SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Kit de detección por RT-PCR en un solo paso para el SARS-CoV-2, IVD

Gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp)

REF MD03201, 96 determinaciones

Solo para el uso diagnóstico* in vitro *profesional

CE IVD

ES

Instrucciones de uso

MD0320_IM_es

VERSIÓN 2401, enero de 2024

NZYtech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Índice

1. Introducción ... 3
2. Uso ... 3
3. Principios del ensayo ... 3
4. Composición del kit ... 3
5. Condiciones para el almacenamiento, estabilidad y manipulación ... 4
6. Materiales e instrumentos necesarios pero no suministrados ... 4
7. Recogida y preparación y de las muestras ... 4
8. Precauciones y advertencias ... 4
8.1 Información de seguridad ... 4
8.2 Requisitos para la manipulación y el procedimiento ... 4
9. Procedimiento de la prueba ... 5
9.1 Configuración de la reacción ... 5
9.2 Programación del aparato de PCR en tiempo real ... 5
10. Análisis de datos ... 6
10.1 Criterios de validación de la prueba ... 6
10.2 Interpretación de los resultados de la prueba ... 6
11. Evaluación del rendimiento ... 7
11.1 Resultados previstos ... 7
11.2 Sensibilidad analítica ... 7
11.3 Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica ... 7
11.4 Precisión ... 8
11.4.1 Reproducibilidad ... 8
11.4.2 Reproducibilidad diaria ... 8
11.4.3 Reproducibilidad entre lotes ... 8
11.4.4 Reproducibilidad del analista ... 8
11.4.5 Reproducibilidad entre instrumentos y del laboratorio ... 8
11.5 Evaluación clínica ... 8
12. Control de calidad ... 8
13. Asistencia técnica ... 9
14. Marcas y descargos de responsabilidad ... 9
15. Explicación de los símbolos ... 9
16. Declaración de conformidad ... 10
17. Bibliografía ... 11

1. Introducción

A finales de 2019 se notificó en China una nueva enfermedad respiratoria aguda, denominada enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19, por sus siglas en inglés), que se propagó rápidamente por todo el mundo. Se identificó al agente causante como el Coronavirus Tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés). Este virus (anteriormente denominado 2019-nCoV) pertenece, igual que el coronavirus del SARS (SARS-CoV), con el que está estrechamente relacionado, al género Betacoronavirus de la familia de los coronavirus. Los coronavirus son virus de ARN monocatenario, positivo, encapsulado y de gran tamaño que infectan al ser humano, pero también a una amplia gama de animales. Se cree que el SARS-CoV-2 tiene un origen zoonótico y es probable que se haya propagado desde los grandes mercados de mariscos y animales mediante el contacto entre humanos y animales en la ciudad china de Wuhan. El nuevo coronavirus es muy contagioso y se transmite principalmente por medio de pequeñas gotas respiratorias (tos y estornudos). La detección temprana del SARS-CoV-2 es esencial con el fin de poder proporcionar un tratamiento rápido a los pacientes infectados y reducir así la propagación de las infecciones. Las manifestaciones clínicas más comunes del COVID-19 son la fatiga, la fiebre y los síntomas del tracto respiratorio inferior, como por ejemplo tos seca y disnea. También se puede producir pérdida del olfato y del gusto. En los casos más críticos, la infección evoluciona a cuadros de neumonía grave con complicaciones que ponen en peligro la vida, como por ejemplo síndrome de enfermedad respiratoria aguda y disfunción de órganos, pudiendo provocar finalmente la muerte. En base a los datos de los que se dispone actualmente, alrededor del 80% de las infecciones son leves o asintomáticas. Un porcentaje de la población es más vulnerable a la forma grave de la enfermedad, incluyendo los adultos de una cierta edad (50 años o más), los fumadores y las personas con enfermedades crónicas, como por ejemplo enfermedades cardíacas o pulmonares, cáncer y diabetes, así como los pacientes con un sistema inmunológico debilitado.

2. Uso

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech es una prueba molecular destinada a la detección cualitativa rápida de los ácidos nucleicos del Coronavirus Tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave en hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos o muestras de esputo recogidas de pacientes. Un resultado positivo indica la presencia de ARN del SARS-CoV-2, resultante de la infección con el nuevo coronavirus humano. Las pruebas solo pueden ser efectuadas por personal de laboratorio debidamente formado y capacitado, con formación específica en técnicas de PCR en tiempo real y diagnóstico *in vitro*.

3. Principios del ensayo

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech proporciona el conjunto completo de reactivos y sondas para detectar cualitativamente el genoma del SARS-CoV-2, mediante el uso de los aparatos de PCR en tiempo real más comunes (véanse las especificaciones de los instrumentos requeridos en la **Sección 6**). Específicamente, el kit detecta la presencia de una secuencia de ARN del gen del SARS-CoV-2 que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). Se incluye un control interno para confirmar la eficiencia de la extracción de ARN de muestras biológicas humanas, así como la ausencia de inhibidores de la PCR, entre otros. Además, la prueba utiliza controles externos (control de títulos bajos positivo suministrado con el kit y control negativo), tal como se describe a continuación. Los cebadores y la sonda del SARS-CoV-2 tienen una homología del 100% con >95% de las >2.500 secuencias del genoma disponibles en la base de datos de GISAID a fecha del 29 de marzo de 2020. Además, los cebadores y la sonda específicos del genoma del SARS-CoV-2 no muestran una homología significativa con genomas no relacionados, lo que hace que esta prueba sea muy específica, ya que no hay reactividad cruzada con ningún otro coronavirus secuenciado hasta la fecha. Como resultado de la evolución natural del SARS-CoV-2, habrá nueva información sobre la secuencia disponible después del diseño inicial de este kit, reflejando las estrategias de adaptación del SARS-CoV-2. Por ello, NZYtech revisará periódicamente las dianas del SARS-CoV-2 y, si fuera necesario, lanzará nuevas versiones de este kit.

La determinación cualitativa del ARN específico se basa en la tecnología de RT-PCR en tiempo real en un solo paso, ya que se trata de un método rápido y fiable para realizar una detección precisa del SARS-CoV-2. Mediante el uso del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech, el ARN aislado y purificado mediante un sistema de extracción CE-IVD se retrotranscribe (RT) a ADNc y se amplifica posteriormente mediante PCR, en una sola reacción, utilizando dos conjuntos de cebadores/sonda altamente específicos que utilizan el denominado principio TaqMan®. Cuando el ARN extraído de las muestras del tracto respiratorio se recoge de un paciente infectado, una sonda TaqMan® se une específicamente a una región conservada del gen RdRp del SARS-CoV-2 circunscrita por un par de cebadores igualmente específicos. Un conjunto de cebadores/sonda adicional actúa como control interno con el fin de detectar ácidos nucleicos de la ribonucleasa P humana [gen de la RNasa P (RP)], lo que permite confirmar la eficacia del proceso de extracción de material biológico de origen humano. Además, este control interno también permite demostrar que no se ha producido ninguna inhibición de la reacción por inhibidores de la PCR potencialmente presentes en las muestras clínicas. Las dos sondas están etiquetadas de forma diferente, con los fluoróforos FAM™ y JOE™, con el fin de permitir la identificación de la amplificación individual de las dianas virales y humanas en una sola reacción, respectivamente. Además, se suministran en concentraciones optimizadas con el fin de asegurar que la amplificación del ARNm humano, incluso cuando está presente en concentraciones muy elevadas, no limite la eficacia del conjunto de cebadores/sonda del SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech incluye un control positivo que permite controlar el rendimiento de las reacciones de RT-PCR. Este control corresponde a una molécula de ácido nucleico sintética que lleva secuencias homólogas a las secuencias diana del SARS-CoV-2 y la RP incluidas en este ensayo de detección. El control positivo del SARS-CoV-2/RP debe utilizarse directamente con la mezcla de cebadores/sonda del SARS-CoV-2/RP cada vez que se analice un conjunto de muestras. Un resultado positivo indica que los conjuntos de cebadores y sonda para detectar los genes del SARS-CoV-2 y la RP diana funcionaron correctamente en la mezcla maestra incluida en ese escenario experimental concreto. Si se obtiene un resultado negativo, los resultados de la prueba no son válidos y deben repetirse.

4. Composición del kit

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech proporciona el conjunto de reactivos suficiente para efectuar 96 reacciones de RT-PCR en un solo paso.

COMPONENTE DEL KIT		NÚMERO DE VIALES	VOLUMEN (POR VIAL)
SARS-CoV-2 MMix	Mezcla maestra para RT-qPCR en un paso NZYSpeedy	1	1050 µL
SARS-CoV-2 PPMix	Mezcla de cebadores/sonda para SARS-CoV-2/RP	1	205 µL
SARS-CoV-2 Pos	Control positivo para SARS-CoV-2/RP (1 x 10^4 copias/µL)	1	105 µL
SARS-CoV-2 Neg	Agua libre de RNasa/DNasa	1	105 µL

5. Condiciones para el almacenamiento, estabilidad y manipulación

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD se envía refrigerado. Todos los componentes se deben almacenar a -85b °C to -15 °C inmediatamente después de su recepción. Cuando se utilicen, los componentes del kit se deben volver a colocar en el congelador inmediatamente después de su uso con el fin de minimizar el tiempo que pasan a temperatura ambiente.

- Reduzca al mínimo el número de ciclos de congelación y descongelación mediante el almacenamiento en alícuotas de trabajo. Si procede, los componentes del kit se pueden alicuotar en volúmenes más pequeños después de la descongelación.
- La mezcla de cebadores/sonda del SARS-CoV-2/RP se debe almacenar protegida de la luz. En particular, no exponga la mezcla maestra para RT-qPCR en un solo paso de NZYSpeedy a la luz solar directa después de combinarla con la mezcla de cebadores/sonda.
- Póngase en contacto inmediatamente con NZYtech si observa que el envase que protege el kit está dañado en el momento de su llegada.
- Respete la fecha de caducidad indicada en el envase. NZYtech recomienda no utilizar el kit después de la fecha de caducidad. Cuando se llegue a esa fecha se debe desechar el kit siguiendo las instrucciones para la eliminación indicadas en la **Sección 8.2**.

6. Materiales e instrumentos necesarios pero no suministrados

- Instrumento de PCR en tiempo real que detecte los colorantes fluorescentes FAM™ y JOE™ (a longitudes de onda de emisión de 520 y 555 nm, respectivamente). Véase en la **Sección 11** los modelos de instrumentos para los que se ha validado el kit.
- Equipo y consumibles para aislar el ARN viral de las muestras del tracto respiratorio.
- Elementos de plástico para qPCR libres de RNasa/DNasa: Tubos, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas para PCR.
- Pipetas y puntas de filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vórtex y centrífuga.

7. Recogida y preparación y de las muestras

Hay una serie de factores, como por ejemplo el protocolo para la toma de muestras del tracto respiratorio humano (hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, o esputo), el transporte de las muestras y el tiempo de almacenamiento y de procesamiento, que son fundamentales para lograr unos resultados óptimos. Las muestras de esputo deben proceder del tracto respiratorio inferior. Las muestras tomadas se deben analizar lo antes posible. Las muestras se deberán transportar y almacenar a bajas temperaturas en conformidad con las normas de bioseguridad. El ARN o los ácidos nucleicos totales extraídos siguiendo un protocolo CE IVD son el material de partida para el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech. Asegúrese de que las muestras de ARN son adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad de los ácidos nucleicos. Generalmente una relación $A_{260/280}$ de ~2 se considera aceptable para el ARN puro. Puesto que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo por completo antes de proceder a la elución del ácido nucleico durante la extracción. El kit de NZYtech incluye una reacción de control interno de la extracción de ARN cuya diana es el ARN humano, que se copurifica con el ARN viral. El ARN humano se amplifica con el conjunto de cebadores/sonda de la RNasa P (RP). Esto es útil para comprobar la eficiencia del aislamiento del ARN y/o la presencia de inhibidores durante el procesamiento de la muestra.

8. Precauciones y advertencias

Igual que en todo procedimiento de pruebas analíticas, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales. Siga cuidadosamente los procedimientos y directrices que se proporcionan en este manual para asegurarse de que la prueba se realice correctamente. Cualquier desviación con respecto a dichos procedimientos y directrices puede provocar el fracaso del ensayo o dar lugar a la obtención de resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado con el fin de mantener los reactivos y las mezclas de amplificación libres de contaminación.

8.1. Información de seguridad

Antes de utilizar este kit, consulte la Ficha de Datos de Seguridad (MSDS por sus siglas en inglés) que podrá encontrar en la página web de NZYtech (www.nzytech.com). La detección del virus SARS-CoV-2 solo debe ser llevada a cabo por personal con formación adecuada en lo relativo a los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes y en laboratorios debidamente equipados. Se deben seguir siempre y en todos los casos las directrices internacionales y nacionales sobre bioseguridad en los laboratorios.

8.2. Requisitos para la manipulación y el procedimiento

- Solo para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.
- No utilice este kit después de la fecha de caducidad.
- No utilice los componentes de la prueba si el precinto del kit está dañado.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit.
- Se deben utilizar utensilios de plástico y pipetas desechables libres de DNasa/RNasa en todos los procedimientos.

- Utilice puntas de filtro libres de DNasa/RNasa durante la totalidad del protocolo con el fin de evitar la contaminación de aerosoles y líquidos.
- La preparación de la muestra, la preparación de la reacción y la amplificación deben realizarse en diferentes áreas de trabajo.
- La plantilla de control positivo contiene un gran número de copias de molde; debe abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y de los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre el agua suministrada en el kit (SARS-CoV-2 Neg - agua libre de RNasa/DNasa).
- Al final de cada prueba, limpie las superficies de trabajo y el equipo con una solución de descontaminación de ADN/ARN.
- Manipule las placas con cuidado y deséchelas inmediatamente después del final de la prueba; las placas siempre deben desecharse en un contenedor adecuado para riesgos biológicos después de su uso.
- Las muestras biológicas deben manipularse como si fueran infecciosas siguiendo las medidas de precaución adecuadas en materia de bioseguridad.
- Los residuos de preparados y productos químicos se consideran normalmente residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos se regula a través de leyes y reglamentaciones nacionales y regionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto del historial médico del paciente y los síntomas clínicos.
- Esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos.
- El resultado negativo de cualquier prueba de PCR no descarta de forma concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, utilice prendas de protección, lleve permanentemente guantes desechables sin polvo y utilice asimismo mascarilla y gafas de protección. Absténgase de comer, beber y fumar en el área de trabajo.

9. Procedimiento de la prueba

Lea cuidadosamente las instrucciones de uso antes de efectuar el ensayo. Tenga en cuenta que las placas y todos los pasos de pipeteado deben realizarse sobre hielo. Una vez efectuado el vertido en la placa, comience inmediatamente con el protocolo de RT-PCR en un solo paso. La incubación prolongada de las mezclas de reacción a temperatura ambiente puede dar lugar a productos de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes del experimento, empiece a mezclar suavemente los tubos de reacción suministrados, centrifugue durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo y coloque los tubos sobre hielo. **Pipetee siempre el control positivo para el SARS-CoV-2/RP en último lugar con el fin de evitar posibles contaminaciones.**

9.1. Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de RT-PCR suficiente para el número de análisis de SARS-CoV-2/RNasa P que se vayan a efectuar, con un 5% de volumen adicional para las pérdidas de pipeteado. Proceda de acuerdo con la tabla siguiente en la que se especifican los volúmenes para 1 y para *n* pruebas (donde *n* corresponde al número total de reacciones):

COMPONENTE	VOLUMEN (µL) PARA 1 PRUEBA	VOLUMEN + 5% (µL) PARA PRUEBAS (*)
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix	2	*n* x 2,1
VOLUMEN FINAL	**12**	***n* x 12,6**

***(*)** Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada ensayo, cuente el número de muestras y añada dos más para los controles Negativo y Positivo, respectivamente.*

2. Pipetee 12 µL de la mezcla de RT-PCR en pocillos individuales de acuerdo con la configuración de la placa del experimento de PCR en tiempo real.
3. Para el control negativo, añada 8 µL de SARS-CoV-2 Neg en lugar del ARN molde en el pocillo del control negativo. El volumen final debe ser de 20 µL.
4. Para las muestras biológicas, añada 8 µL de cada muestra de ARN en los pocillos de SARS-CoV-2/RNasa P, de acuerdo con la configuración de la placa del experimento. El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.
5. Para el control positivo, añada 8 µL de SARS-CoV-2 Pos en lugar del ARN molde en el pocillo del control positivo. El volumen final debe ser de 20 µL.
6. Selle la placa de reacción que contiene todas las reacciones y centrifúguela brevemente antes de proceder a la RT-PCR y a los pasos de detección.
7. Coloque la placa de reacción en el aparato de PCR en tiempo real y efectúe el protocolo de RT-PCR de acuerdo con las indicaciones de la siguiente sección.

9.2. Programación del aparato de PCR en tiempo real

En la tabla siguiente se muestra un protocolo estándar optimizado en varias plataformas. Sin embargo, estas condiciones se pueden adaptar y validar para adaptarse a los diferentes protocolos específicos de cada aparato.

Parámetros recomendados para la realización de la RT-PCR

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PASO
1	50 °C	20 min	Transcripción inversa
1	95 °C	2 min	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	30 s	Hibridación / extensión

Detectores/colorantes fluorescentes

DIANA	COLORANTE FLUORESCENTE	CANAL DE DETECCIÓN
Dianas del SARS-CoV-2 y RNasa P	FAM™ y JOE™	FAM
Controles positivo / negativo	FAM™ y JOE™	JOE, VIC o HEX

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech se ha validado para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el usuario debe validar el kit utilizando muestras caracterizadas previamente (tanto positivas como negativas).

10. Análisis de datos

10.1. Criterios de validación de la prueba

Antes de analizar los resultados de las muestras, recomendamos verificar si la prueba de PCR en tiempo real es válida. Para hacerlo, confirme para cada placa si los resultados de los controles positivo y negativo fueron los previstos, de acuerdo con los siguientes criterios:

Control Positivo: las curvas de amplificación de FAM™ (SARS-CoV-2) y JOE™ (RP) son positivas. Se espera que el control positivo amplifique a un Ct<28, tanto en el canal FAM como en el JOE. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es un fuerte indicio de que el experimento se ha visto comprometido.

Control negativo (reacción sin molde): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene una o dos curvas de amplificación (FAM™ y/o JOE™) de forma sigmoidal, puede haberse producido contaminación de la muestra. Repita la prueba siguiendo las buenas prácticas de RT-PCR.

Si los controles se ajustan a lo previsto, la prueba es **válida**. Proceda a la interpretación de los resultados de las muestras probadas.
Si alguno de los controles no muestra el comportamiento esperado, el ensayo se ha visto comprometido o se ha efectuado de manera incorrecta y se debe considerar **inválido**.
Repita la prueba.
Si el problema *persiste, póngase en contacto con el fabricante.*

10.2. Interpretación de los resultados de la prueba

El SARS-CoV-2 se detecta si la curva de amplificación del FAM™ muestra una forma sigmoidal con un Ct<36, independientemente del resultado obtenido en el ensayo de RP (JOE™).

El SARS-CoV-2 no se detecta si la curva del FAM™ no es positiva (Ct≥36), mientras que RP (JOE™) muestra una curva sigmoidal positiva (Ct<40).

La **prueba no es válida** si los ensayos de SARS-CoV-2 y RP son los dos negativos. La prueba debe repetirse con ácido nucleico re-purificado de la muestra.

En la tabla siguiente se resume la interpretación de los resultados principales (evalúe la forma general de las curvas de amplificación; **solo las curvas de amplificación sigmoidales son indicativas de una verdadera amplificación)**.

RESULTADO DE SARS-CoV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	**RESULTADO DE RP** RP, CT (JOE™)	**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**
+ (Ct<36)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO
+ (Ct<36)	- (Ct>40)	SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO
- (Ct≥36)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 no detectado → NEGATIVO
- (Ct≥36)	- (Ct>40)	La prueba no es válida; repita la extracción y repita la prueba

Nota: *La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.*

- Los resultados falsos negativos pueden estar causados por:
  - La recogida, manipulación y/o almacenamiento inadecuados de las muestras.
  - Muestra fuera de la fase vírica.
  - El hecho de no seguir los procedimientos indicados en este manual.
  - Uso de un kit de extracción o plataforma de PCR en tiempo real no autorizados.

- Los resultados falsos positivos pueden estar causados por:

- Manipulación inadecuada de muestras que contienen una alta concentración de ARN viral del SARS-CoV-2 o plantilla de control positivo.
- Manipulación inadecuada del tubo SARS-CoV-2 Pos.
- Manipulación inadecuada del producto amplificado (placa de post-amplificación).

11. Evaluación del rendimiento

Se evaluó el rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech en los sistemas de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 y Bio-Rad® CFX96™, con pruebas adicionales en el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® StepOnePlus. **Si se utiliza otro equipo, el usuario debe validar el kit utilizando muestras caracterizadas previamente (tanto positivas como negativas).**

11.1. Resultados previstos

A continuación se presenta un gráfico de amplificación típico, observado para una muestra clínica que contenía ácidos nucleicos del SARS-CoV-2.

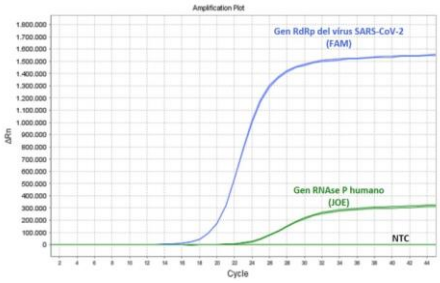

Figura 1. Detección simultánea de dianas de SARS-CoV-2 y RNasa P humana a partir de una muestra clínica positiva (paciente infectado con el SARS-CoV-2). Curva azul: detección de la diana de ARN viral del SARS-CoV-2 (gen RdRp) a través del canal FAM; Curva verde: detección del gen de la RNasa P humana a través del canal JOE. NTC, control sin molde (control negativo).

11.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como la concentración más baja de analito que se podía detectar con fiabilidad con un 95% de confianza. Para ello se analizaron los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en diferentes números de copias (5 x 10^4 a 2,5 copias por reacción; 2,5 x 10^3 a 0,125 copias/µL), individualmente o añadidos a ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. Las pruebas se repitieron dos veces al día durante cinco días, produciendo 60 réplicas por cada concentración de SARS-CoV-2 analizada. En conjunto, los datos revelaron que el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech detecta 0,25 copias/µL del ARN viral del SARS-CoV-2 con una confianza del ≥95%. Así pues, la sensibilidad analítica del kit, expresada como el límite de detección (LoD), es de 0,25 copias/µL o 250 copias/mL. El límite de detección del kit se revalidó utilizando tres lotes de kits, dos máquinas diferentes y dos analistas distintos, en un experimento con un total de 48 pruebas, asegurando que la sensibilidad analítica del kit se mantuviera entre diferentes situaciones de prueba. En la figura siguiente se presenta la capacidad del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech para detectar el virus a diferentes cargas virales (desde 5 x 10^7 hasta 5 copias por reacción).

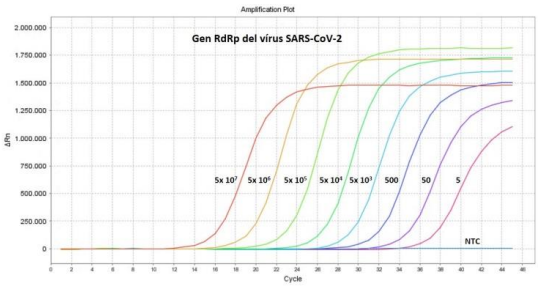

Figura 2. Sensibilidad del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD. Gráfico de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia - ΔRN) de diluciones seriadas 1:10 del ARN viral del SARS-CoV-2, desde 5 x10^7 copias hasta 5 copias por reacción a través del canal FAM. NTC, control sin molde (control negativo).

11.3. Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica

La inclusividad y la reactividad cruzada se evaluaron mediante análisis *in silico* contra los patógenos relacionados con el SARS-CoV-2 y los patógenos normales que causan infección con síntomas similares, respectivamente. El análisis *in silico* reveló que el diseño del ensayo detectaba todas las cepas del virus del SARS-CoV-2 y no mostraba ninguna reactividad con otras especies distintas del SARS-CoV-2. Además del análisis *in silico*, también se efectuó la RT-PCR de SARS-CoV-2 con ácidos nucleicos de microbios comunes del tracto oral y respiratorio, incluyendo *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Ninguno de los otros patógenos analizados mediante el ensayo por RT-PCR de SARS-CoV-2 (COVID-19) generó una señal de amplificación detectable.

11.4. Precisión

La precisión del ensayo para el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech se determinó mediante pruebas repetidas de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 que representaban dos niveles de carga viral, 5 (LoD) y 150 copias por reacción (0,25 y 7,5 copias/µL), individualmente o añadidos a ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes y siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. La precisión se expresó en forma de Cq medio, coeficiente de variación del Cq y porcentaje de detección de réplicas, tal como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en la tabla que se muestra al final de esta sección.

11.4.1. Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó analizando 48 réplicas de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), lo que supone un número final de 96 pruebas realizadas.

11.4.2. Reproducibilidad diaria

La reproducibilidad diaria se evaluó analizando 120 réplicas de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), durante cinco días con 24 réplicas de cada concentración por día (un total de 240 ensayos).

11.4.3. Reproducibilidad entre lotes

La reproducibilidad entre lotes se evaluó analizando 270 réplicas de cada muestra (5 y 150 copias por reacción) utilizando tres lotes de kits diferentes con 90 réplicas por lote.

11.4.4. Reproducibilidad del analista

La reproducibilidad del analista se evaluó analizando 96 réplicas de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), en un total de 48 pruebas, realizadas por cuatro analistas diferentes.

11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos y del laboratorio

La reproducibilidad entre instrumentos se midió analizando 36 réplicas de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), en dos instrumentos de qPCR diferentes (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus), en total 72 pruebas por instrumento.

Precisión del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

VARIABLE ANALIZADA		SARS-CoV-2 (COPIAS / REACCIÓN)	
		5	**150**
REPRODUCIBILIDAD	N	48	48
	Cq medio	34,61	30,82
	Coeficiente de variación (%)	2,99	1,80
	Detección de réplicas (%)	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	120	120
	Cq medio	33,02	30,49
	Coeficiente de variación (%)	4,21	4,95
	Detección de réplicas (%)	100	100
REPRODUCIBILIDAD ENTRE LOTES	n	270	270
	Cq medio	33,41	30,15
	Coeficiente de variación (%)	4,35	4,33
	Detección de réplicas (%)	100	100
REPRODUCIBILIDAD DEL ANALISTA	n	96	96
	Cq medio	33,40	30,13
	Coeficiente de variación (%)	4,76	3,73
	Detección de réplicas (%)	100	100
REPRODUCIBILIDAD ENTRE INSTRUMENTOS	n	72	72
	Cq medio	33,44	29,98
	Coeficiente de variación (%)	5,24	3,72
	Detección de réplicas (%)	100	100

11.5. Evaluación clínica

El uso del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech con muestras clínicas del tracto respiratorio se llevó a cabo en dos laboratorios diferentes. En total, se han analizado 100 muestras clínicas negativas y 100 muestras clínicas positivas. Los datos revelaron que se logró un grado de concordancia del 100% para las 200 muestras analizadas.

12. Control de calidad

Todos los componentes del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD de NZYtech se someten a prueba siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de PCR dúplex en tiempo real permite la detección de dianas descritas para la identificación del ARNm del SARS-CoV-2 y la RNasa P (RP) humana. Se observan amplificaciones positivas para los genes diana, el control positivo y los controles internos a través de los canales FAM y JOE, de acuerdo con los fluoróforos de los conjuntos de cebadores/sonda respectivos.

13. Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, puede ponerse en contacto con nuestro equipo de asistencia técnica en el teléfono: +351 (0) 21 364 35 14 o por correo electrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas y descargos de responsabilidad

Todas las marcas que aparecen en este manual son propiedad de sus respectivos propietarios.

15. Explicación de los símbolos

IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*		Consulte las instrucciones de uso
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código de lote		Fecha de caducidad
	Límite de temperatura	Σ	Contiene una cantidad suficiente para
CONTROL +	Control positivo		Manténgase alejado de la luz del sol (mezcla de cebadores y sondas)
CONTROL -	Control negativo		

16. Declaración de conformidad

Nombre del producto: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD03201

Uso indicado: Detección cualitativa del SARS-CoV-2

Clasificación: Otros (no incluidos en el anexo II o no destinado a autodiagnóstico) según la Directiva 98/79/CE.

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nosotros, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos por la presente que este producto, al que hace referencia esta declaración de conformidad, cumple con los siguientes estándares y demás documentos normativos ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, de acuerdo con las disposiciones de la Directiva 98/79/CE y Regulación (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*, incorporada a la legislación nacional de los Estados Miembros de la Unión Europea.

El archivo técnico del producto se conserva en NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Dra. Joana Brás
Directora Técnica

17. Bibliografía

OMS: *Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected.* 13 de marzo de 2020. Disponible en línea en la página https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

OMS: *Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences.* 17 de marzo de 2020. Disponible en línea en la página https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei *et al.* (2020): *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.* En Nature 579 (7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). *Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics.* Chem. Biol. 7(1) 63-72.

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. *et al.* (2020): *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14)*. bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862