COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Gripe A/B, IVD

REF MD04851, 96 reacciones

Sólo para el uso diagnóstico* in vitro *profesional

CE IVD

ES

Instrucciones de uso

IM-003es

VERSIÓN 01/2022, Diciembre de 2022

Genes y enzimas NZYTech
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edificio 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 4
5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación 5
6. Materiales e instrumentación necesarios pero no suministrados 5
7. Recogida y preparación de muestras 6
8. Precauciones y advertencias 6
8.1. Información de seguridad 6
8.2. Requisitos para la manipulación y el procedimiento 6
9. Procedimiento de prueba 7
9.1. Configuración de la reacción 7
9.2. Programación del aparato de PCR en tiempo real 8
10. Análisis de dato 9
10.1. Criterios de validación de la prueba 9
10.2. Interpretación de los resultados de las pruebas 10
11. Evaluación del rendimiento 11
11.1 Resultados Previstos 11
11.2. Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica 11
11.3. Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica 13
11.4. Precisión 14
11.5 Evaluación clínica 16
12. Control de calidad 16
13. Asistencia técnica 17
14. Marcas y descargos de responsabilidad 17
15. Explicación de los símbolos 17
16. Declaración de conformidad 18
17. Bibliografía 19

1. Introducción

La pandemia en curso de la Enfermedad coronavirus 2019 (COVID-19), identificada por primera vez en China y rápidamente propagada en la mayoría de los países, ha causado morbilidad y mortalidad sin precedentes a nivel mundial, lo que ha dado lugar a una crisis sanitaria mundial y sobrecarga de los recursos sanitarios. El agente causante, Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), es un nuevo *Betacoronavirus* con similitud filogenética con el SARS-CoV. La influenza estacional, también llamada gripe estacional, es una infección viral contagiosa de las vías respiratorias con una importante tasa mundial de morbilidad, mortalidad y carga en los servicios de atención sanitaria. Sin embargo, su tasa de mortalidad es mucho menor que la del COVID-19. Los tipos A y B del virus de la gripe son los tipos dominantes de los virus gripales circulantes y la mayoría de las epidemias de gripe están relacionadas con el tipo A. Tanto los coronavirus como los virus de la gripe son enfermedades respiratorias altamente contagiosas transmitidas por contacto, gotas respiratorias (tos y estornudos) y superficies contaminadas. El COVID-19 podría confundirse clínicamente con una neumonía causada por el virus de la gripe y la coinfección conlleva un mal pronóstico. La superposición de la temporada de gripe con la pandemia de COVID-19 complica el manejo clínico de pacientes con síntomas respiratorios. La detección precoz del SARS-CoV-2 y del virus de la gripe A/B es vital para proporcionar un tratamiento rápido a los pacientes infectados con enfermedades respiratorias y, por lo tanto, para reducir la propagación de ambas infecciones. Las pruebas combinadas tanto para COVID-19 como para la gripe serán beneficiosas, ya que se podría utilizar una sola muestra para distinguir las dos infecciones en pacientes que presenten síntomas similares.

2. Uso previsto

El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech es una prueba molecular destinada a la detección cualitativa rápida de los agentes causantes del COVID-19 e Influenza (Gripe A y Gripe B) en muestras biológicas humanas. Sin embargo, este kit no hace distinción entre los tipos de gripe A y B, ya que ambos se detectan en el mismo canal de fluorescencia para FAM. Además, con este kit no se detectan otros *Betacoronavirus* o virus de la gripe, por ejemplo, la gripe C. Esta prueba está destinada a su uso como ayuda en el diagnóstico de SARS-CoV-2 y gripe en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. Un resultado positivo indica la presencia de SARS-CoV-2 y/o ARN de gripe, aunque es necesaria la correlación clínica con la historia del paciente y otra información diagnóstica para determinar el estado de infección del paciente. Los resultados negativos no impiden la infección y, por lo tanto, el resultado de la prueba no debe utilizarse como única base para las decisiones de gestión del paciente. Este kit está diseñado para su uso por personal capacitado en laboratorio, específicamente instruido en técnicas de PCR en tiempo real y diagnóstico *in vitro.*

3. Principios del ensayo

El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech proporciona el conjunto completo de reactivos y sondas para detectar cualitativamente el genoma del SARS-CoV-2 y/o influenza, a través de los aparatos de PCR en tiempo real más comunes (véanse las especificaciones de los instrumentos necesarios en la Sección **6).** El SARS-CoV-2 se identifica mediante la detección de dianas ubicadas en los genes RdRp y N por RT-qPCR. Por el contrario, los virus de la gripe A y la gripe B se detectan mediante la amplificación de las

dianas situadas en los genes M1 y NS2, respectivamente. El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech está diseñado para tener el perfil de detección más amplio posible, sin dejar de ser específico de los genomas SARS-CoV-2 e Influenza tipo A y B. Proporciona el conjunto completo de reactivos y sondas para detectar los tres genomas virales, incluyendo un control interno eficaz para confirmar la extracción eficiente del ARN de la muestra y la ausencia de inhibidores de PCR, entre otros. Este kit está dirigido hacia regiones altamente conservadas de los genomas del SARS-CoV-2 (incluyendo la totalidad de identidad de las variantes de Delta (B.1.617.2) y Omicron (B.1.1.529))e Influenza A y B, a través de un conjunto de primers y sondas altamente optimizados. Los primers y sondas tienen el 100% de homología con >95% de las >10000 secuencias del genoma disponibles en la base de datos GISAID a noviembre de 2022. Además, los primers y las sondas no muestran una homología significativa con genomas no relacionados, haciendo esta prueba altamente específica. La evolución natural de los virus detectados por este kit implica que la nueva información de secuencia estará disponible día a día, lo que refleja estrategias de adaptación viral bien conocidas. Por lo tanto, NZYTech revisará periódicamente las dianas genómicas virales y, si es necesario, lanzará nuevas versiones de este kit. La RT-qPCR en un solo paso es el método más rápido y confiable para realizar una detección precisa de SARS-CoV-2 y ARN virales de gripe A y B. El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech es un ensayo multiplex que detecta ácidos nucleicos SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y Humano (actuando como un control positivo interno). El ARN extraído y purificado se transcribe a ADNc y posteriormente se amplifica en una sola reacción utilizando cinco conjuntos de primers y sondas altamente específicos, a saber, aquellos que detectan los genes ARN Polimerasa dependiente del ARN SARS-CoV-2 (RdRp) y los genes de fosfoproteína de nucleocápside (N), matriz de gripe A y B (M1) y no estructural 2 (NS2) y el gen de la ribonucleasa P humana (RNase P, RP). El kit se basa en el llamado principio TaqMan®. Durante este proceso, las sondas se aparean específicamente con sus genes diana y tras la amplificación del ADNc, a través de dos primers flanqueantes, son sometidas a degradación que conduce a la separación del fluoróforo del quencher, lo que resulta en un aumento de la fluorescencia. La detección del control interno (el gen humano RNase P) valida la eficacia del proceso de extracción, así como la ausencia de inhibidores de la PCR potencialmente presentes en las muestras biológicas humanas. Para permitir la identificación de la amplificación de las cinco dianas específicas en una sola reacción, las sondas específicas SARS-CoV-2, Influenza A/B y RNase P humanas están etiquetadas de manera diferente, con fluoróforos Texas Red™, FAM™ y HEX™, respectivamente. Tenga en cuenta que este panel contiene un ensayo dúplex en el canal Texas Red™ (Genes diana específicos del SARS-CoV-2: RdRp y N) y FAM™ (Genes diana específicos de gripe A y B). Esto permite informar de un rendimiento aditivo de los ensayos para la detección del SARS-CoV-2, pero impide distinguir entre las infecciones por gripe A/B. Además, los cinco conjuntos de primers y sondas se proporcionan en concentraciones optimizadas que garantizan que la amplificación de los ácidos nucleicos de menor abundancia no se vea comprometida cuando otras dianas virales estén presentes en concentraciones más altas.

4. Composición del kit

El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech proporciona un conjunto completo de reactivos suficientes para realizar 96 reacciones RT-qPCR en un solo paso.

Componentes del kit		Número de viales	Volumen (por vial)
COVID-19/Flu MMix	NZYMultiplex One-Step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1	1050 µL
COVID-19/Flu Primer Mix	Covid-19 & Flu A/B Mezcla de primers (20x)	1	103 µL
COVID-19/Mezcla de sondas de gripe	Covid-19 & Flu A/B Mezcla de sondas (20x)	1	103 µL
COVID-19/Gripe Postal 1	COVID-19 & Flu A/B Control Positivo 1 (SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 y genes RP humanos)	1	105 µL
COVID-19/Gripe Postal 2	COVID-19 & Flu A/B Control Positivo 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 y genes RP humanos)	1	105 µL
NTC	Control negativo	1	105 µL

5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación

El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech se envía refrigerado. Todos los componentes deben almacenarse inmediatamente 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 y descongelación almacenando en alícuotas de trabajo. Si procede, los componentes del kit pueden ser alícutados en volúmenes más pequeños después de descongelarse.
- La mezcla de sonda COVID-19 & Flu A/B (20x) debe almacenarse protegida de la luz. En particular, no exponga la NZYMultiplex One-Step RT-qPCR Probe Master Mix a la luz solar después de combinarla con la mezcla de sondas.
- Si el paquete que protege el kit llegó dañado, póngase en contacto con NZYTech.
- Tenga cuidado con la fecha de caducidad indicada en el embalaje. NZYTech no recomienda utilizar el kit después de la fecha de caducidad. En esta fecha, el kit se debe desechar siguiendo las instrucciones de eliminación indicadas en la Sección **8.2**.

6. Materiales e instrumentación necesarios pero no suministrados

- Aparato de PCR en tiempo real que detecte los colorantes fluorescentes Texas Red™, FAM™ y HEX™ (a longitudes de onda de emisión de 615, 520 y 556 nm, respectivamente). Véase en **la Sección 11** los modelos de aparatos para los que se validó el kit.
- Equipo y consumibles para aislar el ARN viral de las muestras respiratorias.
- Elementos de plástico para qPCR libre de RNasa/DNasa: tubos de PCR, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas.
- Pipeteadores y puntas de filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vórtex y centrífuga.

7. Recogida y preparación de muestras

Diversos factores, como el protocolo para la recogida de muestras a partir de muestras respiratorias humanas (hisopos nasofaríngeos y/u orofaríngeos, lavado/aspirado nasofaríngeo, aspirados nasales, esputo, líquido de enjuague de garganta y BAL), el transporte, almacenamiento y tiempo de procesamiento de las muestras, son fundamentales para lograr unos resultados óptimos. Las muestras recogidas deben analizarse lo antes posible. Las muestras deben transportarse y almacenarse 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 Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech. Asegúrese de que las muestras de ARN sean adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad del ácido nucleico. Una relación $A_{260/280}$ de ~2 es generalmente aceptada para ARN puro. Dado que el etanol es un inhibidor fuerte de la PCR, es necesario eliminarlo por completo antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. El kit NZYTech integra una reacción interna del control de extracción de ARN que actúa sobre el ARN humano, que está co-purificado con ARN viral. El ARN humano se amplifica con los conjuntos de primers y sondas del gen de la RNasa P humana (RP). Esto es útil para comprobar la eficiencia del aislamiento del ARN y/o la presencia de inhibidores durante el procesamiento de muestras.

8. Precauciones y advertencias

Como en cualquier procedimiento de prueba analítica, las buenas prácticas de laboratorio resultan fundamentales. Siga cuidadosamente los procedimientos y directrices proporcionados en este manual para asegurarse de que la prueba se realiza correctamente. Cualquier desviación de los mismos puede resultar en un error en el ensayo o causar resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado para mantener los reactivos y las mezclas de amplificación de PCR libres de contaminación.

8.1. Información de seguridad

Antes de utilizar el kit, consulte la Hola de seguriad (SDS por sus siglas en inglés) que está disponible en el sitio web de NZYTech (**www.nzytech.com**). El uso de este kit debe ser realizado únicamente por personal capacitado y formado en los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes en laboratorios debidamente equipados. Se deben seguir en todo momento las directrices internacionales y nacionales sobre bioseguridad en un 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 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 reactivos de este kit.
- En todos los pasos deben utilizarse pipetas y elementos de plástico desechable libres de DNasa/RNasa
- Utilice puntas de filtro libres de DNasa/RNasa en todo el protocolo para evitar la contaminación por aerosoles y líquidos.

- La preparación de muestras, la configuración de la reacción y la amplificación deben realizarse en diferentes áreas de trabajo.
- Los controles positivos contienen un elevado número de copias de la plantilla; deben abrirse y procesarse lejos de muestras del ensayo y de los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre el agua proporcionada en el kit (COVID/Flu Neg /Dnase).
- Al final de cada prueba, limpie las superficies de trabajo y el equipo con un producto para eliminar ADN/ARN.
- Manipule las placas post-amplificación con cuidado y deséchelas inmediatamente después del final de las pruebas; las placas siempre deben desecharse en un recipiente de riesgo biológico adecuado después de su uso.
- Las muestras biológicas deben manipularse como si fueran infecciosas siguiendo las precauciones de bioseguridad adecuadas.
- Los residuos de productos químicos y preparados generalmente se consideran residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos se regula mediante de las leyes y reglamentos nacionales y regionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica del paciente y los síntomas clínicos.
- Un resultado negativo para cualquier prueba de PCR no descarta de manera concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa protectora, use permanentemente guantes desechables sin polvo, use gafas y mascarilla. No coma, beba ni fume en la zona de trabajo.

9. Procedimiento de prueba

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar la prueba. Tenga en cuenta que todos los pasos de pipeteo y el montaje de la placa 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 del experimento, empiece mezclando bien los tubos de reacción suministrados, centrifúguelos durante 5 segundos para recoger el contenido en la parte inferior del tubo y ponga los tubos sobre hielo. **Recomendamos encarecidamente el pipeteo de los controles positivos 1 y 2 de COVID-19 & Flu A/B en último lugar para evitar contaminaciones cruzadas.**

9.1. Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de RT-qPCR suficiente como para que el número de pruebas se realice con un volumen adicional del 5% por las posibles pérdidas de pipeteo. Proceda de acuerdo con la tabla siguiente que especifica los volúmenes para las pruebas de 1 y *n* (donde *n* corresponde al número total de reacciones):

Componente	1 prueba volumen (µL)	*n* pruebas volumen + 5% (µL)
COVID-19/Flu MMix (2x)(**)	10	*n* x 10,5
COVID-19/Flu Primer Mix (20x)	1	*n* x 1,05
COVID-19/Flu Probe Mix (20x)	1	*n* x 1,05
Volumen final	**12**	***n* x 12,6**

(*) Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada ensayo, cuente el número de muestras y agregue tres más para los controles Negativo y los dos controles positivos.
(**) Puede aparecer un ligero precipitado en el tubo, especialmente después de varios ciclos de congelación /descongelación. Para garantizar un rendimiento óptimo, agite vigorosamente la mezcla de enzimas antes de usarla. En este caso, no centrifugue la mezcla de enzimas antes de pipetear.

2. Pipetee 12 µL de la mezcla RT-qPCR en pocillos individuales de acuerdo con su montaje de la placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Para el control negativo, añada 8 µL de NTC en lugar de la plantilla de ARN en el pocillo de control negativo. El volumen final debe ser de 20 µL.
4. Para las muestras biológicas, agregue 8 µL de cada muestra de ARN en los pocillos de COVID-19/Flu, de acuerdo con el montaje de la placa experimental. El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.
5. Para los dos controles positivos, añada 8 µL de COVID-19/Flu Pos 1 (detecta SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 y genes RP humanos) y 8 µL de COVID-19/Flu Pos 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 y genes RP humanos) en lugar de la plantilla de ARN en los pocillos de control positivo. El volumen final debe ser de 20 µL.
6. Cubra y selle la placa con una película adhesiva óptica adecuada antes de continuar con la RT-qPCR y los pasos de detección.
7. Coloque la placa de reacción en el aparato PCR en tiempo real y ejecute el protocolo RT-qPCR 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 diferentes protocolos específicos de cada aparato.

Opciones de ejecución RT-PCR sugerida

Ciclos	temperatura	Hora	paso
1	50 °C	20 min	Transcripción inversa
1	95 °C	3 min	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	1 min s	Hibridación/Extensión

*Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante este paso a través de los canales Texas Red™/JUN, FAM™ y HEX™/VIC®.

Marcadores fluorescentes y canales de detección

Dianas	Fluoróforo
RdRp & N (SARS-CoV-2)	Texas Red®
Flu A M1 (Influenza A)	FAM™
Flu B NS2 (Influenza B)	FAM™
RNase P	HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 1	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 2	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®

El Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech fue validado para los siguientes aparatos de PCR en tiempo real: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario mediante muestras caracterizadas anteriores (tanto positivas como negativas).

10. Análisis de datos

10.1. Criterios de validación de la prueba

El análisis de datos es realizado por el software del aparato. Teniendo en cuenta las diferencias de rendimiento en diferentes aparatos de PCR en tiempo real, los umbrales para las tres señales de fluorescencia (TexasRed, FAM y HEX) son determinados automáticamente por el software, con ajustes manuales en caso de que sea necesario. Antes de analizar los resultados de las muestras, se recomienda verificar si la prueba de PCR en tiempo real es válida. Por lo tanto, para cada placa, confirme si los resultados de los controles positivos y negativos se realizaron según lo previsto, de acuerdo con los siguientes criterios:

Controles positivos: la amplificación del gen FAM (Influenza B in Control 1 e Influenza A in Control 2), Texas Red (gen SARS-CoV-2 ORF1ab en el gen Control 1 y N en control 2) y las curvas HEX/VIC (RNase P) son positivas. Se espera que los controles positivos se amplifiquen en Cts < 32, en los tres canales. No cumplir este criterio de control de calidad es indicativo de que el experimento se ha visto comprometido.

Control negativo (sin reacción de plantilla): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene curvas de amplificación (TexasRed, FAM y HEX/VIC) con una forma sigmoidal, puede haberse producido contaminación de la muestra. Repita la prueba siguiendo buenas prácticas de RT-qPCR.

Si los controles son según lo esperado, la prueba es **válida.** Proceda con la interpretación de los resultados de las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no presenta el rendimiento esperado, el ensayo se comprometió o ejecutó incorrectamente y debe considerarse **inválido.**
Por favor, repita la prueba
Si el problema persiste, póngase en contacto con el fabricante

10.2. Interpretación de los resultados de las pruebas

El SARS-CoV-2 se detecta si la curva de amplificación TexasRed muestra una forma sigmoidal con un Ct≤35, independientemente del resultado obtenido para el ensayo RNase P (HEX/VIC).

Se detecta gripe A y/o gripe B si la curva de amplificación FAM muestra una forma sigmoidal con un Ct≤35, independientemente del resultado obtenido para el ensayo RNase P (HEX/VIC).

Las curvas SARS-CoV-2 e Influenza A y/o Influenza B no se **detectan** si las curvas TexasRed y FAM no amplifican o lo hacen con un Ct>35, mientras que el ensayo RNase P (HEX/VIC) muestra una curva sigmoidal positiva (Ct≤40).

La **prueba no es válida** si los ensayos SARS-CoV-2, Influenza A/B y RNase P son negativos. El ensayo debe repetirse con ácido nucleico re-purificado a partir de la muestra.

En la tabla siguiente se resume la interpretación de los resultados principales (evalúe la forma general de las curvas de amplificación; **sólo las curvas de amplificación sigmoidal son indicativos de la verdadera amplificación).**

Resultado del SARS-CoV-2 (TexasRed)	**Resultado de la gripe A/B** (FAM)	**Resultado de RNase P** (HEX)	**Interpretación de resultados**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 detectó → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 detectó → POSITIVO**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**Influenza A/B detectada → POSITIVO**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**Influenza A/B detectada → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B detectadas → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B detectadas → POSITIVO**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B no detectadas → NEGATIVO**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**Prueba no válida, repetir la extracción y la prueba**

Nota 1: NZYTech recomienda repetir el análisis de todas las muestras que muestren una curva ambigua o atípica que no permita una interpretación clara.

Nota 2: La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.

• Aunque el riesgo de resultados negativos falsos se reduce debido al diseño de doble diana de la presente prueba, los resultados falsos negativos pueden ser causados por:

- Recogida, manipulación y/o almacenamiento inadecuado de la muestra.
- Muestra fuera de la fase virémica.
- No seguir los procedimientos de este manual.
- Uso de kit de extracción no autorizado o de la plataforma de PCR en tiempo real.

• Los resultados falsos positivos pueden ser causados por:

- Manejo inadecuado de muestras que contienen alta concentración de ARN viral.
- Manejo inadecuado de los controles positivos.
- Manejo inadecuado del producto amplificado (placa post-amplificación).

Los resultados negativos no impiden la infección y el resultado de la prueba no debe utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de gestión del paciente. Además, esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos o virales.

11. Evaluación del rendimiento

Este rendimiento del kit fue validado para los aparatos especificados en la sección 9.2 (véase más arriba). Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario mediante muestras anteriormente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

11.1. Resultados Previstos

Las gráficas de amplificación típicas observadas para muestras negativas clínicas (Figura 1A) o muestras de pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Figura 1B), Gripe A y/o Gripe B (Figura 1C), o ambas (Figura 1D), se presentan en la Figura 1.

11.2. Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como la concentración más baja de analito que podría detectarse de forma fiable con un 95% de confianza. Esto se evaluó mediante pruebas de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B en diferentes números de copia, individualmente o añadidos al ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando 3 lotes de kit diferentes siguiendo de las condiciones típicas de reacción de las pruebas. Las pruebas se repitieron durante 4 días, produciendo 48 réplicas para cada concentración probada. En conjunto, los datos revelaron que el Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech detecta 0,25 copias/µL de SARS-CoV-2, 0,75 copias/µL de gripe A y 1,25 copias/µL de ARN de gripe B con una confianza ≥95%. Así, se determinó que el límite provisional de detección (LoD) era de 0,25 copias/µL o 250 copias/ml

para el SRAS-CoV-2, 0,75 copias/µL o 750 copias/ml para la gripe A y 1,25 copias/µL o 1250 copias/ml para la gripe B. El LoD profesional fue confirmado por dos operadores diferentes que utilizaron tres lotes de kit en un experimento con un total de 48 réplicas de una matriz negativa de hisopo orofaríngeo añadidas de forma independiente. La capacidad del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech para detectar el virus a diferentes cargas se presenta en la Figura 2.

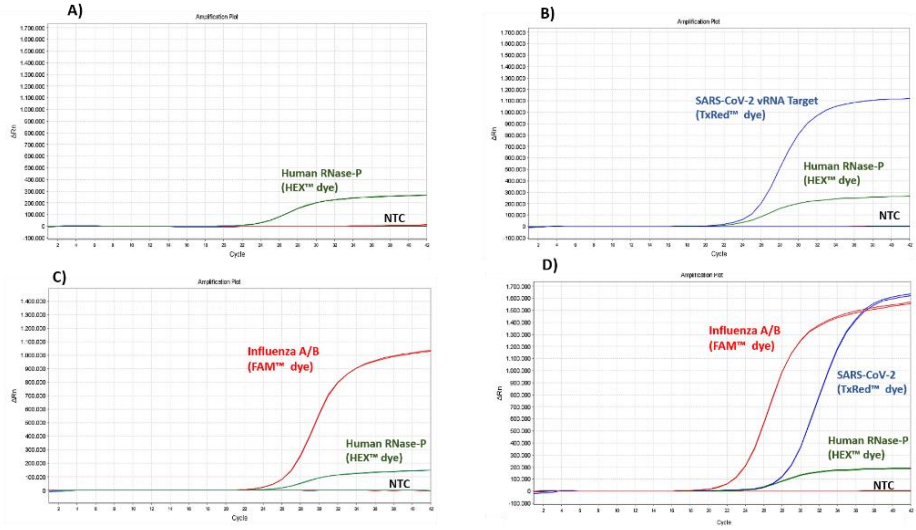

Figura 1. Detección de dianas SARs-CoV-2, gripe A/B y RNase-P humana a partir de muestras clínicas negativas (A) o muestras clínicas infectadas con SARS-CoV-2 (B), gripe A y/o gripe B (C), o tanto SARS-CoV-2 como gripe A/B (D). Curva azul, detección de las dianas de ARNv SARS-CoV-2 a través del canal Texas Red™. Curva roja, detección de las dianas de gripe A y/o gripe B a través del canal FAM™. Curva verde, detección del gen humano RNase P a través del canal HEX™.

La sensibilidad analítica del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech en el contexto de un escenario de coinfección se evaluó mediante la realización de una serie de experimentos de diluciones seriadas utilizando muestras simuladas de coinfección para cada una de las dos dianas virales. Para crear las muestras simuladas de coinfección, se añadieron exactamente 10^4 copias de ácidos nucleicos de la gripe A y 10^4 copias de ácidos nucleicos de la gripe B a la curva estándar SARS-CoV-2. Por el contrario, se añadieron 10^4 copias de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 a las curvas estándar de gripe A y B. Se probaron muestras cuadruplicadas de tres lotes de kit (haciendo un total de 12 réplicas por dilución) con el Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech para determinar la sensibilidad del ensayo cuando hay múltiples objetivos virales presentes en una muestra. Los datos revelaron que el LoD del SRAS-CoV-2 y la Gripe A no se vieron alterados en caso de coinfección. Sin embargo, el LoD de la gripe B cambió a 1,75 copias/µL o 1750 copias/ml en caso de infección.

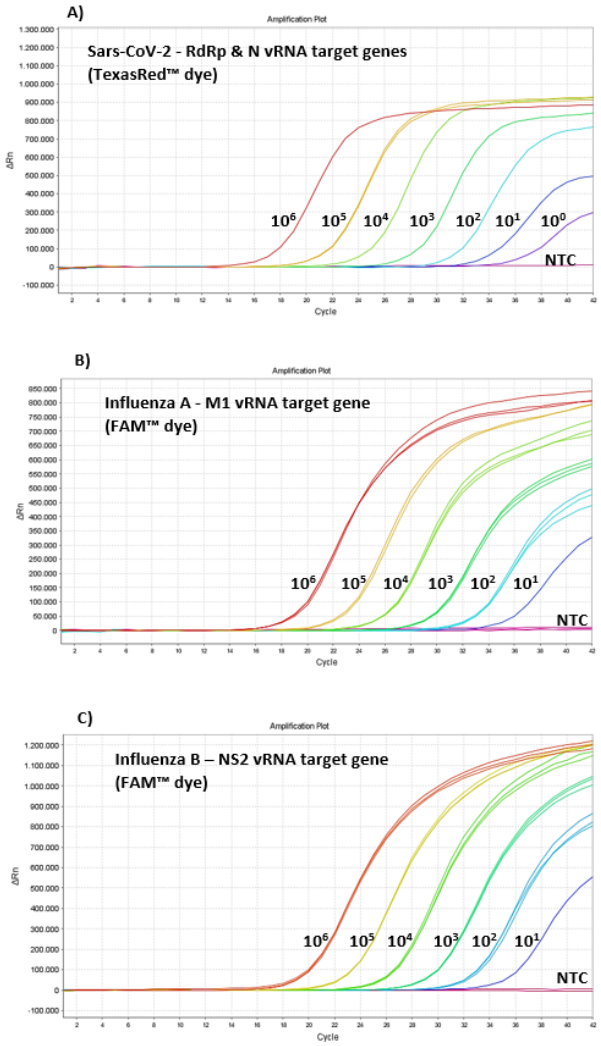

Figura 2. Sensibilidad del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech. Gráfica de amplificación (número de ciclos *frente a* fluorescencia - ΔRN) de diluciones seriadas 1:10 del SARS-CoV-2 (A), Influenza A (B) e Influenza B (C) ARNv. NTC, Sin control de plantilla (control negativo).

11.3. Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica

La inclusividad y la reactividad cruzada se evaluaron mediante el análisis *in silico* de sondas y primers contra patógenos relacionados con el SARS-CoV-2, la gripe A y la gripe B y patógenos normales que causan infección con síntomas similares, respectivamente. Tras el análisis *in silico,* se encontró que el diseño del ensayo detectaba todas las cepas del virus SARS-CoV-2, influenza

A e influenza B y no mostraba reactividad con especies no relacionadas. Además del análisis *in silico,* se realizó en ácidos nucleicos de microbios comunes de las vías orales y respiratorias, incluyendo *Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiota Cloacaron*, *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 patógenos probados por el Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech generó una señal de amplificación detectable.

11.4. Precisión

La precisión del ensayo para el Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech se determinó mediante la repetición de pruebas de muestras positivas que representaban dos niveles de carga viral, 200 (baja carga viral) y 2000 copias (carga viral media) por reacción, aumentadas en ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando 3 lotes de kit diferentes y siguiendo condiciones de prueba típicas. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación de Cq y el % de detección de réplicas, como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en las tres tablas (una para cada caso) que se muestran a continuación.

11.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un operador mediante el análisis de 12 réplicas de cada muestra (200 y 2000 copias por reacción), lo que representa un número final de 24 pruebas realizadas por diana.

11.4.2. Reproducibilidad diaria

La reproducibilidad diaria fue evaluada por un operador mediante el análisis de 48 réplicas de cada muestra (200 y 2000 copias por reacción), durante 4 días, con 12 réplicas de cada concentración por día (se realizaron un total de 96 ensayos por diana).

11.4.3. Reproducibilidad de lote a lote

La reproducibilidad entre lotes fue evaluada por un operador a través del análisis de 60 réplicas de cada muestra (200 y 2000 copias por reacción) utilizando 3 lotes de kit diferentes con 20 réplicas por lote.

11.4.4. Reproducibilidad del operador

La reproducibilidad del operador se evaluó probando 24 réplicas de cada muestra (200 y 2000 copias por reacción), por cuatro operadores diferentes con 6 réplicas por operador y por carga viral, haciendo un total de 36 réplicas por operador, incluidos las 3 dianas de kit.

Precisión del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech, al detectar la **diana SARS-CoV-2.**

Variable		SARS-CoV-2 (Copias/Reacción)	
		200	**2000**
Repetibilidad	N	12	12
	Cq medio	28,87	26,35
	Coeficiente de Variación (%)	0,95	1,92
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad diaria	N	48	48
	Cq medio	28,862	25,88
	Coeficiente de Variación (%)	2,15	2,77
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad de lote a lote	N	60	60
	Cq medio	28,86	25,97
	Coeficiente de Variación (%)	1,97	2,71
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad del operador	N	24	24
	Cq medio	28,87	25,68
	Coeficiente de Variación (%)	2,54	2,20
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad en aparatos	N	24	24
	Cq medio	29,83	26,89
	Coeficiente de Variación (%)	3,29	2,46
	% Detección de réplicas	100	100

Precisión Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech, al detectar **la diana de la gripe A.**

Variable		Gripe A (copias/reacción)	
		200	**2000**
Repetibilidad	N	12	12
	Cq medio	30,47	26,46
	Coeficiente de Variación (%)	0,82	0,53
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad diaria	N	48	48
	Cq medio	30,75	26,51
	Coeficiente de Variación (%)	1,39	1,13
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad de lote a lote	N	60	60
	Cq medio	30,69	26,61
	Coeficiente de Variación (%)	1,35	1,13
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad del operador	N	24	24
	Cq medio	30,79	26,61
	Coeficiente de Variación (%)	1,55	1,06
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad en aparatos	N	24	24
	Cq medio	30,00	26,07
	Coeficiente de Variación (%)	1,76	1,63
	% Detección de réplicas	100	100

Precisión del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech, al detectar **la diana de la gripe B.**

Variable		Gripe B (Copias/Reacción)	
		200	**2000**
Repetibilidad	N	12	12
	Cq medio	30,72	26,82
	Coeficiente de Variación (%)	0,81	1,08
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad diaria	N	48	48
	Cq medio	30,78	26,82
	Coeficiente de Variación (%)	1,14	3,05
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad de lote a lote	N	60	60
	Cq medio	30,76	26,82
	Coeficiente de Variación (%)	1,08	2,77
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad del operador	N	24	24
	Cq medio	30,87	26,71
	Coeficiente de Variación (%)	1,11	0,73
	% Detección de réplicas	100	100
Reproducibilidad en aparatos	N	24	24
	Cq medio	30,15	26,34
	Coeficiente de Variación (%)	2,01	2,04
	% Detección de réplicas	100	100

11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos

La reproducibilidad entre aparatos fue medida por un operador mediante pruebas de 36 réplicas de cada muestra (200 y 2000 copias por reacción), en dos aparatos de qPCR diferentes (Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5), en un total de 72 pruebas por muestra.

11.5. Evaluación clínica

Un laboratorio externo evaluó el rendimiento del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech, con muestras clínicas respiratorias recogidas. En total, se han analizado 250 muestras clínicas. El panel incluyó 60 muestras positivas SARS-CoV-2, 36 muestras positivas al virus Influenza AH1, 36 muestras positivas al Virus Influenza AH3, 58 muestras positivas al virus Influenza B y 60 muestras negativas, previamente analizadas. Los datos revelaron una coincidencia del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas.

12. Control de calidad

Todos los componentes del Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech se probaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de PCR pentaplex en tiempo real permite la detección de dianas descritas para la identificación de ARN viral SARS-CoV-2 (genes RdRp y N), ARN viral de gripe A/B (M1) y NS2,

respectivamente), así como RNasa P humana (gen RP). Se observan amplificaciones positivas para genes diana, control positivo y controles internos a través de los canales Texas Red™, FAM™ y HEX™/VIC®, de acuerdo con los respectivos fluoróforos del conjunto primer/sonda.

13. Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, puede ponerse en contacto con nuestro equipo de soporte técnico 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 comerciales que aparecen en este manual son propiedad de sus respectivos propietarios.

15. Explicación de los símbolos

IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*		Consultar 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 primer/sonda)
CONTROL –	Control negativo		

16. Declaración de conformidad

Nombre del producto: Kit de detección por RT-qPCR multiplex en un solo paso para COVID-19 & Flu A/B, (IVD) de NZYTech.

Número de catálogo: MD04861.

Uso previsto: Detección cualitativa del SARS-CoV-2, Gripe A y Gripe B.

Fabricante: NZYTech - Genes & Enzimas,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edificio 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 la 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 mantiene 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

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 March 2020. Available online at https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17 March 2020. Available online at 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