Analyzer (Roche) N° artigo 50503), ou o kit de calibração de corante para o CFX96 (Bio-Rad, N° artigo 50505). A MIKROGEN oferece modelos de ensaio Mic para o processamento no termociclador de PCR Mic (bms).
- Extração de ácidos nucleicos: são recomendados os seguintes sistemas de extração de ácidos nucleicos: sistema MagNA Pure®, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) ou kit alphaClean Mag RNA/DNA (MIKROGEN) com processamento em sistema de extração M32, M48 ou M96 (Biocomma)
- Termocicladores em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche), cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms), Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Placas de PCR de 96 poços e películas: observar as recomendações do fabricante do termociclador de PCR em tempo real
- Micropipetas com pontas descartáveis com filtro de 10 µl, 20 µl, 100 µl e 1000 µl
- Agitadores tipo vórtex com rotação elevada (3200 rpm recomendado)
- Minicentrífugadora
- Se necessário, centrifugador de placas
- PBS ou H<sub>2</sub>O (*grau de PCR*) em caso de utilização de swabs de fibra de nylon flocado sem meio de transporte
- Luvas protetoras descartáveis sem pó
- Bloco de refrigeração

**5 Validade e manuseio**

- Antes e após o uso, armazenar os reagentes entre -25 °C e -18 °C.
- O descongelamento e congelamento repetidos dos componentes (mais que dez vezes) deve ser evitado. Recomenda-se fazer a ali-quotação dos componentes de teste após o primeiro descongelamento.
- Durante as etapas de trabalho, refrigerar os reagentes sempre de forma adequada (+2 °C a +8 °C).
- Proteger os componentes do kit contra incidência direta de luz do sol durante toda a execução do teste.
- Antes de iniciar o teste, todos os reagentes devem ser descongelados por completo, misturados (brevemente em vórtex) e centrifugados.
- Após o vencimento da data de validade contida nas embalagens, não há garantia de qualidade.
- O teste só deve ser realizado por profissionais treinados e autorizados.
- Alterações substanciais no produto ou nas prescrições de uso por parte do usuário podem fazer com que a utilização passe a ser considerada inadequada pela MIKROGEN.
- Uma contaminação cruzada pode levar a resultados de teste incorretos. Adicione as amostras de paciente e os controles cuidadosamente. Esteja atento(a) para que as misturas de reação não sejam arrastadas para outras cavidades.

**6 Advertências e medidas de segurança**

- Utilizar somente para diagnóstico in vitro.
- Todas as amostras de paciente devem ser tratadas como potencialmente infecciosas.
- Utilizar luvas descartáveis adequadas durante todo o procedimento de teste.
- Todos os reagentes e materiais que venham a ter contato com amostras potencialmente infecciosas devem ser tratados com desinfetantes adequados ou descartados conforme as normas de higiene. As especificações de concentração e os tempos de incubação dos fabricantes devem ser observados.
- Não substitua nem misture os reagentes com reagentes de outros lotes do kit, outros kits de PCR da MIKROGEN ou com reagentes de outros fabricantes.
- Antes de realizar o teste, leia cuidadosamente as instruções de uso por completo e siga as mesmas com atenção. Desvios do pro-

toloco de teste indicado nas instruções de uso podem levar a resultados incorretos.

## 7 Coleta de amostras e preparação dos reagentes

### 7.1 Material de amostra

O material de base para o ampliCube Coronavirus Panel é o RNA extraído de esputo, esfregaço, LBA, secreção traqueal ou fezes de origem humana. A qualidade da preparação do ácido nucleico tem influência no resultado do teste. É preciso assegurar que o método de extração escolhido seja compatível com a tecnologia PCR em tempo real.

#### 7.1.1 Preparação da amostra

Em caso de utilização de swab de fibra de nylon flocado sem meio de transporte:

1. Incube o swab em 0,5 ml de PBS (em caso de extração usando o sistema MagNA Pure<sup>®</sup>) ou em 0,5 ml de H<sub>2</sub>O (em caso de extração usando o alphaClean Mag RNA/DNA) por 5 min. em temperatura ambiente.
2. Descarte o swab e utilize a suspensão de PBS ou H<sub>2</sub>O para a extração dos ácidos nucleicos.

### 7.2 Extração dos ácidos nucleicos

Extraia os ácidos nucleicos da amostra do paciente e do controle negativo (NC). Recomendamos um volume inicial para a extração de 200 µl e um volume de eluição de 50 µl ou 100 µl, dependendo do sistema de extração usado. Extrações (sistema MagNA Pure<sup>®</sup> (Roche) de 400 µl de material inicial eluídas em 100 µl apresentaram resultados comparáveis. Siga as instruções do fabricante do kit de extração.

1. Descongele o controle interno (IC) (tampa incolor) e o controle negativo (NC) (tampa azul).  
**Verifique se o IC e o NC estão totalmente descongelados. Antes da utilização misture o IC e o NC brevemente em vórtex e centrifugue-os rapidamente!**
2. Na extração, junte 5 µl de IC a cada amostra de paciente e ao NC. O IC deve ser adicionado à mistura de tampão de lise da amostra e não diretamente ao material da amostra.
3. Extraia as amostras de paciente e o NC. (Nota: o NC não pode ser introduzido na PCR sem extração!)
4. O controle positivo não é extraído.

Recomenda-se o seguinte sistema de extração do ácido nucleico que foi utilizado para a avaliação do desempenho:

Sistema de extração	Volume de amostras	Volume de eluição
MagNA Pure <sup>®</sup> 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction System (biocomma) Kit alphaClean Mag RNA/DNA (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Caso queira usar outros métodos de extração, contate o fabricante para esclarecer a compatibilidade.

### 7.3 Preparação da mistura master

1. Descongele a mistura Primer & Probe (tampa verde) e a mistura de enzimas (tampa branca). Proteja os reagentes da luz.  
**Certifique-se de que os reagentes estão totalmente descongelados. Misture os reagentes antes do uso através da agitação em vórtex e centrifugue-os brevemente!**
2. Prepare a mistura master segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Componente	Mistura master para 1 reação
Mistura Primer & Probe	3 µl
Mistura de enzimas	12 µl
Volume total	15 µl

3. Misture a mistura master completa através da agitação em vórtex e centrifugue-a brevemente.
4. Prepare 15 µl da mistura master para cada reação de PCR.

### 7.4 Preparação da reação de PCR RT

1. Descongele o controle positivo (PC) (tampa vermelha).  
**Certifique-se de que os reagentes estão totalmente descongelados. Misture os reagentes antes do uso através da agitação em vórtex e centrifugue-os brevemente!**

Componente	1 reação
Mistura master de 7.3	15 µl
Eluato da amostra ou eluato do NC ou o PC	10 µl

2. Adicione sempre 10 µl do eluato da amostra para 15 µl da mistura master.
3. Adicione 10 µl do controle positivo (não preparado) para 15 µl da mistura master.
4. Adicione 10 µl do eluato do controle negativo para 15 µl da mistura master.

Cada ciclo deve incluir um controle positivo e um controle negativo! Feche a placa de PCR com uma película ótica adesiva ou os recipientes de reação com as tampas previstas.



**As placas de PCR ou os recipientes de reação devem ser agitados em vórtex com rotação máxima durante, no mínimo, 5 s e, a seguir, brevemente centrifugados.**



**Os recipientes de reação de PCR devem ser agitados em vórtex com rotação máxima durante, no mínimo, 10 s para o termociclador de PCR Mic.**

## 8 Programação do termociclador em tempo real

O ampliCube Coronavirus Panel foi avaliado através do LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche) e validado no cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms) e Rotor-Gene Q (Qiagen).

### 8.1 Ajuste dos canais de detecção

#### LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Excitação	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emissão	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm

No LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche) é necessário utilizar previamente uma Color Compensation (Nº artigo 50502) disponibilizada pela MIKROGEN.

#### cobas z 480 Analyzer (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Excitação	465 nm	540 nm	540 nm	610 nm
Emissão	510 nm	580 nm	610 nm	670 nm

No cobas z 480 Analyzer (Roche) é necessário utilizar previamente uma Color Compensation (Nº artigo 50503) disponibilizada pela MIKROGEN.

#### CFX96 (Bio-Rad)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Modo	Todos os canais			

O registro e a avaliação dos dados no CFX96 são realizados através do método *calc / data acquisition mode: all channels*. Uma calibração do CFX96 (Bio-Rad) deve ser realizada previamente para ATTO Rho12 e ATTO 647N. O kit de calibração de corante necessário pode ser obtido da MIKROGEN (CFX96 (Bio-Rad), Nº artigo 50505).

### QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Excitação	X1 / 470 nm	X2 / 520 nm	X4 / 580 nm	X5 / 640 nm
Emissão	M1 / 520 nm	M2 / 558 nm	M4 / 623 nm	M5 / 682 nm
Quencher	[nenhum]	[nenhum]	[nenhum]	[nenhum]

Selecione em Settings 1. Run mode "standard", 2. Reference dye "none", 3. Experiment type "custom".

### Mic (bms)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho

Para o processamento, a MIKROGEN oferece modelos de ensaio Mic validados. Utilize exclusivamente os modelos de ensaio Mic da MIKROGEN. Os modelos de ensaio Mic atuais da MIKROGEN estão disponíveis para download gratuito no site da MIKROGEN ([www.mikrogen.de](http://www.mikrogen.de)).

### Rotor-Gene Q (Qiagen)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Excitação	470 nm	530 nm	585 nm	625 nm
Emissão	510 nm	555 nm	610 nm	660 nm
Ganho	5	5	5	5

### 8.2 Programa PCR

Transcrição reversa	50 °C	8 min.
Desnaturação	95 °C	3 min.
<b>Amplificação</b>	<b>45 ciclos</b>	
• Desnaturação	95 °C	10 s
• Recozimento/Elongação	60 °C	45 s

Informações básicas sobre a programação dos diversos termocicladores em tempo real constam nas instruções do termociclador utilizado. Consulte o fabricante para obter informações especiais sobre a programação do termociclador de PCR em tempo real para a utilização do ampliCube Coronavirus Panel.

## 9 Resultados

A avaliação dos dados no LightCycler® 480 II realizou-se com a ajuda do método *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

### 9.1 Validação

- O controle negativo deve situar-se abaixo do *Threshold*. O controle interno (IC) no controle negativo deve apresentar uma curva positiva. Se o controle negativo apresentar uma curva positiva (contaminação) ou se o IC não for válido no controle negativo, não é possível avaliar o decurso do teste.
- O controle positivo deve mostrar uma curva positiva. O valor Ct do controle positivo deve ser <33. Um controle positivo fora desta área é indicio de um problema na amplificação.
- O controle interno (IC) em amostras negativas deve apresentar uma curva positiva. O sinal do IC de uma amostra de paciente deve ser comparado com o sinal do IC no controle negativo extraído. Uma diferença de > +3 para o valor Ct do IC de uma amostra em comparação com o IC do controle negativo ou a ausência de um sinal de IC na amostra podem indicar uma inibição significativa da reação de PCR RT. Nesses casos, um resultado de teste negativo não é válido.

### 9.2 Avaliação

A avaliação dos dados pode ser realizada com o respectivo software de termociclador de PCR ou com uma solução de software especial suportada pela MIKROGEN para a avaliação e interpretação automatizadas da PCR. Ao utilizar um LightCycler® 480 II, a avaliação pode ser realizada através dos métodos *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recomendado) ou *Abs Quant/Fit Points*. Mais informações e instruções respectivas podem ser obtidas sob demanda junto à MIKROGEN.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)	
Cor	verde	amarelo	laranja	vermelho	
Corante repórter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N	
Avaliação com	LightCycler 480 II	465-510	533-580	533-610	618-660
	cobas z 480	465-510	540-580	540-610	610-670
	CFX96	FAM	HEX	ROX	Cy5
	QuantStudio 5	FAM	VIC	ROX	ATTO 647N
Mic	FAM	HEX	ROX	Cy5	
Rotor-Gene Q	verde	amarelo	laranja	vermelho	

Os sinais maiores que o *threshold* são considerados como resultados positivos. Os campos vazios na tabela são considerados como resultado negativo.

Cor	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controle interno (IC)
verde	positivo	---	---	---
amarelo	---	positivo	---	---
laranja	---	---	positivo	---
vermelho	---	---	---	positivo*

\* Em caso de sinais positivos nos canais de detecção do patógeno, o sinal do controle interno não é necessário para a interpretação do teste. Uma elevada carga do patógeno na amostra do paciente pode levar à redução ou à ausência do sinal para o controle interno.

## 10 Limitações do método, restrições

- Os resultados dos testes devem ser observados sempre em relação ao quadro clínico. As consequências terapêuticas da avaliação devem ser consideradas conjuntamente com os dados clínicos.
- Um resultado de teste negativo para MERS-CoV, SARS-CoV-2 / SARS-CoV / Bat SARS-like CoV ou HCoV não exclui a hipótese de uma infecção pelo respectivo agente patogênico.

## 11 Características de desempenho

### 11.1 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

A sensibilidade e a especificidade foram determinadas com base em amostras definidas como positivas e definidas como negativas.

Tabela 1: amostras definidas como positivas

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=4)	SARS-CoV-2 (n=126)	HCoV (n=17)
Negativo	0	3	0
Positivo	4	123	17
<b>Sensibilidade [%]</b>	<b>100</b>	<b>97,62</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b>			
Intervalo de confiança (ing. confidence interval)	<b>51,01 – 100</b>	<b>93,23 – 99,19</b>	<b>81,57 – 100</b>

Tabela 2: amostras definidas como negativas

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=24)	SARS-CoV-2 (n=490)	HCoV (n=24)
Negativo	24	486	24
Positivo	0	4	0
<b>Especificidade [%]</b>	<b>100</b>	<b>99,18</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b>			
Intervalo de confiança (ing. confidence interval)	<b>86,20 – 100</b>	<b>97,92 – 99,68</b>	<b>86,20 – 100</b>

## 11.2 Sensibilidade analítica

### 11.2.1 Limite de detecção (LoD) em cópias/PCR

O limite de detecção (LoD) do ampliCube Coronavirus Panel foi determinado com séries de diluição de DNA gBlock de concentração conhecida em um LightCycler® 480 II System (Roche). O limite de detecção de 95% foi determinado através da análise de regressão proibit com o software CombiStats™ versão 5.0 (Conselho da Europa). Em seguida, o limite de detecção foi confirmado com 20 réplicas cada no LoD.

**Tabela 3a:** limite de detecção (LoD) MERS e HCoV em cópias/PCR

	MERS-CoV	HCoV
<b>LoD</b> [Cópias/PCR] Limite de detecção de 95%	4,14	12,41*
<b>CI de 95%</b> [Cópias/PCR] Intervalo de confiança (ing. confidence interval)	2,75 – 9,43	8,93 – 22,59

\*As indicações se referem ao HCoV OC43; também foram testados HCoV 229E, NL63 e HKU1. Os limites de detecção estavam entre 20,54 e 89,48.

**Tabela 3b:** limite de detecção (LoD) SARS-CoV-2/SARS-CoV/Bat SARS-like CoV em cópias/PCR

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV
<b>LoD</b> [Cópias/PCR] Limite de detecção de 95%	2,9	6,74	6,35
<b>CI de 95%</b> [Cópias/PCR] Intervalo de confiança (ing. confidence interval)	1,9 – 6,4	4,12 – 14,68	4,14 – 14,43

### 11.2.2 Limite de detecção (LoD) SARS-CoV-2 em unidades internacionais

Além disso, o LoD foi definido para as regiões-alvo de SARS-CoV-2 com três séries de diluição independentes (cada uma com 7 níveis de diluição) de acordo com o padrão da OMS (Primeiro Padrão Internacional da OMS para RNA do SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/146)) incl. extração de ácidos nucleicos (kit *alpha*Clean Mag RNA/DNA no M96 Biocomma) em um LightCycler® 480 II System (Roche) e análise de regressão proibit subsequente (software CombiStats™ versão 6.0 (Conselho da Europa)). O limite de detecção do ampliCube Coronavirus Panel é indicado em Unidades Internacionais (IU) por µl padrão da OMS usado.

**Tabela 3c:** limite de detecção (LoD) SARS-CoV-2 em IU/µl padrão OMS

	SARS-CoV-2
<b>LoD</b> [IU/µl] Limite de detecção de 95%	2,72
<b>CI de 95%</b> [IU/µl] Intervalo de confiança (ing. confidence interval)	1,53 – 6,55

## 11.3 Especificidade analítica

A pesquisa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) mostra que os primers e sondas selecionados do ampliCube Coronavirus Panel detectam especificamente os patógenos selecionados.

Além disso, a especificidade foi determinada através da análise do DNA/RNA genômico de outros vírus e bactérias patogênicos humanos.

**Tabela 4:** bactérias e vírus que foram testados para mostrar a especificidade analítica do ampliCube Coronavirus Panel.

Bactérias	Vírus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovírus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Citomegalovírus
<i>Bordetella pertussis</i>	Enterovírus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Vírus Epstein-Barr
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A
	Influenza B
	Vírus do sarampo
	Vírus da caxumba
	Vírus parainfluenza
	Vírus sincicial respiratório (VSR) A
	Rinovírus 58 (A)

Nenhuma dessas amostras apresentou um sinal positivo. Os primers e sondas utilizados no ampliCube Coronavirus Panel não apresentaram nenhuma reação cruzada com os agentes patogênicos listados na tabela 4. O controle interno (IC) foi válido em todos os testes.

## 11.4 Equivalência de diferentes materiais de amostra

Foi determinado o coeficiente de variação (CV) do valor Ct entre água e o extrato do respectivo material de amostra após o acréscimo de DNA plasmídico de concentração conhecida.

**Tabela 5:** Equivalência de diferentes materiais de amostra

	MERS-CoV	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV	HCoV
CV [%] (LBA, H <sub>2</sub> O)	1,37	2,11	1,62	2,21	0,58
CV [%] (esputo, H <sub>2</sub> O)	2,42	2,32	1,54	3,42	1,91
CV [%] (esfregaço, H <sub>2</sub> O)	1,51	1,28	1,47	1,50	1,08
CV [%] (fezes, H <sub>2</sub> O)	1,94	1,33	1,28	1,98	0,85






O coeficiente de variação (CV), com base no valor Ct (*cycle threshold*) entre água e os extratos de ácido nucleico (obtidos a partir dos diversos materiais de amostra) foi, em todos os genes-alvo, ≤3,42%.

## 12 Bibliografia



- L.-Y. Chang et al. (2006): Lack of Association between Infection with a Novel Human Coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki Disease in Taiwan. *The Journal of Infectious Diseases*, Jan. 2006, 193:283-6, 0022-1899/2006/19302-0015\$15.00
- L. Louie et al. (2006): Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Stool Specimens by Commercially Available Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2006, Vol. 44, No. 11, p. 4193-4193, doi:10.1128/JCM.01202-06
- F. Esper et al. (2005): Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, Feb. 2005, 191:492-8, 0022-1899/2005/19104-0002\$15.00
- F. Esper et al. (2010): Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Virology*, March 2010, Vol. 48, p. 131-133, doi:10.1016/j.jcv.2010.03.007
- M. Jevšnik et al. (2013): Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology Journal*, 2013, 10:46, doi:10.1186/1743-422X-10-46
- I. M. Mackay et al. (2015): MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, Dec. 2015, 12:222, DOI 10.1186/s12985-015-0439-5
- M. C. Nunes et al. (2014): Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, Feb. 2014, Vol. 9, Issue 2, e86448
- L. A. Sipulwa (2016): Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009–2012. *Virology Journal*, 13:18, DOI 10.1186/s12985-016-0474-x
- I. Wilhelmi (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, April 2003, Vol. 9, No. 4, p. 247-262
- F. Wu et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3
- R. Ralph et al. (2020): 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14(1):3-17
- W. G. Carlos et al. (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 2020 Vol. 201, P7-P8
- S.-Q. Deng et al. (2020): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 575-584
- Muenchhoff Maximilian, Mairhofer Helga, Nitschko Hans, Grzimek-Koschewa Natascha, Hoffmann Dieter, Berger Annemarie, Rabenau Holger, Wiedera Marek, Ackermann Nikolaus, Konrad Regina, Zange Sabine, Graf Alexander, Krebs Stefan, Blum Helmut, Sing Andreas, Liebl Bernhard, Wölfel Roman, Ciesek Sandra, Drosten Christian, Protzer Ulrike, Boehm Stephan, Kepler Oliver T. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(24):pii=2001057. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.24.001057>
- Ute Eberle, Clara Wimmer, Ingrid Huber, Antonie Neubauer-Juric, Giuseppe Valenza, Nikolaus Ackermann, Andreas Sing (for the Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team). Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Springer, published online: 29 January 2021, <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9>

Caso solicitado, teremos todo o prazer em lhe enviar literatura complementar.

### 13 Explicação sobre os símbolos

	O conteúdo é suficiente para <n> preparações Número de preparações
<b>P&amp;P MIX</b>	Mistura Primer & Probe
<b>ENZYME</b>	Mistura de enzimas
<b>CONTROL INT</b>	Controle interno
<b>CONTROL +</b>	Controle positivo
<b>CONTROL -</b>	Controle negativo
<b>INSTRU</b>	Instruções de uso
	Observar as instruções de uso
<b>CONT</b>	Conteúdo, contém
<b>IVD</b>	Diagnóstico in vitro
<b>LOT</b>	Número do lote/versão
<b>REF</b>	Número de pedido
	Válido até Data de validade
	Armazenamento de x°C a y°C
	Fabricante

### 14 Dados de versão e fabricante

<b>ampliCube Coronavirus Panel</b>	Nº artigo: <b>50142</b>
<b>Instruções de uso</b> Válido a partir de	GAACCV004PT 2023-04
 <b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Alemanha Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	



GAACCV004