SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Kit de RT-PCR de un paso para SARS-CoV-2, genes RdRp y N, IVD

Genes víricos de fosfoproteína de nucleocápside (N, por su sigla en inglés) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, por sus siglas en inglés)

REF MD04831, 96 reacciones
MD04831, 4 x 96 reacciones

Solo para el uso diagnóstico* in vitro *profesional

CE IVD

ES

Instrucciones de uso

MD0483_IM_es

VERSIÓN 2401, enero 2023

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 no suministrados ... 4
7. Recogida y preparación de las muestras ... 4
8. Precauciones y advertencias ... 4
8.1 Información de seguridad ... 5
8.2 Requisitos para la manipulación y el procedimiento ... 5
9. Procedimiento de la prueba ... 5
9.1 Configuración de la reacción ... 5
9.2 Programación del aparato de PCR en tieFmpo real ... 6
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 esperados ... 7
11.2 Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica ... 7
11.3 Reactividad analítica (inclusividad) y Especificidad analítica ... 8
11.4 Precisión ... 9
11.4.1 Reproducibilidad ... 9
11.4.2 Reproducibilidad diaria ... 9
11.4.3 Reproducibilidad lote a lote ... 9
11.4.4 Reproducibilidad del operador ... 9
11.4.5 Reproducibilidad entre instrumentos y del laboratorio ... 9
11.5 Evaluación clínica ... 10
12. Control de calidad ... 10
13. Asistencia técnica ... 10
14. Marcas y descargos de responsabilidad ... 10
15. Explicación de los símbolos ... 11
16. Declaración de conformidad ... 12
17. Bibliografía ... 13

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. Actualmente, no existe un tratamiento o vacuna específicos contra la infección por SARS-CoV-2.

2. Uso

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD es un test molecular pensado para la detección cualitativa rápida de los ácidos nucleicos del Coronavirus tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2) en muestras de hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos recogidas de los pacientes. Un resultado positivo indica la presencia de ARN del SARS-CoV-2 pero es necesaria la correlación clínica con la historia clínica del paciente y otra información de diagnóstico para determinar el estado de la infección del paciente. Los resultados negativos no impiden una infección por SARS-CoV-2 y no se deben utilizar como la única base para tomar decisiones de gestión de pacientes. Este kit está pensado para ser utilizado por personal cualificado de laboratorio, formado específicamente en técnicas de PCR en tiempo real y en diagnóstico *in vitro*.

3. Principios del ensayo

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, 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 necesarios en la **Sección 6.**). Los genes de virus de fosfoproteína de nucleocápside (N) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) han sido identificados previamente como marcadores altamente específicos para el SARS-CoV-2. Este kit de NZYtech actúa sobre las regiones específicas de los genes N y RdRp del genoma del SARS-CoV-2 para proporcionar la mayor sensibilidad de detección. Las sondas y primers del kit SARS-CoV-2 tienen un 100% de homología con >95% de las >5M de secuencias disponibles del genoma en la base de datos GISAID, a fecha de Noviembre de 2021, incluyendo completa identidad conlas variantes Delta (B.1.617.2) y Omicron (B.1.1.529). Además, los cebadores y sondas dirigidas al SARS-CoV-2 no muestran una homología significativa con los genomas no relacionados, haciendo este test altamente específico, pues no existe reactividad cruzada con los ácidos nucleicos de otros organismos respiratorios bacterianos o virales. Se incluye un control interno para confirmar la extracción eficiente del ARN a partir de muestras biológicas humanas, así como la ausencia de inhibidores de PCR, entre otros. Además, el test utiliza controles externos (control positivo de título bajo proporcionado con el kit y control negativo), tal y como se describe a continuación. El control positivo está formado por fragmentos de ácido nucleico que contienen las tres secuencias diana detectadas por el kit (SARS-CoV-2, genes RdRp y N y el gen RP humano). La evolución natural del SARS-CoV-2 implica que la nueva información de secuencia estará disponible después del diseño inicial de este kit, lo que refleja las estrategias de adaptación del SARS-CoV-2. Así, NZYtech revisará periódicamente las dianas genómicas del SARS-CoV-2 y, en caso de ser necesario, publicará nuevas versiones de este kit.

La detección cualitativa del ARN se basa en la tecnología RT-PCR en tiempo real en un solo paso, pues este sigue siendo el método más sensible para realizar una detección precisa del SARS-CoV-2. Utilizando el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech, el ARN aislado y purificado con un sistema de extracción (IVD) se retrotranscribe (RT) a ADNc y posteriormente se amplifica por PCR, en una sola reacción, utilizando tres conjuntos de cebadores/sondas altamente específicos utilizando el llamado principio TaqMan®. Alternativamente, las muestras recogidas en un medio de transporte específico (véase la recogida y preparación de muestras en la **sección 7.**) pueden utilizarse directamente en la reacción de RT-PCR tras un tratamiento térmico. En presencia de ARN viral, las sondas Taqman® se unen específicamente a dos regiones conservadas del genoma del SARS-CoV-2, a saber, los genes RdRp (dentro del gen de la poliproteína Orf1ab) y N que están flanqueados por dos pares de cebadores también altamente específicos. Un tercer conjunto de cebadores/sonda actúa como control interno endógeno para detectar ácidos nucleicos de la ribonucleasa P humana [gen RNasa P (RP)], evaluando la calidad de la muestra. Además, este control interno demuestra que no se ha producido ningún tipo de inhibición de la reacción mediante inhibidores de la PCR potencialmente presentes en muestras clínicas/ambientales. Para poder identificar la amplificación de las tres dianas específicas en una única reacción, las sondas especificas del SARS-CoV-2 y RNasa P humana se etiquetan de forma diferente, con fluoróforos FAM™ y JOE™, respectivamente. Tenga en cuenta que este panel contiene una prueba doble en el mismo canal FAM óptico para informar de un rendimiento adicional de las dos pruebas de PCR para la detección del SARS-Cov-2. Además, se suministran en concentraciones optimizadas para asegurar que la amplificación del ARNm humano, aunque esté presente en concentraciones muy altas, no limita la eficiencia de los conjuntos de sondas/cebadores del SARS-CoV-2.

4. Composición del kit

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech proporciona un conjunto completo de reactivos suficientes para realizar 96 reacciones RT-PCR en un solo paso.

COMPONENTES DEL KIT		VOLUMEN (POR VIAL)	NÚMERO DE VIALES	
			MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp & N)	Mezcla maestra NZYSupreme RT-qPCR de un paso	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	Mezcla cebador/sonda del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N)/RP	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	Control positivo del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N)/RP (1 x 10^4 copias/µL)	105 µL	1	4
NTC	No-template Control	105 µL	1	4

5. Condiciones para el almacenamiento, estabilidad y manipulación

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD se envía refrigerado. Todos los componentes se deben guardar de -85 °C a -15 °C nada más llegar. Mientras se usan, los componentes del kit se deben devolver al congelador inmediatamente después de su uso para minimizar el tiempo que permanecen a temperatura ambiente.

- Minimice el número de ciclos de congelación/descongelación guardándolos en alícuotas de trabajo. Si fuera conveniente, los componentes del kit se pueden alicuotar en volúmenes menores después de descongelarlos.
- La Mezcla cebador/sonda del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N)/RP se debería guardar protegida de la luz. En concreto, no exponga la Mezcla maestra NZYSupreme RT-qPCR de un paso a la luz directa del sol después de combinarla con la mezcla de cebadores/sonda.
- Si el embalaje que protege el kit llegara dañado, póngase en contacto con NZYtech.
- Tenga en cuenta la fecha de caducidad indicada en el embalaje. NZYtech no recomienda utilizar el kit después de la fecha de caducidad. En esa fecha, el kit se debe desechar siguiendo las instrucciones de eliminación indicadas en la **Sección 8.2**.

6. Materiales e instrumentos necesarios no suministrados

- Aparato de PCR en tiempo real que detecte los colorantes fluorescentes FAM™ y JOE™ (a longitdes de onda de emisión de 520 y 555nm, respectivamente). Véanse 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 los especímenes respiratorios.
- Elementos de plástico para qPCR libres de RNasa/DNasa: tubos de PCR, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas.
- Pipetas y puntas de filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vórtex y centrífugas.
- Agua tratada con DEPC (por favor, contacte con NZYtech para pedir este producto, referencia MB43701).

7. Recogida y preparación de las muestras

Diversos factores, tales como el protocolo para la recogida de muestras para especímenes respiratorios humanos (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos), el transporte, el almacenamiento y el tiempo de procesado de la muestra, resultan cruciales para conseguir unos resultados óptimos. Las muestras recogidas deben analizarse lo antes posible. Las muestras que no se analicen en un plazo de 24 horas deben almacenarse entre -85 °C y -15 °C. Además, las muestras deben transportarse y almacenarse a bajas temperaturas de acuerdo con las normas de bioseguridad.

- **Muestras biológicas sometidas a la extracción de ácidos nucleicos:** El ARN o los ácidos nucleicos totales extraídos siguiendo un protocolo IVD son el material de partida para el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Por favor, asegúrese de que las muestras de ARN son adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad del ácido nucleico. Una relación A260/280 de ~2 es generalmente aceptada para el ARN puro. Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo completamente antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. El kit NZYtech integra una reacción interna de control de extracción de ARN que se dirige al ARN humano, que se copurifica con el ARN viral. El ARN humano se amplifica con el conjunto de cebadores/sonda RNasa P (RP). Esto es útil para comprobar la eficacia del aislamiento del ARN y/o la presencia de inhibidores durante el procesamiento de la muestra.
- **Muestras biológicas utilizadas directamente en el protocolo de RT-PCR**: las muestras nasofaríngeas deben recogerse con hisopos Greiner Bio-One (referencia CM-FS913) y colocarse directamente en VACUETTE® Virus Stabilization Tube, Greiner Bio-One (referencia 456161). Pipetear alícuotas de 50 µL de cada muestra y transferirlas a placas de PCR de 96 pocillos que deben sellarse y someterse inmediatamente a un paso de tratamiento térmico a 95 °C, durante 5 minutos, utilizando un termociclador con tapa calentada. Alternativamente, pipetear alícuotas de 200 µL e inactivarlas en tubos eppendorf de 1,5 mL utilizando un tratamiento de muestras con bloque térmico.

8. Precauciones y advertencias

Como en cualquier procedimiento de prueba analítico, las buenas prácticas de laboratorio resultan fundamentales. Siga con atención los procedimientos y directrices proporcionados en este manual para garantizar que el test se realiza correctamente. Cualquier desviación de los mismos puede hacer que la prueba falle o provocar resultados erróneos. Debido a la gran sensibilidad del kit, hay que tener especial cuidado para no contaminar las mezclas de amplificación de reactivos y PCR.

El protocolo de RT-PCR directa ha sido validado exclusivamente para muestras nasofaríngeas transportadas y almacenadas en VACUETTE® Virus Stabilization Tube, Greiner Bio-One (referencia 456161). Por lo tanto, el protocolo de RT-PCR directa del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD no fue validado en muestras transportadas y almacenadas en medios de recolección tipo "VTM/UTM" que incluyen tiocianato de guanidina como agente inactivante. Por ello, se recomienda utilizar únicamente el medio de transporte y

almacenamiento mencionado anteriormente. El uso de otros medios puede dar lugar a resultados falsos negativos. Para diferentes medios de recogida, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (positivas y negativas).

8.1 Información de seguridad

Antes de utilizar el kit consulte la Hoja de seguridad (SDS, por sus siglas en inglés) que se encuentra disponible en la página web de NZYtech (www.nzytech.com). La detección del virus SARS-CoV-2 debe ser realizada únicamente por personal con formación en los procedimientos técnicos y de seguridad relevantes en laboratorios equipados adecuadamente. Se deben seguir en todo momento las directrices nacionales e internacionales de bioseguridad en el laboratorio.

8.2 Requisitos para la manipulación y el procedimiento

- Exclusivamente para diagnóstico profesional *in vitro*.
- 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 los reactivos de los distintos lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- En todos los procedimientos se deben utilizar pipetas y elementos de plástico desechables libres de DNasa/RNasa.
- Utilice puntas de filtro libres de DNasa/RNasa durante todo el protocolo para evitar la contaminación por líquidos y aerosoles.
- La preparación de la muestra, la configuración de la reacción y la amplificación se deben realizan en distintas zonas de trabajo.
- El control positivo contiene un elevado número de copias de plantillas; se deben abrir y procesar lejos de las muestras de análisis y de los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre el NTC proporcionado en el kit.
- Si se utiliza el protocolo directo, se recomienda realizar un segundo control negativo utilizando agua tratada con DEPC (NZYtech, referencia MB43701) que se añadirá a las muestras que se analizarán por RT-PCR directa.
- Al final de cada análisis, limpie las superficies de trabajo y el equipo con un producto para eliminar ADN/ARN.
- Manipule con cuidado las placas post-amplificación y deséchelas inmediatamente una vez realizado el análisis; las placas siempre se deben desechar en un contenedor de residuos biológicos adecuado después de usarlas.
- Las muestras biológicas se deben manipular como si estuvieran infectadas, siguiendo las precauciones de bioseguridad adecuadas.
- Los residuos de preparaciones y sustancias químicas se suelen considerar residuos peligrosos. La eliminación de esta clase de residuos está regulada mediante reglamentos y leyes locales y nacionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud teniendo en cuenta los síntomas clínicos y la historia clínica del paciente.
- Esta prueba no puede descartar las enfermedades provocadas por otros patógenos.
- Un resultado negativo para cualquiera prueba PCR no descarta de forma concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, utilice ropa protectora, lleve todo el tiempo guantes desechables sin talco, utilice gafas protectoras y mascarilla. No coma, beba ni fume en la zona de trabajo.

9. Procedimiento de la prueba

Lea las instrucciones de uso con atención antes de realizar la prueba. Tenga en cuenta que todos los pasos de pipeteado y montaje de la placa experimental deben realizarse sobre hielo. Una vez lista la placa, comience inmediatamente con el paso uno del protocolo RT-PCR. La incubación prolongada de las mezclas de reacción a temperatura ambiente puede dar lugar a artefactos de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes de realizar el experimento, empiece mezclando bien los tubos de reacción suministrados, centrifúguelos durante 5 segundos para realizar la recogida de contenidos en la parte inferior del tubo y ponga los tubos en hielo. **Le recomendamos encarecidamente que pipetee el Control positivo del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N)/RP en último lugar para evitar la contaminación.**

9.1 Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de RT-PCR suficiente para el número de pruebas del SARS-CoV-2/RNasa P a realizar con un volumen adicional del 5% para cubrir las pérdidas por pipeteo. Siga de acuerdo con la tabla siguiente que especifica los volúmenes para 1 y *n* pruebas (donde *n* se corresponde con el número total de reacciones):

COMPONENTE	1 PRUEBA VOLUMEN (µL)	*n* PRUEBAS (*) VOLUMEN + 5% (µL)
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 prueba, cuente el número de muestras y añada dos más para los controles Negativo y Positivo, respectivamente.

2. Pipetee 12 µL de mezcla de RT-PCR en pocillos individuales de acuerdo con el montaje de placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Para el control negativo, añada 8 µL del NTC en lugar de la plantilla de ARN en el pocillo de control negativo. El volumen final debe ser 20 µL. Cuando se utilice el protocolo de RT-PCR directa, debe incluirse un segundo control negativo, añadiendo 8 µL de agua tratada con DEPC (NZYtech, referencia MB43701) en lugar de muestras biológicas directas sin extraer.
4. a. Para las **muestras biológicas extraídas**, añada 8 µL de cada muestra de ARN en los pocillos de SARS-CoV-2/RNasa P, según la configuración de su placa experimental. El volumen final de cada pocillo debe ser de 20 µL.

b. Para las **muestras biológicas no extraídas**, después de un paso de tratamiento térmico a 95 °C, durante 5 minutos, añada 4 µL de cada muestra a la placa final de qPCR. A cada muestra añadir 4 µL de agua tratada con DEPC (NZYtech, referencia MB43701). El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL. No añada más de 4 µL de muestra

5. Para el control positivo, añada 8 µl del SARS-CoV-2 Pos (RdRp y N) en lugar de la plantilla de ARN en el pocillo de control positivo. El volumen final debe ser 20 µl.

6. Cubra y selle la placa con una lámina adhesiva óptica adecuada antes de continuar con los pasos de RT-PCR y detección.

7. Coloque la placa de reacción en el aparato de PCR en tiempo real y ejecute el protocolo de RT-PCR de acuerdo con la sección siguiente.

9.2 Programación del aparato de PCR en tiempo real

La tabla siguiente muestra un protocolo estándar optimizado en varias plataformas. Sin embargo, estas condiciones pueden adaptarse y validarse para ajustarse a los distintos protocolos específicos de cada aparato.

Opciones de ejecución de RT-PCR sugeridas

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*

(*) Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado.

Fluoróforos y canales de detección

DIANA	FLUORÓFORO	CANAL DE DETECCIÓN
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNasa P	JOE™	JOE, VIC o HEX

El SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech se validó para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando las muestras previas caracterizadas (tanto positivas como negativas).

10. Análisis de datos

10.1 Criterios de validación de la prueba

La detección de ARN del SARS-CoV-2 se realiza detectando dos regiones del genoma diana, que se detectan en el mismo canal de fluorescencia (FAM). El análisis de datos lo realiza el software del aparato. Considerando las diferencias de rendimiento en distintos aparatos de PCR en tiempo real, los umbrales para las dos señales de fluorescencia (FAM™ y JOE™) se determinan automáticamente mediante el software con ajustes manuales en caso de que sea necesario. Antes de analizar los resultados de las muestras, es recomendable verificar si la prueba PCR en tiempo real es válida. Así, para cada placa, confirme si los resultados para los controles positivos y negativo se realizaron como era de esperar, de acuerdo con los siguientes criterios:

Control positivo: las curvas de amplificación de FAM™ (SARS-CoV-2, genes RdRp y N) y JOE™ (RP) son positivas. Se espera que el control positivo amplifique a un Ct<30, tanto en el canal FAM como en el canal JOE. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es una clara indicación de que el experimento se ha visto comprometido.

Control negativo (sin reacción de plantilla): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene una o dos curvas de amplificación (FAM y/o JOE) con una forma sigmoidal, puede haberse producido contaminación de la muestra. Recomendamos realizar una descontaminación de rutina de las áreas de trabajo del laboratorio, material y equipamiento. Repita la prueba siguiendo las buenas prácticas de RT-PCR, empezando con una caja sellada.

Si los controles se ajustan a lo previsto, la prueba es **válida**. Proceda a realizar la interpretación de los resultados para las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no muestra el comportamiento esperado, la prueba se ha visto comprometida o se ha realizado de forma incorrecta y se debe considerar **no válida**.
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 de FAM™ muestra una forma sigmoidal con un Ct≤35, independientemente del resultado obtenido para la prueba de RP (JOE™).

El **SARS-CoV-2 no se detecta** si la curva FAM™ no es positiva (Ct>35) mientras la RP (JOE™) muestra una curva sigmoidal positiva (Ct<40).

La prueba **no es válida** si las dos pruebas SARS-CoV-2 y RP son negativas. La prueba debe repetirse con un ácido nucleico re-purificado a partir de la muestra.

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

RESULTADO DEL SARS-CoV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	**RESULTADO DE RP** RP, CT (JOE™)	**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**
+ (Ct≤35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO
+ (Ct≤35)	- (Ct>40)	SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO
- (Ct>35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 no detectado → NEGATIVO
- (Ct>35)	- (Ct>40)	Prueba no válida, repita la extracción y repita la prueba

Nota 1: *NZYtech recomienda repetir el análisis para todas las muestras que presenten una curva atípica o ambigua que no permita una interpretación clara.*

Nota 2: *La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de que haya resultados de falsos positivos o de falsos negativos.*

- Aunque el riesgo de que haya resultados de falso negativo se reduce debido al diseño de diana dual de la presente prueba, los resultados de falso negativo pueden deberse a:
  - Recogida, manipulación y/o almacenamiento inadecuado de las muestras.
  - Muestra fuera de la fase virémica.
  - Error a la hora de seguir los procedimientos de este manual.
  - Uso del kit de extracción no autorizado o de la plataforma de PCR en tiempo real

- Los resultados de falso positivo pueden deberse a:
  - Manipulación inadecuada de las muestras que contienen una alta concentración de ARN viral del SARS-CoV-2.
  - Manipulación inadecuada del control positivo SARS-CoV-2 Pos (RdRp y N).
  - Manipulación inadecuada del producto amplificado (placa post-amplificación).

Los resultados negativos no impiden una infección por SARS-CoV-2 y no se deben utilizar como la única base para elegir un tratamiento o tomar decisiones de gestión de pacientes. Además, esta prueba no puede descartar las enfermedades provocadas por otros patógenos víricos os bacterianos.

11. Evaluación del rendimiento

La evaluación del rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech se realizó en los sistemas de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q y Bio-Rad® CFX96™ con la realización de pruebas adicionales en el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® StepOnePlus. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando las muestras previas caracterizadas (tanto positivas como negativas).

11.1 Resultados esperados

Las gráficas de amplificación típicas, observadas para una muestra clínica que contenga ácidos nucleicos del SARS-CoV-2, se presentan en la Figura 1. Los dos casos representan ejemplos de muestras clínicas que presentan cargas medias (A) y altas (B) del SARS-CoV-2. En casos de cargas muy altas del SARS-CoV-2 (véase figura 1B) la curva del canal JOE, correspondiente al gen RNasa P humano, puede estar ausente o mostrar una forma atípica.

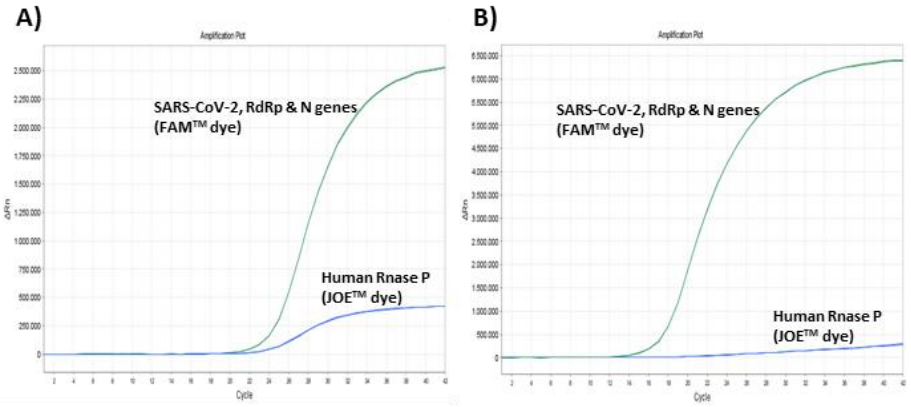

Figura 1. Detección simultánea de dianas del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N) y RNasa-P humanas a partir de muestras clínicas positivas con cargas medias (A) y altas (B) del SARS-CoV-2. Curvas verdes (A y B): detección de las dianas de ARN vírico del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N) a través del canal FAM; Curvas azules (A y B): detección del gen RNasa P humano a través del canal JOE*. (VIC/HEX alternativa)

11.2 Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se ha definido como la menor concentración de analito que se podría detectar de manera fiable con una confianza del 95%. Esto se evaluó analizando los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en distintos números de copias, de forma individual o añadidos al ARN extraído de las muestras orofaríngeas negativas, usando 3 lotes de kit distintos siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. Se repitieron las pruebas durante 4 días, produciendo 48 duplicados para cada una de las concentraciones del SARS-CoV-2 probadas. Juntos, los

datos han revelado que el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech detecta 0,15 copias/µl de ARN viral del SARS-CoV-2 con una confianza ≥95%. Así, el umbral de detección (LoD) provisional se determinó que era 0,15 copias/µl o 150 copias/ml. El LoD profesional fue confirmado por dos operadores distintos usando tres lotes de kit en un experimento con un total de 48 duplicados de una matriz negativa de hisopos experimentales añadidos de forma independiente. La capacidad del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech para detectar el virus a distintas cargas (desde 5 x 10^6 a 5 copias por reacción) se presenta en la Figura 2.

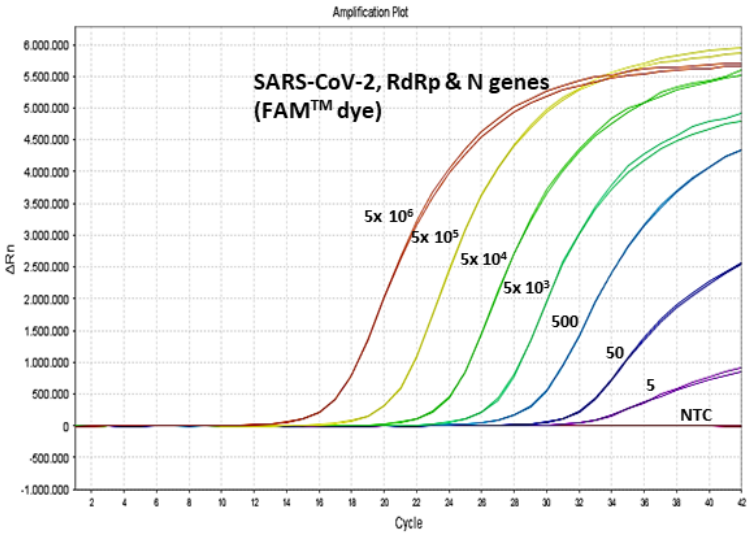

Figura 2. Sensibilidad del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Gráfico de amplificación (número de ciclo *frente* fluorescencia - ΔRN) de disoluciones en serie 1:10 del ARNv del SARS-CoV-2, de 5 x 10^6 copias a 5 copias por reacción a través del canal FAM. NTC, sin control de plantilla (control negativo).

En el caso de las muestras que no fueron sometidas a un protocolo de extracción de ácidos nucleicos y que se recuperan en el medio de recogida mencionado anteriormente, se evaluó primero la sensibilidad analítica comparando los valores Ct de las muestras clínicas sometidas y no sometidas al proceso de extracción. Así, se seleccionaron 50 muestras clínicas previamente clasificadas como positivas. El ensayo de RT-PCR comparó los resultados de detección del SARS-CoV-2 obtenidos para las muestras con ARN extraído y para las correspondientes muestras directas no extraídas. Para las 50 muestras clínicas positivas analizadas (sometidas a extracción más RT-PCR o con el protocolo de RT-PCR directa) el Ct mínimo observado fue de 16,1 y el Ct máximo de 34,9. Los resultados indicaron que, para la detección del SARS-CoV-2, la diferencia media de Cts entre los dos procedimientos fue de 0,1. Este resultado sugiere que el LoD no cambia independientemente de que la muestra se someta o no a un paso previo de extracción de ARN. Por ello, el LoD del kit fue reevaluado y confirmado por dos operadores diferentes, para un total de 48 réplicas. Los resultados confirmaron que cuando se utiliza el formato de prueba directa, el kit detecta 0,15 copias/µL de ARN viral del SARS-CoV-2 con una confianza de ≥95%.

11.3 Reactividad analítica (inclusividad) y Especificidad analítica

La inclusividad y reactividad cruzada fueron evaluadas mediante análisis *in silico* de sondas y primers contra patógenos relacionados con SARS-CoV.2 y patógenos normales que causen infección con síntomas similares, respectivamente. El diseño del ensayo del análisis *in silico* fue hecho para detectar todas las variantes del vitus SARS-CoC-2 y no muestra reactvidad con especies que no sean SARS-CoV-2.

El análisis *in vitro* para reactividad cruzada (exclusividad) fue llevado a cabo para confirmar que el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD (MD0483) no reacciona con otros organismos de la flora humana y organismos patógenos que puedan ser encontrados en la muestra clínica. El estudio fue llevado a cabo usando tres paneles de patógenos respiratorios comerciales de ZeptoMetrix Multimarker Controls (#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) y NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Estos paneles son representativos de verdadesros especímenes humanos, incluyendo Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY02/2009), Rhinovirus Type 1A, Adenovirus Type 3; Parainfluenza Type 1, Parainfluenza Type 2, Parainfluenza Type 3, Parainfluenza Type 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), Chlamydophila pneumoniae (CWL-029), Mycoplasma pneumoniae (M-129), Coxsackievirus (Type A1), Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H1N1 (A/Singapore/63/04), Influenza B (B/Florida/02/06), Respiratory Syncytial Virus A, Respiratory Syncytial Virus B (CH93 (18)-18), Coronavirus (HKU-1 recombinant), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), Bordetella. pertussis (A639), Bordetella pertussis (A747), Bordetella holmesii (F061), Legionella pneumophila (Philadelphia) y Bocavirus Humano. Adicionalmente, otros microbios 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,* fueron testados. Ninguno de los organismos testados interfirieron con el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD (MD0483) generando falsos positivos o interferencias en la señal.

El impacto de 17 sustancias interferentes fue valorado en tests consistentes en muestras nasofaríngeas negativas y muestras positivas para SARS-CoV-2 con ~3x LoD. Las sustancias potencialmente interferentes fueron añadidas a las muestrasa concentraciones representativas de los niveles más altos que podrían encontrarse en las muestras humanas según la literatura. Todos los tests se realizaron por pentaplicado y los resultados comparados con los datos obtenidos con un test de control que no contenía interferentes. A las concentraciones testadas, los resultados revelan que ninguna de las moléculas testadas afectan a la sensibilidad de la detección. La tabla de más abajo resume los datos obtenidos en esos experimentos. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en el equipo Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR.

INTERFERENTE POTENCIAL	PRINCIPIO ATIVO	CONCENTRACIÓN FINAL EN MUESTRA	INTERFERENCIA SI (S) O NO (N)
Agua de mar isotónica (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Spray de garganta, anestésico oral y analgésico (Strepfen)	Flurbiprofeno	5% v/v	N
Solución de lavado nasal (Spray de alergias – Vibrocil)	Propionato de fluticasona	5% v/v	N
Spray de corticoesteroides nasal (Nasomet)	Furoato de mometasona	5% v/v	N
Spray de corticoesteroides nasal (Pulmicort)	Budesonida	5% v/v	N
Antimicrobiano, systemico (Trobex)	Tobramicina	10 µg/mL	N
Analgésico bucal, antiinflamatorio y antiséptico (Pyralvex)	Extracto de ruibarbo, ácido salicílico	5% v/v	N
Crema orofaríngea, antifúngica y antibacteriana (Daktarin)	Miconazol	5 mg/mL	N
Solución antiséptica para lavado bucal (Eludril Gé)	Gluconato de clorhexidina, hemihidrato de clorobutanol	5% v/v	N
Jarabe antitusivo (Codipront)	Codeína, citrato de feniltoloxamina	5% v/v	N
Sangre completa (humana)	-	4% v/v	N
Medicamentos antivirales (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolíticos (Mucosolvan)	Clorhidrato de ambroxol	5% v/v	N
Solución de gotas nasales (Nasarox)	Clorhidrato de oximetazolina	10% v/v	N
Ungüento nasal antibiótico (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Saliva (humana)	-	25% v/v	N
Etanol absoluto	Alcohol	5% v/v	N

11.4 Precisión

La precisión de la prueba para el SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech se determinó mediante el análisis repetido de los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2, que representan dos niveles de carga viral, 5 (1,67x LoD) y 150 (50x LoD) copias por reacción (0,25 y 7,50 copies/µL), de forma individual o añadidos al ARN extraído de las muestras orofaríngeas negativas, usando 3 lotes de kit distintos y siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación Cq y el porcentaje de detección de réplicas, tal y como se describe más adelante para cada uno de los casos. Los datos se resumen en la tabla que se muestra al final de esta sección.

11.4.1 Reproducibilidad

La reproducibilidad fue evaluada por un operador analizando 36 duplicados de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), representando un número final de 72 pruebas realizadas.

11.4.2 Reproducibilidad diaria

La reproducibilidad diaria fue evaluada por un operador analizando 72 duplicados de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), durante 4 días con 18 duplicados para cada una de las concentraciones por día (se realizaron un total de 144 pruebas).

11.4.3 Reproducibilidad lote a lote

La reproducibilidad entre lotes fue evaluada por un operador mediante el análisis de 144 duplicados de cada muestra (5 y 150 copias por reacción) usando 3 lotes del kit distintos con 48 duplicados por lote.

11.4.4 Reproducibilidad del operador

La reproducibilidad del operador fue evaluada analizando 72 duplicados de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), por cuatro operadores distintos, con 36 duplicados por operador.

11.4.5 Reproducibilidad entre instrumentos y del laboratorio

La reproducibilidad entre instrumentos fue medida por un operador mediante el análisis de 36 duplicados de cada muestra (5 y 150 copias por reacción), en dos instrumentos de qPCR distintos (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus), en un total de 72 pruebas por muestra.

Precisión del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech.

VARIABLE ANALIZADA		SARS-CoV-2 (COPIAS/REACCIÓN)	
		5	**150**
REPRODUCIBILIDAD	n	36	36
	Media Cq	31,72	26,30
	Coeficiente de variación (%)	1,94	1,60
	% de detección del duplicado	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	72	72
	Media Cq	31,42	26,13
	Coeficiente de variación (%)	1,50	1,55
	% de detección del duplicado	100	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	144	144
	Media Cq	31,49	26,24
	Coeficiente de variación (%)	1,61	1,46
	% de detección del duplicado	100	100
REPRODUCIBILIDAD DEL OPERADOR	n	72	72
	Media Cq	31,45	26,21
	Coeficiente de variación (%)	1,41	1,61
	% de detección del duplicado	100	100
REPRODUCIBILIDAD ENTRE INSTRUMENTOS	n	72	72
	Media Cq	31,81	26,46
	Coeficiente de variación (%)	1,61	1,35
	% de detección del duplicado	100	100

11.5 Evaluación clínica

El rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech, con las muestras nasofaríngeas de hisopos recogidas fueron evaluadas por tres laboratorios externos. En total, se han analizado 340 muestras clínicas negativas y 386 muestras clínicas positivas. Los datos han revelado que se ha alcanzado una coincidencia del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas. La evaluación del rendimiento del kit fue también medido en muestras nasofaríngeas de hisopos no sujetas previamente a ningún protocolo de extracción de ácidos nucleicos. En total han sido analizadas 104 muestras clínicas negativas y 51 muestras clínicas positivas. Los datos han revelado que se ha alcanzado una coincidencia del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas

12. Control de calidad

Todos los componentes del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD de NZYtech se probaron siguiendo los protocolos antes descritos. El sistema de PCR triplex en tiempo real permite la detección de las dianas descritas para la identificación del ARN vírico del SARS-CoV-2 (genes RdRp y N) y del ARNm humano (gen RNasa P, RP). Las amplificaciones positivas se observan para los genes diana, el control positivo y los controles internos mediante canales FAM y JOE, de acuerdo con los respectivos fluoróforos del conjunto cebador/sonda.

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*		Consultar las instrucciones de uso
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código de lote		Usado por
	Limitación de temperatura		Suficiente para
CONTROL +	Control positivo		Mantener alejado de la luz solar directa (mezcla de cebador/sonda)
CONTROL -	Control negativo		

16. Declaración de conformidad

Nombre del producto: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Número de catálogo: MD04831/MD04832

Uso previsto: 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.

Joana Brás, PhD

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 https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

OMS: PREGUNTAS Y RESPUESTAS: Similitudes y diferencias entre la COVID-19 y la gripe. 17 de marzo de 2020. Disponible en línea en 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. In 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