Kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD

REF MD04911, 96 reacciones
MD04912, 4 × 96 reacciones

***Exclusivamente para diagnóstico profesional* in vitro.**

CE IVD

ES

Instrucciones de uso (IDU)

IM-007es

VERSIÓN 03/2022, Septiembre 2022

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 5
5. Condiciones para almacenamiento, estabilidad y manipulación 5
6. Materiales y instrumentos necesarios pero no suministrados 5
7. Recogida y preparación de las 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 la prueba 7
    9.1 Configuración de la reacción 7
    9.2 Programación del instrumento de PCR en tiempo real 8
10. Análisis de datos 9
    10.1 Criterios de validación de la prueba 9
    10.2 Interpretación de los resultados de la prueba 10
11. Evaluación del rendimiento 12
    11.1 Resultados previstos 12
    11.2 Umbral de detección (LoD) - Sensibilidad analítica 12
    11.3 Inclusividad, reactividad cruzada y sustancias interferentes 13
    11.4 Precisión 14
    11.5 Evaluación clínica 16
12. Control de calidad 16
13. Asistencia técnica 16
14. Marcas y descargos de responsabilidad 16
15. Explicación de los símbolos 17
16. Declaración de conformidad 18
17. Bibliografía 19

1. Introducción

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), anteriormente denominado 2019-nCoV, es el agente causante de la actual enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y pertenece al género Betacoronavirus de la familia de los coronavirus, al igual que el coronavirus del SARS, con el que está estrechamente relacionado. 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, 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 para poder proporcionar un tratamiento rápido a los pacientes infectados y así reducir 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 el síndrome de enfermedad respiratoria aguda, disfunción de órganos y la muerte. Con base en el conocimiento actual, una proporción significativa 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 mayores (60 años o más), los fumadores y las personas con enfermedades crónicas, como enfermedades cardíacas o pulmonares, cáncer, diabetes y pacientes con un sistema inmunológico debilitado. Aunque hoy en día ya se dispone de vacunas para controlar el COVID-19, estas no previenen la infección en las poblaciones vacunadas.

2. Uso previsto

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) en tiempo real, destinada a la detección cualitativa rápida de los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en muestras de hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos recogidas de individuos con sospecha de infección por COVID-19. Este kit fue diseñado para permitir una detección robusta y eficiente del virus SARS-CoV-2 capaz de compensar la aparición de variantes con diferencias genéticas significativas con respecto a las variantes de la enfermedad que están actualmente en circulación. El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech, ofrece la capacidad de detectar 5 dianas virales al mismo tiempo, lo que permite que, incluso si una o más dianas fueran inviables debido a las alteraciones genéticas acumuladas en el virus, se pueda obtener un diagnóstico eficaz. Un resultado positivo indica la presencia de ARN de SARS-CoV-2, pero 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 descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como única base para tomar decisiones sobre el tratamiento del paciente. Este kit está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio debidamente capacitado, especialmente en lo que respecta a las técnicas de PCR en tiempo real y al diagnóstico *in vitro*.

3. Principios del ensayo

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, 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 instrumentos de PCR en tiempo real más

comunes (véanse las especificaciones de los instrumentos necesarios en la **Sección 6**). Este kit de NZYTech tiene como objetivo regiones específicas del genoma del SARS-CoV-2, en particular, el gen de la ARN polimerasa dependiente del ARN viral (RdRp), el gen de la fosfoproteína de la nucleocápside (N) y una región específica en el gen de la proteína estructural de la envoltura (E), que está presente en todos los genomas de *Sarbecovirus* (incluido el virus del SARS-CoV-2). Todas las secuencias diana fueron seleccionadas para proporcionar la mayor sensibilidad de detección. Los cebadores y sondas tienen un 100 % de homología con >95 % de las >5 M de secuencias del genoma disponibles en la base de datos GISAID, hasta mayo de 2022, incluyendo la identidad completa con las variantes Delta (B.1.617.2) y Omicron (B.1.1.529). Además, los cebadores y las sondas cuyo objetivo es el SARS-CoV-2 no muestran una homología significativa con genomas no relacionados, lo que hace que esta prueba sea altamente específica, ya que no hay reactividad cruzada con ácidos nucleicos de otros organismos virales y bacterianos respiratorios. Se incluye un control interno para confirmar la extracción eficiente del ARN de muestras biológicas humanas, así como la ausencia de inhibidores de la PCR, entre otros. Además, la prueba utiliza tres controles externos (dos controles positivos de bajo título suministrados con el kit y un control negativo), tal como se describe a continuación. El Control Positivo 1 del SARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP consiste en fragmentos de ácido nucleico que contienen tres secuencias diana del genoma del SARS-CoV-2, localizadas en regiones específicas de los genes RdRp, N y E, y una secuencia diana localizada en el gen de la RNasa P (RP) humana. El Control Positivo 2 del SARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP consiste en fragmentos de ácido nucleico situados en los mismos genes indicados para el Control Positivo 1 del SARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP, pero que contienen distintas secuencias diana dentro de esos genes, y una secuencia diana situada en el gen de la RNasa P (RP) humana. La evolución natural del SARS-CoV-2 implica que se dispondrá de nueva información sobre la secuencia posterior al diseño inicial de este kit, lo que refleja estrategias de adaptación del SARS-CoV-2. Por lo tanto, NZYTech revisará periódicamente las cinco dianas genómicas del SARS-CoV-2 y, si es necesario, lanzará nuevas versiones de este kit.

La RT-qPCR en un solo paso sigue siendo el método más fiable y eficaz para realizar una detección precisa del ARN del SARS-CoV-2, que es indicativo de una infección en humanos. El ARN aislado y purificado a partir de muestras infectadas se retrotranscribe a ADNc y se amplifica posteriormente en una sola reacción, utilizando cinco conjuntos de cebadores/sonda altamente específicos que utilizan el denominado principio TaqMan®. Para permitir la identificación de la amplificación de las seis dianas específicas en una sola reacción, las sondas específicas de los genes RdRp, N y E del SARS-CoV-2 y de la RP humana están marcadas de manera diferente, con fluoróforos HEX™, FAM™, Texas Red™ y Cy5™, respectivamente. Este kit consiste en un ensayo hexaplex en cuatro canales ópticos distintos: dos dianas localizadas en el gen RdRp se detectan en HEX (alternativamente VIC o JOE), dos dianas localizadas en el gen N se detectan en FAM, una diana localizada en el gen E (presente en todos los *Sarbecovirus*) se detecta en Texas Red (alternativamente JUN), y la diana endógena humana se detecta en Cy5. Nótese que este panel incluye cuatro secuencias diana de SARS-CoV-2 que emiten fluorescencia detectada en dos canales, lo que permite aumentar la robustez y la sensibilidad de la detección de SARS-CoV-2. Además, los cebadores y las sondas se suministran en concentraciones optimizadas con el fin de asegurar que la amplificación del ARNm humano, incluso cuando está presente en concentraciones muy elevadas, no limite la eficacia de los conjuntos de cebadores/sonda del SARS-CoV-2.

4. Composición del kit

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, 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**	
			MD04911	**MD04912**
SARS-CoV-2 MMix III (RdRp, N y E)	Mezcla maestra para sondas para RT-qPCR en un solo paso, NZYSupreme Multiplex (2x)	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N y E)	SARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP PPMix III (10x)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N y E)	Control positivo 1 para CSARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP	105 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N y E)	Control positivo 2 para CSARS-CoV-2 (RdRp, N y E)/RP	105 µL	1	4
NTC	Control sin molde	105 µL	1	4

5. Condiciones para el almacenamiento, estabilidad y manipulación

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, se envía refrigerado. Todos los componentes deben almacenarse a una temperatura entre -85 °C y -15 °C, inmediatamente después de su recepción. Cuando se utilicen, los componentes del kit se deben volver a colocar en el congelador inmediatamente después de su uso para minimizar el tiempo que permanecen a temperatura ambiente. También se deben considerar las siguientes indicaciones:

- Reduzca al mínimo el número de ciclos de congelación y descongelación usando un almacenamiento en alícuotas de trabajo. Si procede, se pueden dividir los componentes del kit en alícuotas más pequeñas, después de la descongelación.
- La mezcla de cebadores/sonda SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N y E) se debe almacenar protegida de la luz. En particular, no exponga la mezcla SARS-CoV-2 MMix III (RdRp, N y E) a la luz solar directa después de combinarla con la mezcla de cebadores/sonda SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N y E).
- Si el embalaje que protege el kit llegara dañado, póngase en contacto con NZYTech.
- Respete la fecha de caducidad indicada en el embalaje. NZYTech no recomienda utilizar el kit después de la fecha de caducidad. Cuando se llegue a esta fecha, el kit se debe desechar siguiendo las instrucciones de eliminación indicadas en la **Sección 8.2**.

6. Materiales y instrumentos necesarios pero no suministrados

- Instrumento de PCR en tiempo real que detecte los colorantes fluorescentes FAM™, HEX™/VIC™/JOE™, Texas Red®/JUN™ y Cy5™ (a longitudes de onda de emisión de 520, 556, 603 y 670 nm, respectivamente). En la **Sección 11** se presentan los modelos de instrumentos para los que se ha validado el kit.
- Equipo y consumibles para aislar el ARN viral de las muestras respiratorias.
- Elementos de plástico para qPCR libres de RNasa/DNasa: tubos de PCR, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas.

- Pipetas y puntas con filtro (libres de RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vórtex y centrífuga.

7. Recogida y preparación muestras

Hay diferentes factores que son fundamentales para conseguir resultados óptimos, entre ellos se destaca el protocolo utilizado para la obtención de muestras respiratorias humanas (hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos), el transporte, almacenamiento y tiempo de procesamiento de las muestras. Las muestras recogidas se deben analizar lo antes posible. Las muestras se deben transportar y almacenar a bajas temperaturas, de acuerdo con las normas de bioseguridad. El ARN o los ácidos nucleicos totales extraídos siguiendo un protocolo IVD son el material de partida para el kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech. Asegúrese de que las muestras de ARN son adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad de los ácidos nucleicos. Por lo general, una relación $A_{260/280}$ de ~2 se considera aceptable para el ARN puro. Dado que el etanol es un potente inhibidor de PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo por completo antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. El kit de NZYTech incluye una reacción de control interno de la extracción de ARN cuya diana es el ARN humano, que se copurifica con el ARN viral. El ARN humano se amplifica con el conjunto de cebadores/sonda de la RNasa P (RP). Esto es útil para comprobar la eficiencia del aislamiento del ARN o la presencia de inhibidores durante el procesamiento de la muestra.

8. Precauciones y advertencias

Igual que en todo procedimiento de pruebas analíticas, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales. Siga con atención los procedimientos y directrices que se proporcionan en este manual para asegurarse de que la prueba se realice correctamente. Cualquier desviación de los mismos puede provocar el fracaso del ensayo o dar lugar a la obtención de resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado 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 Ficha de Datos de Seguridad (SDS, por sus siglas en inglés) que está disponible en la página web de NZYTech (www.nzytech.com). La detección del virus SARS-CoV-2 solo debe ser llevada a cabo por personal debidamente capacitado en lo relativo a los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes y en laboratorios debidamente equipados. Las directrices internacionales y nacionales sobre bioseguridad en el laboratorio deberán aplicarse bajo cualquier circunstancia.

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 sellado del kit está dañado.
- No intercambie los reactivos de distintos lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes con los reactivos de este kit de prueba.
- Se deben utilizar utensilios de plástico y pipetas desechables libres de DNasa/RNasa en todos los procedimientos.

- Utilice puntas de filtro libres de DNasa/RNasa durante todo el protocolo para evitar la contaminación por aerosoles y líquidos.
- La preparación de la muestra, la configuración de la reacción y la amplificación se deben realizan en distintas zonas de trabajo.
- Los controles positivos contienen un gran número de copias del ARN, por lo que deben abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y de los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre el tubo del NTC suministrado en el kit para preparar la reacción de control sin ARN.
- Al final de cada prueba, limpie las superficies de trabajo y el equipo con una solución para eliminar el ADN/ARN.
- Manipule con cuidado las placas post-amplificación y deséchelas inmediatamente una vez realizado el análisis. Después de usarlas, las placas siempre se deben desechar en un contenedor de residuos biológicos adecuado.
- Las muestras biológicas se deben manipular 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 está regulada mediante leyes y reglamentos locales y nacionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud teniendo en cuenta la historia clínica del paciente y los síntomas clínicos.
- Esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos.
- El resultado negativo de cualquier prueba de PCR no descarta de forma concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, utilice prendas de protección, lleve permanentemente guantes desechables sin polvo, use mascarilla y gafas de protección. Absténgase de comer, beber y fumar en el área de trabajo.

9. Procedimiento de la prueba

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar el ensayo. Tenga en cuenta que todos los pasos de pipeteado y la preparación de las placas para el ensayo deben realizarse sobre hielo. Una vez efectuado el vertido en la placa, comience inmediatamente con el protocolo de RT-PCR en un solo paso. La incubación prolongada de las mezclas de reacción a temperatura ambiente puede dar lugar a interferencias de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes del experimento, empiece a mezclar suavemente los tubos de reacción suministrados, centrifugue durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo y coloque los tubos sobre hielo. **Recomendamos encarecidamente que el pipeteo de los controles positivos 1 y 2 de SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N y E) y SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N y E) se realice en último lugar para evitar contaminaciones cruzadas.**

9.1 Configuración de la reacción

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

Componente	Volumen (µL) para 1 prueba	Volumen+5 % (µL) para *n* pruebas (*)
SARS-CoV-2 MMix III (RdRp, N y E) (**)	10	*n* × 10,5
SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N y E)	2	*n* × 2,1
Volumen final	**12**	***n* × 12,6**

(*) Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada ensayo, cuente el número de muestras y añada tres más para el Control sin molde y los controles Positivos (2), respectivamente.
(**) Tenga en cuenta que puede observarse un precipitado en el fondo del tubo de mezcla maestra, en particular después de múltiples ciclos de congelación/descongelación. Una vez descongelada la mezcla maestra, vuelva a suspenderla antes de utilizarla. En este caso, no centrifugue la mezcla maestra antes de pipetear.

2. Pipetee 12 µL de la mezcla de RT-qPCR en pocillos individuales de acuerdo con la configuración de la placa para el experimento de PCR en tiempo real.

3. Para el control sin molde (control negativo), añada 8 µL de NTC en lugar de la plantilla de ARN en el pocillo del control sin molde. El volumen final debe ser de 20 µL.

4. Para las muestras biológicas, añada 8 µL de cada muestra de ARN en los pocillos de muestra, de acuerdo con la configuración de la placa para el experimento. El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.

5. Para los dos controles positivos, añada 8 µL de SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N y E) y 8 µL de SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N y E), en lugar de la plantilla de ARN, en los pocillos del control positivo. El volumen final debe ser de 20 µL.

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

7. Coloque la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real y efectúe el protocolo de RT-qPCR siguiendo las indicaciones de la siguiente sección.

9.2 Programación del instrumento de PCR en tiempo real

En la siguiente tabla se muestra un protocolo estándar optimizado para realizar la prueba de SARS-CoV-2/RP utilizando el kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, en las plataformas que se mencionan a continuación.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
1	50 °C	10 min	Transcripción inversa
1	95 °C	2 min	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	60 s	Hibridación/extensión*

**Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado. Capture las señales a través de los canales FAM, HEX/JOE/VIC, Texas Red/JUN y Cy5.*

Colorantes fluorescentes/canales de detección

Diana	Colorante fluorescente	Canales de detección
SARS-CoV-2, gen RdRp	HEX™	HEX/VIC/JOE
SARS-CoV-2, gen N	FAM™	FAM
SARS-CoV-2, gen E	Texas Red®	Texas Red/JUN
Gen RNasa P	Cy5™	Cy5

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech ha sido validado para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el usuario debe validar el kit utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

10. Análisis de datos

10.1 Criterios de validación de la prueba

La detección del ARN del SARS-CoV-2 se realiza mediante la detección de cinco regiones del genoma viral, en tres canales de fluorescencia (FAM, HEX y Texas Red), y el control de RP humana en un cuarto canal (Cy5). El software del instrumento realiza el análisis de los datos. Teniendo en cuenta las diferencias de rendimiento en diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, los umbrales para las cuatro señales de fluorescencia (FAM, HEX, Texas Red and Cy5) 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 son los esperados, de acuerdo con los siguientes criterios:

Controles positivos: las curvas de amplificación de HEX (dos dianas para el gen RdRp de SARS-CoV-2) FAM (dos dianas para el gen N de SARS-CoV-2), Texas Red (una diana para el gen E de SARS-CoV-2) y Cy5 (para el gen de la RP) son positivas. Se espera que los controles positivos amplifiquen a un Ct<32, en los cuatro canales. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es un fuerte indicio de que el experimento se ha visto comprometido.

Control negativo (NTC): no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene curvas de amplificación (HEX, FAM, Texas Red y Cy5) de forma sigmoidal, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Repita la prueba siguiendo las buenas prácticas de RT-qPCR.

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

Si alguno de los controles no muestra el comportamiento esperado, el ensayo se ha visto comprometido o se ha efectuado de manera incorrecta y se debe considerar **inválido**. **Repita la prueba.** *Si el problema persiste, póngase en contacto con el fabricante.*

10.2 Interpretación de los resultados de la prueba

El kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech utiliza los siguientes valores de corte del umbral de ciclos (Ct) para la interpretación de los resultados:

Valor de Ct	Interpretación de los resultados
Ct ≤36, Amplificación	**Detectado (+) → POSITIVO**
Ct>36, Sin amplificación	**No detectado (-) → NEGATIVO**

El SARS-CoV-2 se detecta si las curvas de amplificación de HEX, FAM y Texas Red muestran una forma sigmoidal con un Ct <35, independientemente del resultado obtenido para el ensayo de RP (Cy5).

El **SARS-CoV-2 se detecta** si las curvas de amplificación de HEX y FAM muestran una forma sigmoidal con un CT .≤36, independientemente del resultado obtenido para los ensayos del gen E (Texas Red) y RP (Cy5).

El SARS-CoV-2 se detecta si las curvas de amplificación de HEX y Texas Red muestran una forma sigmoidal con un CT .≤36, independientemente del resultado obtenido para los ensayos del gen N (FAM) y RP (Cy5).

El SARS-CoV-2 se detecta si las curvas de amplificación de FAM y Texas Red muestran una forma sigmoidal con un CT .≤36, independientemente del resultado obtenido para los ensayos del gen RdRp (Texas Red) y RP (Cy5).

El SARS-CoV-2 no se detecta si las curvas de FAM, HEX y Texas Red no son positivas (Ct >36), mientras que el ensayo de RNasa P (Cy5) muestra una curva sigmoidal positiva (Ct ≤40).

La prueba no es concluyente para la detección del SARS-CoV-2 si solo una curva de amplificación (FAM, HEX o Texas Red) muestra una forma sigmoidal con un Ct ≤36, mientras que las demás dianas del SARS-CoV-2 son negativas, independientemente del resultado obtenido en el ensayo de RP (Cy5). La prueba debe repetirse con ácido nucleico repurificado de la muestra.

La prueba no es válida si ambos ensayos de SARS-CoV-2 y RP son negativos. La prueba debe repetirse con ácido nucleico repurificado de la muestra.

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

SARS-CoV-2 Gen RdRp, (HEX)	**SARS-CoV-2** Gen N, (FAM)	**SARS-CoV-2** Gen E, (Texas Red)	**RP** Gen RP, (Cy5)	**Interpretación de los resultados**
+	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO**
+	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO**
+	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO**
-	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado → POSITIVO**
+	-	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado únicamente para una diana → NO CONCLUYENTE**
-	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado únicamente para una diana → NO CONCLUYENTE**
-	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 detectado únicamente para una diana → NO CONCLUYENTE**
-	-	-	+	**SARS-CoV-2 no detectado → NEGATIVO**
-	-	-	-	**La prueba no es válida; repita la extracción y la prueba**

**Una alta concentración/carga de ARN viral detectable en la muestra puede conducir a la reducción o ausencia de señales de control (RP, Cy5).*

Nota: NZYTech recomienda repetir el análisis de todas las muestras que muestren una curva ambigua o atípica que no permita una interpretación clara. La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.

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

- Recogida, manipulación o almacenamiento inadecuados de las muestras.
- Muestra fuera de la fase vírica.
- No seguir los procedimientos indicados en este manual.
- Uso de un kit de extracción o plataforma de PCR en tiempo real no autorizados.

Los resultados falsos positivos pueden ser causados por:

- Manejo inadecuado de muestras que contienen alta concentración de ARN viral de SARS-CoV-2.
- Manejo inadecuado de los controles positivos de SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N y E) y POS 2 (RdRp, N y E).
- Manejo inadecuado del producto amplificado (placa de post-amplificación)

Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como única base para tomar decisiones sobre el tratamiento u otras decisiones sobre la gestión del paciente. Además, esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos o virales.

11. Evaluación del rendimiento

Se evaluó el rendimiento del kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech en los sistemas de PCR en tiempo real Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el usuario debe validar el kit utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

11.1 Resultados previstos

En la Figura 1 se presentan dos gráficos de amplificaciones típicas, observadas para muestras clínicas que contenían ácidos nucleicos del SARS-CoV-2. Los casos representan ejemplos de muestras clínicas que presentan cargas altas (panel A) o medias (panel B) de SARS-CoV-2. Tenga en cuenta que, en casos de cargas de muy altas de SARS-CoV-2, la curva del canal Cy5, correspondiente al gen de la RNasa P humana, puede estar ausente o mostrar una forma atípica (Figura 1A).

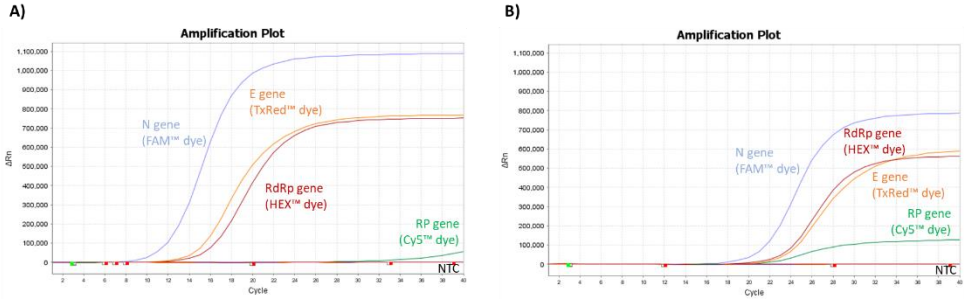

Figura 1. Detección simultánea de dianas de SARS-CoV-2 (genes RdRp, N y E) y RNasa P humana a partir de muestras clínicas positivas con una carga alta (A) y media (B) de SARS-CoV-2. Curva roja: detección de dos dianas de ARN viral del SARS-CoV-2 (gen RdRp) a través del canal HEX; Curva azul: detección de dos dianas de ARN viral del SARS-CoV-2 (gen N) a través del canal FAM; Curva naranja: detección de una diana de ARN viral del SARS-CoV-2 (gen E) a través del canal Texas Red; 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 concentración más baja de analito que se podría detectar de manera fiable con una confianza del 95 %. Para ello, se analizaron los ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en diferentes números de copias añadidos al ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes y siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. Las pruebas se repitieron durante 3 días, produciendo 96 réplicas por cada concentración de SARS-CoV-2 analizada. En conjunto, los datos revelaron que el kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD de NZYTech detecta

0,25 copias/µL o 250 copias/mL del ARN viral del SARS-CoV-2, con una confianza del ≥95 %. El LoD provisional fue confirmado por dos operadores diferentes, utilizando tres lotes del kit, en un experimento con un total de 48 réplicas de una matriz negativa de hisopos orofaríngeos que fueron adicionadas de forma independiente.

11.3 Inclusividad, reactividad cruzada y sustancias interferentes

La inclusividad y la reactividad cruzada se evaluaron mediante análisis *in silico* de las sondas y los cebadores de oligonucleótidos frente a los ácidos nucleicos de los patógenos relacionados con el SARS-CoV-2 y los patógenos normales que causan una infección con síntomas similares, respectivamente. El análisis *in silico* reveló que el diseño del ensayo era capaz de detectar todas las cepas del virus del SARS-CoV-2 y no mostraba ninguna reactividad con otras especies distintas del SARS-CoV-2 Además, se realizó un análisis *in vitro* de reactividad cruzada (exclusividad) para confirmar que el kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, de NZYTech no reacciona con otros microbios colonizadores en humanos y patógenos comúnmente encontrados en muestras clínicas. Este estudio se realizó utilizando un panel comercial de patógenos respiratorios procedente de ZeptoMetrix, especialmente el panel para verificación de patógenos respiratorios, NATtrol™ (# NATRVP-IDI). Este panel incluye muestras representativas de especímenes humanos clínicos reales, incluyendo Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A 2009 H1N1pdm, Influenza B (B/Florida/02/06), Metapneumovirus 8 (Perú 6-2003), Virus Sincitial Respiratorio A, Rinovirus Tipo 1A, Virus de la Parainfluenza Tipo 1, Virus de la Parainfluenza Tipo 2, Virus de la Parainfluenza Tipo 3, Virus de la Parainfluenza Tipo 4, Adenovirus Tipo 3, Coronavirus NL63, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU-1, M. *pneumoniae* M-129, C. *pneumoniae* CWL-029 y *B. pertussis* A639. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Además, se utilizaron otros microbios comunes del tracto oral y respiratorio, incluyendo *Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Burkholderia vietnamiensis, Dickeya dadantii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium mageritense, Mycobacterium smegmatis, Nocardia nova, Pseudomonas mendocina, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces albidoflavus.* Los datos, obtenidos utilizando tres lotes diferentes del kit, confirmaron que ninguno de los organismos analizados interfirió con el funcionamiento del kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech, al generar resultados falsos positivos o una señal poco específica.

Se evaluó el impacto de 17 posibles sustancias interferentes en pruebas con muestras nasofaríngeas negativas a las que se añadieron ejemplares positivos de SARS-CoV-2 con un LoD de ~3x. Las posibles sustancias interferentes se añadieron a las muestras a concentraciones que representaban los niveles más altos esperados en las muestras de las vías respiratorias de pacientes humanos, con base en la bibliografía clínica. Todas las pruebas se realizaron por pentaplicado y los resultados se compararon con los datos obtenidos con una prueba de control que no contenía interferentes. Los resultados revelaron que, con las concentraciones probadas, ninguna de las moléculas analizadas afectaba a la sensibilidad de la detección. En la siguiente tabla se resumen los datos recopilados en estos experimentos. Todos los experimentos se realizaron con el instrumento para PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 FAST.

Posible interferencia	Principio activo	Concentración final en la muestra	Interferencia Sí (S) o No (N)
Agua de mar isotónica (Rhinomer)	NaCl	15 % v/v	N
Aerosol para la garganta, anestésico y analgésico oral (Strepfen)	Flurbiprofeno	5 % v/v	N
Solución de lavado nasal (Aerosol antialérgico - Vibrocil)	Propionato de fluticasona	5 % v/v	N
Corticosteroides nasales en aerosol (Nasomet)	Furoato de mometasona	5 % v/v	N
Corticosteroides nasales en aerosol (Pulmicort)	Budesonida	5 % v/v	N
Antimicrobiano, sistémico (Trobex)	Trobamicina	600 µg/mL	N
Analgésico bucal, antiinflamatorio y antiséptico (Pyralvex)	Extracto de ruibarbo, ácido salicílico	5 % v/v	N
Antifúngico y antibacteriano orofaríngeo tópico (Daktarin)	Miconazol	5 mg/mL	N
Antiséptico bucal en solución (Eludril Ge)	Gluconato de clorhexidina, hemihidrato de clorobutanol	5 % v/v	N
Antitusivo, jarabe (Codipront)	Codeína, citrato de feniltoloxamina	5 % v/v	N
Sangre entera (humana)	-	4 % v/v	N
Medicamento antiviral (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolítico (Mucolsovan)	Clorhidrato de ambroxol	5 % v/v	N
Solución de gotas nasales (Nasarox)	Clorhidrato de oximetazolina	10 % v/v	N
Antibiótico, pomada nasal (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Saliva (humana)	-	25 % v/v	N
Etanol absoluto	Alcohol	5 % v/v	N

11.4 Precisión

La precisión del ensayo para el kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech, se determinó mediante pruebas repetidas de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 que representaban dos niveles de carga viral, 15 (3x LoD) y 150 (30x LoD) copias por reacción (0,75 y 7,50 copias/µL), adicionadas en ARN extraído de muestras orofaríngeas negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes y siguiendo las condiciones típicas de reacción de la prueba. La precisión se evaluó midiendo los ciclos de cuantificación (Cq) promedio, el coeficiente de variación de Cq y el porcentaje de detección de réplicas, tal como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en la tabla que se muestra a continuación.

11.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó mediante un análisis realizado por un operador, con 12 réplicas de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), lo que representa un número final de 24 pruebas realizadas.

11.4.2. Reproducibilidad diaria

La reproducibilidad diaria se evaluó mediante un análisis realizado por un operador, con 36 réplicas de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), durante tres días, con 12 réplicas de cada concentración por día (un total de 72 ensayos realizados).

11.4.3. Reproducibilidad entre lotes

La reproducibilidad entre lotes se evaluó mediante un análisis realizado por un operador, con 36 réplicas de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), utilizando tres lotes de kits diferentes, con 24 réplicas por lote.

Precisión del kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech

Variable analizada		Gen RdRp (Copias/Reacción)		Gen N (Copias/Reacción)		Gen E (Copias/Reacción)	
		15	**150**	**15**	**150**	**15**	**150**
Repetibilidad							
	n	12	12	12	12	12	12
	Media de Cq	32,40	29,07	31,67	28,46	32,89	29,28
	Coeficiente de variación (%)	1,53	1,23	1,94	1,48	2,79	2,24
	Detección de réplicas (%)	100	100	100	100	100	100
Reproducibilidad diaria							
	n	36	36	36	36	36	36
	Media de Cq	32,57	29,56	31,87	28,58	31,95	30,24
	Coeficiente de variación (%)	2,31	2,58	2,51	2,76	3,48	3,22
	Detección de réplicas (%)	100	100	100	100	100	100
Reproducibilidad entre lotes							
	n	36	36	36	36	36	36
	Media de Cq	32,55	29,39	31,77	28,42	32,13	30,03
	Coeficiente de variación (%)	2,25	2,49	2,68	2,30	3,87	3,24
	Detección de réplicas (%)	100	100	100	100	98	100
Reproducibilidad del operador							
	n	36	36	36	36	36	36
	Media de Cq	32,44	29,33	31,88	28,68	32,03	29,66
	Coeficiente de variación (%)	1,56	2,14	1,63	2,24	3,46	3,07
	Detección de réplicas (%)	100	100	100	100	100	100
Reproducibilidad entre instrumentos							
	n	48	48	48	48	48	48
	Media de Cq	33,10	29,96	32,08	29,00	32,90	30,55
	Coeficiente de variación (%)	1,98	1,24	2,68	2,83	4,12	3,87
	Detección de réplicas (%)	100	100	100	100	96	100

11.4.4. Reproducibilidad del operador

La reproducibilidad del analista se evaluó analizando 36 réplicas de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), realizadas por tres operadores diferentes, con 12 réplicas por operador.

11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos

La reproducibilidad entre instrumentos se midió mediante un análisis realizado por un operador, con 48 réplicas de cada muestra (15 y 150 copias por reacción), en cuatro instrumentos de qPCR diferentes (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 96 y Bio-Rad® CFX96™), para obtener un total de 96 pruebas por muestra.

11.5 Evaluación clínica

Un laboratorio externo evaluó el rendimiento del kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech, con muestras de hisopos nasofaríngeos. En total, se analizaron 501 muestras clínicas negativas y 150 clínicas positivas. Los datos revelaron que se alcanzó una sensibilidad del 97,4 % y una especificidad del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas.

12. Control de calidad

Todos los componentes del kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD, de NZYTech, se someten a prueba siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de PCR hexaplex en tiempo real permite la detección de dianas descritas para la identificación del ARN viral del SARS-CoV-2 (genes RdRp, N y E) y del ARNm humano (gen RNasa P, RP). Se observan amplificaciones positivas para los genes diana, los controles positivos y los controles internos a través de los canales FAM, HEX, Texas Red y Cy5, de acuerdo con los fluoróforos de los conjuntos de cebadores/sonda respectivos.

13. Asistencia técnica

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

14. Marcas y descargos de responsabilidad

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

15. Explicación de 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: Kit III de detección por RT-qPCR en un solo paso para 5 dianas de SARS-CoV-2, IVD

Número de catálogo: MD04911 y MD04912.

Uso previsto: Detección cualitativa de SARS-CoV-2

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 del Reglamento (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

Nathan J, Hardenbrook1 and Peijun Zhang (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. Current Opinion in Virology. 52:123–134.

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Docherty AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. Lancet 399(10334):1463-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. Science 372:1043-1044.

Irwin Jungreis, Rachel Sealfon and Manolis Kellis (2021). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 *Sarbecovirus* genomes. Nature Communications. 12:2642.

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 30 de septiembre de 2021. Disponible en línea en la página https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza.

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.

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.

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

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