SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Kit II de RT-qPCR 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 MD04871, 96 reacciones
MD04872, 4 x 96 reacciones

***Solo para el uso diagnóstico profesional* in vitro**

CE IVD

ES

Instrucciones de uso

MD0487_IM_es

VERSIÓN 2401, Enero 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 previsto ... 3
3. Principios del ensayo ... 3
4. Composición del kit ... 3
5. Almacenamiento, estabilidad y condiciones de manipulación ... 4
6. Materiales e instrumentos necesarios pero no suministrados ... 4
7. Toma de muestras y preparación ... 4
8. Precauciones y advertencias ... 4
8.1 Información de seguridad ... 4
8.2 Requisitos de manipulación y de 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 Ejecución de los criterios de validación ... 6
10.2 Interpretación de los resultados de la prueba ... 6
11. Evaluación del rendimiento ... 7
11.1 Resultados previstos ... 7
11.2 Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica ... 8
11.3 Integración, reactividad cruzada y sustancias interferentes ... 8
11.4 Precisión ... 9
11.4.1 Repetibilidad ... 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 inter instrumento ... 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

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés), previamente llamado 2019-nCoV, es el agente causante de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) y de la misma forma que el estrechamente relacionado coronavirus SARS pertenece al género de los *Betacoronavirus* dentro de la familia de los coronavirus. Los coronavirus son grandes virus de ARN monocatenarios, positivos y con envoltura que infectan a humanos y también a una gran variedad de animales. El SARS-CoV-2, considerado de origen zoonótico, es altamente contagioso y se transmite principalmente a través de pequeñas gotas respiratorias (al toser y estornudar). La detección precoz del SARS-CoV-2 resulta fundamental a la hora de proporcionar un tratamiento rápido a los pacientes infectados y de reducir así la propagación de la infección. Los síntomas clínicos más habituales de COVID-19 incluyen fatiga, fiebre y síntomas respiratorios menores, como tos seca y disnea. También puede producirse pérdida del olfato y del gusto. En los casos más graves, la infección avanza hasta provocar una neumonía grave con complicaciones letales, como el síndrome respiratorio agudo, la disfunción orgánica y la muerte. Basándonos en el conocimiento actual, podemos afirmar que una parte significativa de las infecciones son leves o asintomáticas. Una parte de la población es más vulnerable a la forma grave de esta enfermedad, incluidos los adultos de edad avanzada (60 años y más), los fumadores y las personas con enfermedades crónicas tales como enfermedades cardíacas o pulmonares, cáncer, diabetes y los pacientes con un sistema inmunitario debilitado. Aunque en la actualidad ya hay vacunas disponibles para controlar la COVID-19, éstas no evitan la infección en personas vacunadas.

2. Uso previsto

El SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech es una prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) pensada para la detección cualitativa rápida de los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en muestras de hisopos orofaríngeos o nasofaríngeos tomadas en individuos sospechosos de padecer COVID-19. 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech proporciona el conjunto completo de reactivos y sondas para detectar cualitativamente el genoma del SARS-CoV-2, mediante los aparatos de PCR en tiempo real más comunes (véanse las especificaciones de los aparatos necesarios en la **Sección 6**). Los genes de la fosfoproteína de la nucleocápside (N) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del virus 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 cebadores del kit del SARS-CoV-2 tienen una homología del 100% con > 95% de las > 5 000 000 de secuencias del genoma disponibles en la base de datos GISAID desde noviembre de 2021, incluida la identidad completa para las variantes Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529). Además, los cebabores y sondas dirigidas al SARS-CoV-2 no muestran una homología significativa con los genomas no relacionados, haciendo de éste un 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 la Rnasa P humana (RP)). 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 RT-qPCR de un paso sigue siendo el método más fiable y sensible para realizar una detección precisa del ARN del SARS-CoV-2, que es indicativo de una infección humana. El ARN vírico aislado y purificado de muestras infectadas se retrotranscribe como ADNc y, posteriormente, se amplifica en una única reacción usando dos conjuntos de sondas y cebadores altamente específicos aprovechando el principio denominado TaqMan®. Durante este proceso, las sondas se aparean específicamente para dos regiones del genoma del SARS-CoV-2, en concreto los genes RdRp (dentro del gen de poliproteína Orf1ab) y los genes N. Un conjunto adicional de sondas/cebador actúa como un control interno endógeno para detectar ácidos nucleicos del gen de la RP (ribonucleasa P) humana, evaluando la calidad de la muestra. Para permitir identificar la amplificación de las tres dianas específicas en una única reacción, las sondas especificas de SARS-CoV-2, genes RdRp y N, y Rnasa P humana se etiquetan de forma diferente, con los fluoróforos HEX™, FAM™ y Cy5™, respectivamente. Tenga en cuenta que este panel contiene un ensayo doble en dos canales ópticos distintos, HEX (alternativamente VIC o JOE) y FAM, para informar del rendimiento de los dos amplificadores de SARS-CoV-2. Además, se suministran sondas y cebadores 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/cebador del SARS-CoV-2.

4. Composición del kit

El SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech proporciona un conjunto completo de reactivos y controles para la detección cualitativa de SARS-CoV-2 en un solo paso.

COMPONENTES DEL KIT		VOLUMEN (POR VIAL)	NÚMERO DE VIALES	
			MD04871	MD04872
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	Mezcla maestra NZYSupreme RT-qPCR de un paso, ROX*	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	Mezcla sondas cebador SARS-CoV-2/RP II	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	Sin control de plantilla	105 µL	1	4

**A pesar de que la mayor parte de los instrumentos de PCR en tiempo real que leen el tinte ROX permiten a los usuarios realizar experimentos y analizar datos sin ROX, la inclusión de este fluoróforo interno de referencia pasiva evita una mala interpretación de los datos y permite detectar y diagnosticar errores.*

5. Almacenamiento, estabilidad y condiciones de manipulación

El SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD se envía refrigerado. Todos los componentes se deben guardar entre -85 °C y 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. Tenga también en cuenta las siguientes indicaciones:

- 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 cebadores/sonda II del SARS-CoV-2/RP se debería guardar protegida de la luz. En particular, no exponga la mezcla SARS-CoV-2 MMix II ROX (RdRp y N) 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 pero no suministrados

- Aparatos de PCR en tiempo real que detecten tintes fluorescentes FAM™, HEX™/JOE™/VIC™ y Cy5™ (a longitudes de onda de emisión de 520, 556/555/554 y 670 nm, respectivamente). Véanse en la **Sección 11** los modelos de aparatos 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.
- Pipetadores y puntas de filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vórtex y centrífugas.

7. Toma de muestras y preparación

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 se deben analizar lo antes posible. Las muestras se deben transportar y guardar a temperaturas bajas, de acuerdo con los reglamentos de bioseguridad. 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech. Asegúrese de que las muestras de ARN son adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad del ácido nucleico. En general, se acepta una relación $A_{260/280}$ de ~2 para el ARN puro. Dado que el etanol es un potente inhibidor de PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. El kit NZYtech integra una reacción interna de control de extracción de ARN, que actúa sobre el ARN humano, que se co-purifica con el ARN viral. El ARN humano se amplifica con el conjunto de cebadores/sonda RP. Esto resulta útil para comprobar la eficiencia del aislamiento del ARN y/o la presencia de inhibidores durante el procesado de la muestra.

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.

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 de manipulación y de procedimiento

- Exclusivo para uso 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; se debe abrir y procesar lejos de las muestras de análisis y de los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre un tubo NTC para prepararla reacción sin control de plantilla.
- 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 correspondientes.
- 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 cualquier 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-qPCR. 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 localizar todo el contenido de los tubos en la parte inferior y ponga los tubos en hielo. **Le recomendamos encarecidamente que pipetee el SARS-CoV-2 POS (RdRp y N) en último lugar para evitar la contaminación cruzada.**

9.1 Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de RT-qPCR suficiente para el número de pruebas del SARS-CoV-2/RP 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 II, ROX (RdRp & N)(**)	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	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.

(**) Tenga en cuenta que se puede observar un precipitado en la parte inferior del tubo de la mezcla maestra. Una vez descongelada la mezcla maestra, resuspéndala antes de usarla. En este caso, no centrifugue la mezcla maestra antes de pipetearla.

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 de NTC en lugar de la muestra de ARN en el pocillo del control negativo. El volumen final debe ser 20 µL.
4. Para las muestras biológicas, añada 8 µL de cada una de las muestras de ARN en los pocillos SARS-CoV-2/RNasa P, de acuerdo con el montaje de placa experimental. El volumen final en cada pocillo debe ser 20 µL.
5. Para el control positivo, añada 8 µL del SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) en lugar de la muestra 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 tablas siguientes muestran dos protocolos térmicos optimizados (estándar y rápido) para realizar ensayos de SARS-CoV-2/Rp usando SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, optimizado en diferentes plataformas. Sin embargo, estas condiciones pueden adaptarse y validarse para ajustarse a los distintos protocolos específicos de cada máquina:

- **Protocolo Estándar**

CICLOS	TEMPERATURA	PLAZO	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	Apareamiento/Extensión*

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

Protocolo Estándar para el SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech se validó para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro 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).

- **Protocolo rápido**

CICLOS	TEMPERATURA	PLAZO	PASO
1	50 °C	10 min	Transcripción Reversa
1	95 °C	1 min	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	20 s	Apareamiento/Extensión*

**Dependiendo del equipamiento utilizado seleccione el canal de detección apropiado.*

Protocolo rápido para el kit NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, se validó en los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® QuantStudio 5 and 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).

Los fluoróforos utilizados en este kit y los canales de detección correspondientes son:

DIANAS	FLUORÓFORO**	CANALES DE DETECCIÓN
SARS-CoV-2, gen RdRp	HEX™	JOE, VIC o HEX
SARS-CoV-2, gen N	FAM™	FAM
RNasa P	Cy5™	Cy5

***La apertura del canal ROX permitirá utilizar este fluoróforo interno de referencia pasiva para evitar una mala interpretación de los datos y errores posteriores.*

10. Análisis de datos

10.1 Ejecución de los criterios de validación

La detección del ARN del SARS-CoV-2 se realiza mediante la detección de dos regiones del genoma viral, que se detectan en distintos canales fluorescentes (FAM y HEX), y el control de la RP humana en un tercer canal (Cy5). 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 tres señales de fluorescencia (FAM™, HEX™ y Cy5™) 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 positivo y negativo se realizaron como era de esperar, de acuerdo con los siguientes criterios:

Control positivo: las curvas de amplificación de JOE (para SARS-CoV-2, gen RdRp), FAM (para SARS-CoV-2, gen N) y Cy5 (para el gen de la RP) son positivas. Se espera que el control positivo amplifique a un Ct<30, tanto en el canal FAM, como en el JOE y Cy5. No satisfacer este criterio de control de calidad es una clara indicación de que el experimento se ha visto comprometido.

Control negativo (NTC): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene una, dos o tres curvas de amplificación (JOE, FAM y/o Cy5) con forma de sigmoide, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Repite la prueba siguiendo buenas prácticas de RT-PCR.

Si los controles están de acuerdo con lo esperado, la prueba es **válida**. Proceda a realizar la interpretación de los resultados para las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no muestra el rendimiento 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

Se detecta el SARS-CoV-2 si las dos curvas de amplificación JOE y FAM presentan forma de sigmoide con un Ct≤36, independientemente del resultado obtenido para la prueba de la RP (Cy5).

El **SARS-CoV-2 no se detecta** si las curvas de amplificación JOE y FAM no son positivas (Ct>36) mientras la RP (Cy5) muestra una curva sigmoide positiva (Ct<40).

La prueba es no concluyente para SARS-CoV-2 si las curvas de amplificación JOE o FAM no muestran una forma sigmoide con un Ct≤36 mientras la otra diana del SARS-CoV-2 es positiva, independientemente del resultado obtenido para la prueba de la RP (Cy5). La prueba se debe repetir con un ácido nucleico re-purificado a partir de la muestra.

El test no es válido si las pruebas SARS-CoV-2 y RP son negativas. La prueba se debe repetir 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 sigmoides son un indicativo de una verdadera amplificación**).

RESULTADO DEL SARS-COV-2 SARS-COV-2, GEN RDRP, CT (JOE)	**RESULTADO DEL SARS-COV-2** SARS-COV-2, GEN N, CT (FAM)	**RESULTADO DE RP** GEN RP, CT (CY5)	**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO
+ (Ct≤36)	- (Ct>36)	+/-	SARS-CoV-2 detectado solo para una diana → NO CONCLUYENTE
- (Ct>36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 detectado solo para una diana → NO CONCLUYENTE
- (Ct>36)	- (Ct>36)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 no detectado → NEGATIVO
- (Ct>36)	- (Ct>36)	- (Ct>40)	Prueba no válida, repita la extracción y 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 falso positivo o de falso negativo.*

- 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 del 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 tratamiento o tomar decisiones de gestión de pacientes. Además, esta prueba no puede descartar las enfermedades provocadas por otros patógenos víricos o bacterianos.

11. Evaluación del rendimiento

La evaluación del rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech se llevó a cabo en los sistemas de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro y Bio-Rad® CFX96™ usando el protocolo rápido previamente descrito. 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 previstos

Las gráficas de amplificación típicas, observadas para muestras clínicas que contengan ácidos nucleicos del SARS-CoV-2, se presentan en la Figura 1. Los casos representan ejemplos de muestras clínicas que presentan cargas altas (Panel A) y medias (Panel B) del SARS-CoV-2. Tenga en cuenta que en casos de cargas muy altas del SARS-CoV-2 la curva del canal HEX™, correspondiente al gen RNasa P humano, puede estar ausente o mostrar una forma atípica (Figura 1A).

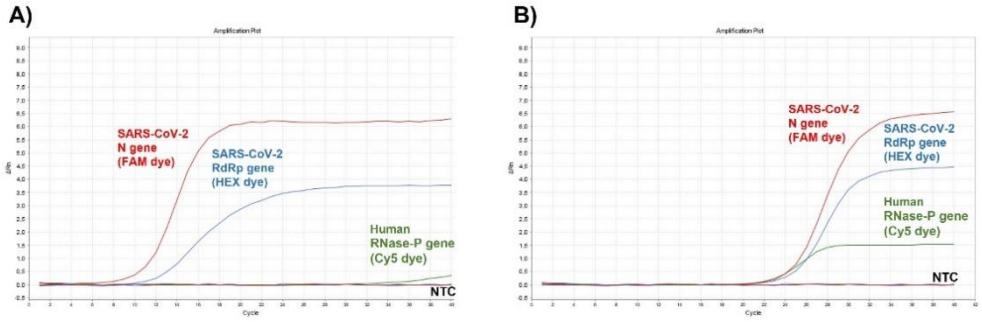

Figura 1. Detección simultánea de dianas SARS-CoV-2 (genes RdRp y N) y RNasa-P humanas a partir de muestras clínicas positivas con cargas altas (A) y medias (B) del SARS-CoV-2. Curva roja: detección de la diana del ARNv del SARS-CoV-2 (gen N) a través del canal FAM; **Curva azul**: detección de la diana del ARNv del SARS-CoV-2 (gen RdRp) a través del canal HEX (*alternativas VIC/JOE*); **Curva verde**: detección del gen de la RNasa P humana a través del canal Cy5.

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 copia, añadidos al ARN extraído de las muestras orofaríngeas negativas, usando 3 lotes de kit distintos siguiendo las condiciones típicas de reacción de prueba. Se repitieron las pruebas durante 3 días, produciendo 96 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech detecta 0,25 copias/µl o 250 copias/ml de ARN viral del SARS-CoV-2 con una confianza ≥95%, cuando se use el protocolo estándar. 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. El mismo LoD se confirmó usando el protocolo rápido.

11.3 Integración, reactividad cruzada y sustancias interferentes

La integración y la reactividad cruzada se evaluaron mediante análisis *in silico* de cebadores y sondas de oligonucleótidos contra los ácidos nucleicos patógenos relacionados con el SARS-CoV-2 y los patógenos normales que provocan una infección con síntomas similares, respectivamente. Tras el análisis *in silico* se encontró que el diseño de la prueba detectaba todas las cepas de virus del SARS-CoV-2 y que no mostraba ningún tipo de reactividad con especies distintas del SARS-CoV-2.

Se llevó a cabo el análisis *in vitro* para la reactividad cruzada (Exclusividad) para confirmar que el SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech no reacciona con otros microbios y patógenos colonizadores humanos que se encuentran comúnmente en la muestra clínica. Este estudio se llevó a cabo utilizando tres paneles patógenos respiratorios comerciales obtenidos de ZeptoMetrix, en particular, los controles multimarcador de RP (#MDZ001), el panel 1 del patógeno respiratorio NATtrol™ (#NATRPP-1) y los controles de RP NATtrol™ (#NATRPC-NNS). Estos paneles comprenden estudios de muestras representativas de auténticas muestras clínicas humanas, incluidos gripe A H3N2 (Brisbane/10/07), gripe A H1N1 (NY02/2009), rinovirus tipo 1A, adenovirus tipo 3; virus paragripal tipo 1, virus paragripal tipo 2, virus paragripal tipo 3, virus paragripal tipo 4, metapneumovirus (Perú 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Tipo A1), gripe A H1N1 (A/New Cal/20/99), gripe A H1N1 (A/Singapore/63/04), gripe B (B/Florida/02/06), virus respiratorio sincitial A, virus respiratorio sincitial B (CH93 (18)-18), coronavirus (HKU-1 recombinante), coronavirus (OC43), coronavirus (NL63), coronavirus (229E), *Bordetella pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) y bocavirus humano. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Además, también se analizaron otros microbios orales y del tracto respiratorio habituales, incluidos *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* y *Streptomyces albidoflavus*. Los datos, recopilados utilizando tres lotes de kit distintos, confirmaron que ninguno de los organismos analizados interfirió con el rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech generando un falso positivo en el resultado o un indicador no específico.

El impacto de las 17 posibles sustancias interferentes se evaluó en pruebas formadas por especímenes nasofaríngeos negativos añadidos a especímenes positivos de SARS-CoV-2 a ~3x LoD. Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras artificiales en concentraciones que representan los más altos niveles esperados en muestras respiratorias de pacientes humanos en base a los datos presentes en la literatura. Todas las pruebas se realizaron por quintuplicado y los resultados se compararon con los datos obtenidos con una prueba de control que no contenía ninguna sustancia interferente. A las concentraciones analizadas, los resultados mostraron que ninguna de las moléculas analizadas afectó a la sensibilidad de la detección. La siguiente tabla resume los datos recopilados en estos experimentos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el instrumento de PCR en tiempo 7500 FAST.

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-qPCR Kit II, RdRp and N 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, 15 (3x LoD) y 150 (30x LoD) copias por reacción (0,75 y 7,50 copies/µL), añadidos al ARN extraído de las muestras orofaríngeas negativas, usando 3 lotes de kit distintos y siguiendo las condiciones típicas de reacción de prueba. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación Cq y el % de detección del duplicado, tal y como se describe más adelante para cada uno de los casos. Los datos se resumen en la tabla que aparece a continuación.

11.4.1 Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un operador analizando 12 duplicados de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), representando un número final de 24 pruebas realizadas.

11.4.2 Reproducibilidad diaria

La reproducibilidad diaria fue evaluada por un operador analizando 48 duplicados de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), durante 4 días con 12 duplicados para cada una de las concentraciones por día (se realizaron un total de 120 pruebas).

11.4.3 Reproducibilidad lote a lote

La reproducibilidad entre lotes fue evaluada por un operador mediante el análisis de 60 duplicados de cada muestra (15 y 150 copias por reacción) usando 3 lotes de kit distintos con 20 duplicados por lote.

11.4.4 Reproducibilidad del operador

La reproducibilidad del operador fue evaluada analizando 36 duplicados de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), por tres operadores distintos, con 12 duplicados por operador.

11.4.5 Reproducibilidad inter instrumento

La reproducibilidad inter instrumento fue medida por un operador mediante el análisis de 36 duplicados de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), en tres instrumentos de qPCR distintos (sistemas de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 y Bio-Rad® CFX96™), en un total de 72 pruebas por muestra.

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

VARIABLE ANALIZADA		GEN RDRP (COPIAS/REACCIÓN)		GEN N (COPIAS/REACCIÓN)	
		15		150	
REPETIBILIDAD	n	12	12	12	12
	Media Cq	31,67	28,46	31,59	28,36
	Coeficiente de variación (%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% de detección del duplicado	100	100	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	48	48	48	48
	Media Cq	32,26	28,89	32,30	28,89
	Coeficiente de variación (%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% de detección del duplicado	98	100	98	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	60	60	60	60
	Media Cq	32,14	28,81	32,16	28,78
	Coeficiente de variación (%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% de detección del duplicado	98	100	98	100
REPRODUCIBILIDAD DEL OPERADOR	n	36	36	36	36
	Media Cq	31,59	28,37	31,71	28,47
	Coeficiente de variación (%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% de detección del duplicado	100	100	100	100
INTER INSTRUMENTO	n	36	36	36	36
	Media Cq	31,74	28,53	32,31	29,21
	Coeficiente de variación (%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% de detección del duplicado	100	100	100	100

11.5 Evaluación clínica

El rendimiento del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD de NZYtech, con las muestras nasofaríngeas de hisopos recogidas fueron evaluadas por dos laboratorios externos. En total, se han analizado 240 muestras clínicas negativas y 130 muestras clínicas positivas. Los datos han revelado que se ha alcanzado una coincidencia del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas. El protocolo rápido fue validado con muestras nasofaríngeas de hisopos positivas y negativas. Los datos también revelaron una coincidencia del 100% para todas las muestras clínicas analizadas.

12. Control de calidad

Todos los componentes del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N 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 genes diana, control positivo y controles internos mediante canales FAM, HEX/JOE/VIC y Cy5, de acuerdo con los respectivos tintes marcadores del conjunto cebador/sonda.

13. Asistencia técnica

Para solicitar la ayuda del Servicio técnico, póngase en contacto con nuestro equipo de servicio técnico especializado por teléfono: +351 (0) 21 364 35 14 o 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Número de catálogo: MD04871 y MD04872

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 (UE) 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. martes, 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