

Instrucciones de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2021 ES

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



821015



384



01 2021



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	7
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	8
5.	Información general.....	9
6.	Descripción del producto.....	9
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	11
6.2	Tipos de muestras, manipulación y almacenamiento	11
7.	Advertencias, precauciones y limitaciones.....	13
8.	Procedimiento	16
8.1	Preparación de las muestras	16
8.2	Preparación del Master Mix	19
8.3	Preparación de la reacción	21
9.	Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....	22
9.1	Configuración	22
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	22
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	23
10.	Análisis de datos.....	23
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	24
10.1.1	Serie válida de tests diagnósticos.....	24
10.1.2	Serie no válida de tests diagnósticos.....	24
10.2	Interpretación de los resultados	24
10.2.1	Análisis cualitativo.....	25

11.	Evaluación de rendimiento	26
11.1	Sensibilidad analítica	26
11.2	Especificidad analítica.....	28
11.2.1	Inclusividad	29
11.2.2	Reactividad cruzada.....	31
11.3	Exactitud	33
11.4	Evaluación del diagnóstico.....	34
12.	Control de calidad.....	35
13.	Asistencia técnica.....	35
14.	Bibliografía	35
15.	Marcas comerciales y aviso legal.....	36
16.	Explicación de los símbolos.....	37

1. Uso indicado

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de ARN específico de coronavirus de linaje B-beta (linaje B-βCoV) y coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

Está destinado a utilizarse como ayuda en el diagnóstico en individuos con signos y síntomas de enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-2019) en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos.

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 está diseñado para ser utilizado por personal cualificado en laboratorios equipados adecuadamente y conforme a las directrices de bioseguridad en laboratorios.

2. Componentes del kit

Color de la tapa	Componente	Número de viales	Volumen [μl/vial]
Azul	Master A	8	240
Violeta	Master B	8	720
Rojo	Positive Control*	2	250
Verde	Internal Control	4	1000
Blanco	Water (PCR grade)	2	500

* El control positivo contiene ambos objetivos, linaje B-βCoV y SARS-CoV-2

Positive Control = Control positivo

Internal Control = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

PRECAUCIÓN



Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes para ver si están completos en cuanto a número, tipo y relleno. No utilice un producto incompleto o defectuoso, podría perjudicar el rendimiento.

3. Almacenamiento

- El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con altaona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master, el control interno y el control positivo (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

PRECAUCIÓN



Las condiciones de almacenamiento incorrectas pueden perjudicar el rendimiento del producto.

PRECAUCIÓN



No exceda la secuencia de congelación y descongelación ni las duraciones de manipulación especificadas en estas instrucciones de uso.

PRECAUCIÓN

No utilice componentes de productos después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del componente.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento PCR en tiempo real apropiado (consulte el capítulo 6.1 Instrumentos PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico apropiado (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de sobremesa con un rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con un rotor para microplacas, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción apropiados con su material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA

Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA

Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que pertenece a la familia Coronaviridae, género Betacoronavirus, subgénero linaje B.

El SARS-CoV-2 surgió en la región china de Wuhan en diciembre de 2019 y se ha extendido por todo el mundo en un periodo de 2 meses. El virus inicialmente se denominó 2019-nCoV (nuevo coronavirus) y el «Comité Internacional de Taxonomía de Virus» cambió el nombre a SARS-CoV-2 el 11/02/2020. Al mismo tiempo, la OMS llamó COVID-19 a la enfermedad causada por el SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta la rápida escalada y propagación de la COVID-19 en todo el mundo, la OMS declaró el brote como una pandemia el 12/03/2020.

El SARS-CoV-2 es muy contagioso y se transmite mediante aerosoles y gotitas, y provoca infecciones respiratorias agudas con síntomas similares a los de la gripe. En personas mayores y personas con enfermedades preexistentes principalmente, aunque no exclusivamente, la infección por SARS-CoV-2 puede provocar una enfermedad grave y potencialmente mortal. Se han notificado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muertes.

6. Descripción del producto

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de ARN específico de coronavirus de linaje B-beta (linaje B-βCoV) y coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (control interno) para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real utiliza la transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana específicas y sondas específicas para la detección del ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captore de fluorescencia (quencher).

Las sondas específicas para ARN del linaje B-βCoV (gen E diana) están marcadas con el fluoróforo FAM™, mientras que las sondas específicas para ARN de SARS-CoV-2 (gen S diana) están marcadas con el fluoróforo Cy5. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas conectadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela de ARN específico del linaje B-βCoV y de ARN específico de SARS-CoV-2, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de tres procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Positive Control (linaje B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Internal Control
- Water (PCR grade)

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN-polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediada por PCR y la detección de ARN específico de linaje B-βCoV (gen E diana), ARN específico de SARS-CoV-2 (gen S diana) y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

6.2 Tipos de muestras, manipulación y almacenamiento

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se ha validado para su uso con el siguiente tipo de muestra:

- Hisopos con muestras respiratorias humanas recogidos en Universal Transport Medium™ [medio de transporte universal (UTM®)]

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se ha validado usando el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 en el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) para la extracción y la purificación de ácido nucleico.

Para la recogida de las muestras se deben usar bastoncillos disponibles comercialmente con punta de poliéster o fibras Dacron y varilla de plástico. Los hisopos secos se deben volver a suspender en medio de transporte universal (por ejemplo, UTM® de Copan). No deben utilizarse bastoncillos de alginato de calcio, bastoncillos con la varilla de madera o puntas de algodón, ni bastoncillos recogidos en gel de agar. El transporte deberá realizarse de acuerdo con la legislación local o nacional relativa al transporte de material biológico.

Antes de ser utilizados, los hisopos respiratorios resuspendidos en UTM® no deberían permanecer almacenados durante más de 48 horas a temperatura ambiente (entre +20 y +25 °C), 5 días a una temperatura entre +2 y +8 °C o 2 meses a una temperatura entre -25 y -15 °C.

PRECAUCIÓN



Trate siempre las muestras como si fueran infecciosas y (bio) peligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.

NOTA



El almacenamiento en congelación no pone en peligro el rendimiento del kit. Cuando trabaje con muestras congeladas, asegúrese de que se hayan descongelado y mezclado correctamente antes de su uso.

NOTA



No deben utilizarse bastoncillos de alginato de calcio, ya que esto podría provocar resultados incorrectos o no válidos debido a la inhibición de la PCR.

7. Advertencias, precauciones y limitaciones

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes para ver si están completos en cuanto a número, tipo y relleno. No utilice un producto incompleto o defectuoso, podría perjudicar el rendimiento.
- No utilice otros tipos de muestras. El uso de otros tipos de muestras puede perjudicar el rendimiento del producto.
- La presencia de inhibidores de PCR puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Si la muestra contiene otros patógenos distintos del SARS-CoV-2, puede darse competencia con la amplificación objetivo o reactividades cruzadas.
- Las condiciones de almacenamiento incorrectas pueden perjudicar el rendimiento del producto.
- La ausencia de centrifugación de los componentes del producto tras la descongelación podría provocar la contaminación de los componentes con restos de reactivos en las tapas y, como consecuencia, podría perjudicar el rendimiento del producto.
- No exceda la secuencia de congelación y descongelación ni las duraciones de manipulación especificadas en estas instrucciones de uso.
- No utilice componentes de productos después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del componente.
- La manipulación incorrecta de los componentes del producto y las muestras puede provocar contaminación y dar lugar a unos resultados de examen IVD incorrectos.
 - No intercambie viales ni tapones de botellas, ya que puede producirse contaminación cruzada.
 - Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de los componentes del kit.
 - Utilice áreas de trabajo separadas para la preparación de las muestras, la configuración de reacción y las actividades de amplificación/detección.
 - Lleve siempre guantes desechables.

- No abra los tubos o las PCR Plates (placas PCR) después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- El almacenamiento de eluidos en condiciones incorrectas puede provocar la degradación de las secuencias objetivo de SARS-CoV-2.
- No supere el tiempo de almacenamiento de la mezcla de PCR. Esto podría perjudicar el rendimiento del producto.
- Trate siempre las muestras como si fueran infecciosas y (bio)peligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.
- Elimine los desechos peligrosos y biológicos solo conforme a las regulaciones locales y nacionales para evitar la contaminación ambiental.
- Como con cualquier test diagnóstico, los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma del SARS-CoV-2 cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Si su sistema de preparación de las muestras utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.
- El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que este test tenga un rendimiento óptimo.
- En ensayo del gen E (canal FAM™) sí detecta el ARN específico del linaje B-betacoronavirus, incluyendo el coronavirus SARS y varios coronavirus de murciélago. Las señales aisladas con el ensayo del gen E podrían indicar la presencia de coronavirus SARS o de coronavirus de murciélagos.

8. Procedimiento

PRECAUCIÓN



La manipulación incorrecta de los componentes del producto y las muestras puede provocar contaminación y dar lugar a unos resultados de examen IVD incorrectos.

- No intercambie viales ni tapones de botellas, ya que puede producirse contaminación cruzada.

- Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de los componentes del kit.

- Utilice áreas de trabajo separadas para la preparación de las muestras, la configuración de reacción y las actividades de amplificación/detección.

- Lleve siempre guantes desechables.

- No abra los tubos o las PCR Plates (placas PCR) después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.

8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material de partida para el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se validó con hisopos respiratorios humanos utilizando el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

También pueden ser apropiados otros sistemas y kits de extracción de ácido nucleico (véase a continuación). La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® debe validarla el usuario.

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® EasyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aprox. 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

Tras completarse el procedimiento de extracción, los eluidos de la Eluate Plate (placa de eluidos) sin sellar son estables a temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante un total de 6 horas. Los eluidos en una Eluate Plate (placa de eluidos) sellada pueden almacenarse a una temperatura de entre +2 y +8 °C durante hasta 24 horas antes del inicio de una configuración de reacción de PCR.

PRECAUCIÓN



No utilice otros tipos de muestras. El uso de otros tipos de muestras puede perjudicar el rendimiento del producto.

PRECAUCIÓN

Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN

El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

PRECAUCIÓN

Trate siempre las muestras como si fueran infecciosas y (bio)peligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.

PRECAUCIÓN

La presencia de inhibidores de PCR puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.

PRECAUCIÓN

Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.

PRECAUCIÓN

Elimine los desechos peligrosos y biológicos solo conforme a las normativas locales y nacionales para evitar la contaminación ambiental.

PRECAUCIÓN

El almacenamiento de eluidos en condiciones incorrectas puede provocar la degradación de las secuencias objetivo del linaje B-βCoV y SARS-CoV-2.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 13. Asistencia técnica).

8.2 Preparación del Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, prepare el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.

- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl del IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN



La ausencia de centrifugación de los componentes del producto tras la descongelación podría provocar la contaminación de los componentes con restos de reactivos en las tapas y, como consecuencia, podría perjudicar el rendimiento del producto.

NOTA



Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

NOTA



Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente a la muestra.

8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con el Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

Tras completarse la configuración de reacción de PCR, la PCR Mix (mezcla de PCR) es estable a temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante 30 minutos.

PRECAUCIÓN



No supere el tiempo de almacenamiento de la mezcla de PCR. Esto podría perjudicar el rendimiento del producto.

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 13. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Desactivador fluorescente
ARN específico del linaje B-βCoV	Gen E	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de SARS-CoV-2	Gen S	Cy5	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la adquisición de colorantes:

	Fase	Repeticiones de ciclos	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclos	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 13. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de tests diagnósticos

Una serie de tests diagnósticos es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

ID de control	Canal de detección		
	FAM™	Cy5	JOE™
Control positivo (linaje B-βCoV y SARS-CoV-2)	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de tests diagnósticos

Una serie de pruebas diagnósticas es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En el caso de una serie **no válida** de tests diagnósticos, repita las pruebas usando los ácidos nucleicos purificados restantes o empiece de nuevo a partir de las muestras originales.

10.2 Interpretación de los resultados

PRECAUCIÓN



Como con cualquier test diagnóstico, los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™ (Gen E)	Cy5 (Gen S)	JOE™ (Internal Control [control interno])	
+	+	+*	Se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV y SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+*	Solo se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV. Presunto positivo para SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+*	Solo se ha detectado ARN específico de SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	No se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV ni de SARS-CoV-2. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de SARS-CoV-2.
-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en el canal de detección de FAM™ o en el canal de detección de Cy5. Una elevada carga de ARN del linaje B-βCoV (gen E diana) y/o de SARS-CoV-2 (gen S diana) en la muestra puede dar lugar a señales reducidas o ausentes del Internal Control (control interno).

¹ La detección en solo uno de los dos canales de detección respectivos para el gen E y el gen S podría deberse a una baja concentración de ARN vírico cerca del límite de detección o debido a la mutación de una de las dos secuencias objetivo.

² La muestra puede volver a ser analizada repitiendo la extracción y la RT-PCR. Si el resultado repetido sigue siendo presuntamente positivo, entonces pueden ser realizadas pruebas confirmatorias adicionales.

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación del rendimiento analítico del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se realizó usando el sobrenadante de cultivo celular de SARS-CoV-2 (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*) inactivado mediante calor proporcionado por el Instituto de Virología, Charité Berlín, Alemania.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de una serie de dilución de sobrenadante de cultivo celular de SARS-CoV-2 (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* proporcionado por el Instituto de Virología, Charité Berlín, Alemania) inactivado mediante calor y diluido en Universal Transport Medium™ (UTM®, Copan) que contenía matriz nasal simulada [5 % p/v de mucina, 5 % v/v de sangre, 0,8 % v/v de NaCl (95 % de suero fisiológico) y 0,00002 % p/v de ADN genómico humano (presentación 510k para ensayo BD MAX™ MRSA XT; número de muestreo: K133605)].

Cada dilución se analizó en 8 repeticiones en 3 días diferentes (total n = 24 por dilución) usando combinaciones de 3 lotes de RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0, 3 lotes de AltoStar® Purification Kit 1.5 y 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5 (control interno). Las series se realizaron usando 3 AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) diferentes y CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Se combinaron los datos de todas las series y se realizó un análisis de probit para determinar el valor del 95 % del límite de detección.

Tabla 2: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de SARS-CoV-2 (gen E)

Conc. entrada [PFU/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	21	88
3,16E-03	24	12	50
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	1	4
1,00E-04	24	2	8

La sensibilidad analítica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 para SARS-CoV-2 (gen E) se determinó mediante análisis probit. Para la detección de ARN de SARS-CoV-2 (gen E), la sensibilidad analítica es de 0,025 PFU/ml [intervalo de confianza del 95 % (IC): 0,014 - 0,060 PFU/ml].

Tabla 3: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de SARS-CoV-2 (gen S)

Conc. entrada [PFU/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	23	96
3,16E-03	24	15	63
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	2	8
1,00E-04	24	1	4

La sensibilidad analítica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 para SARS-CoV-2 (gen S) se determinó mediante análisis probit. Para la detección de ARN de SARS-CoV-2 (gen S), la sensibilidad analítica es de 0,014 PFU/ml [intervalo de confianza del 95 % (IC): 0,008 - 0,032 PFU/ml].

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se asegura mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se verificaron mediante análisis de comparación de secuencias frente a las secuencias disponibles públicamente con el fin de asegurar la detección de todos los genotipos relevantes del linaje B-βCoV (gen E diana) y SARS-CoV-2 (gen S diana).

11.2.1 Inclusividad

Se evaluó la inclusividad del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 para diferentes aislados de SARS-CoV-2 mediante pruebas en húmedo. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Inclusividad (pruebas en húmedo) del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Cepa/aislado de SARS-CoV-2	Tipo de muestras/fuente	Concentración
<i>BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*</i>	Instituto de Virología, Charité Berlín, Alemania/ Sobrenadante de cultivo celular inactivado mediante calor	1,00E+04 copias/μl
2019-nCoV/Italy-INMI1	Archivo Europeo de Virus Global/ARN	1,00E+06 copias/μl

* Se usó la cepa *BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* para la determinación del LD y la evaluación del rendimiento clínico del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

Tabla 5: Inclusividad (análisis *in silico* para 155 031 secuencias de genoma completo de SARS-CoV-2 publicadas mediante GISAID e.V. (www.gisaid.org) y 36 630 secuencias de genoma completo publicadas mediante el National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) a fecha de jueves, 5 de noviembre de 2020 para el objetivo del **gen E y el gen S**): RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

191 661 secuencias de genoma completo		Homología	Comentario
Gen E	Cebador directo	191 553 secuencias: 100 %	106 secuencias: 96,2 % (1 disparidad) 2 secuencias: 92,3 % (2 disparidades)
	Cebador inverso	191 602 secuencias: 100 %	58 secuencias: 95,5 % (1 disparidad) 1 secuencia: 90,9 % (2 disparidades)
	Sonda	191 539 secuencias: 100 %	122 secuencias: 95,7 % (1 disparidad)
Gen S	Cebador directo	191 419 secuencias: 100 %	239 secuencias: 95,2 % (1 disparidad) 3 secuencias: 90,5 % (2 disparidades)
	Cebador inverso	190 996 secuencias: 100 %	662 secuencias: 95,5 % (1 disparidad) 3 secuencias: 90,1 % (2 disparidades)
	Sonda	190 534 secuencias: 100 %	1120 secuencias: 96,3 % (1 disparidad) 6 secuencias: 92,6 % (2 disparidades) 1 secuencia: 85,2 % (4 disparidades)

* La secuencia (ID de muestreo EPI_ISL_415593, GISAID) presentó 4 disparidades en el sitio de unión a la sonda del gen S. Esta secuencia se publicó el 10 de marzo de 2020 y procede de Washington, EE. UU. Desde entonces, ninguna de las secuencias publicadas ha presentado tantas disparidades de nuevo. Los autores comentaron la secuencia de esta forma: «Precaución. Tramos de NNN (1,74 % de la secuencia total)». Indicaban así que no se trata de una calidad de secuenciación ideal y que, por lo tanto, el impacto de los oligonucleótidos específicos del gen S no se ha investigado.

En función de la posición, es muy improbable que los eventos de mutación que dan lugar a ≤ 2 disparidades en una única secuencia de oligonucleótidos tengan un efecto negativo significativo en el rendimiento del ensayo. Todas las secuencias de este tipo (≤ 2 disparidades) analizadas en experimentos de laboratorio en húmedo en el marco de actividades de vigilancia tras la comercialización del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 han confirmado hasta el momento que el rendimiento no se ha visto afectado por dichas mutaciones. A excepción de una única secuencia, ninguna de las demás secuencias analizadas presentó disparidades en más de un oligonucleótido y ninguna de las secuencias dispares presentó disparidades en ambos sistemas de detección específicos (gen E y gen S), por lo que no se espera que afecte a la reactividad de los oligonucleótidos específicos incluidos en el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

11.2.2 Reactividad cruzada

La especificidad analítica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 con respecto a la reactividad cruzada con otros patógenos distintos al SARS-CoV-2 se evaluó probando virus relacionados con el SARS-CoV-2, patógenos que provocan síntomas parecidos a los de una infección por SARS-CoV-2 y patógenos con probabilidad de estar presentes en pacientes que sufran una infección por SARS-CoV-2.

A excepción del SARS-coronavirus*, el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no presentó reactividad cruzada con ninguno de los siguientes patógenos:

- Coronavirus humano 229E
- Coronavirus humano OC43
- Coronavirus humano NL63
- Coronavirus MERS
- Adenovirus
- Metapneumovirus humano (MPVh)
- Virus parainfluenza 1
- Virus parainfluenza 2
- Virus parainfluenza 3
- Virus parainfluenza 4
- Virus de la gripe A
- Virus de la gripe B
- Enterovirus
- Virus sincitial respiratorio A
- Virus sincitial respiratorio B
- Rinovirus

- *Chlamydia pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus salivarius*

* Se obtuvo un resultado positivo para el SARS-coronavirus con el RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en el canal de detección FAM™, ya que el objetivo del gen E no es específico de SARS-CoV-2, sino que detecta todo el linaje de B-betacoronavirus, incluido el SARS-coronavirus.

PRECAUCIÓN



Si la muestra contiene otros patógenos distintos del SARS-CoV-2, puede darse competencia con la amplificación objetivo o reactividades cruzadas.

11.3 Exactitud

La precisión del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basados en valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos 4 repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

Tabla 6: Datos de precisión (% de CV [valores C_t]) para muestras de UTM® con alto positivo en SARS-CoV-2

	Muestra con alto positivo en SARS-CoV-2 [C_t en el canal FAM™, gen E objetivo]	Muestra con alto positivo en SARS-CoV-2 [C_t en el canal Cy5, gen S objetivo]
Variabilidad intraensayo	0,15 - 0,61	0,02 - 0,34
Variabilidad interensayo	1,80 - 2,10	1,53 - 1,64
Variabilidad interlote	0,44	0,41
Variabilidad total	1,83	1,22

Todas las muestras analizadas con el triple del LD (muestras con bajo positivo) dieron positivo para SARS-CoV-2 (gen E y gen S).

Tabla 7: Datos de precisión [% de CV (valores C_t)] para el Internal Control (control interno) en muestras de UTM® negativas en SARS-CoV-2

	Internal Control (control interno)
Variabilidad intraensayo	0,12 - 0,49
Variabilidad interensayo	0,36 - 1,33
Variabilidad interlote	0,39
Variabilidad total	1,02

11.4 Evaluación del diagnóstico

Se evaluó el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en un estudio comparativo con el Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) con marcado CE. De forma retrospectiva, se analizaron 110 muestras de hisopos respiratorios de supervisión rutinaria de SARS-CoV-2 en paralelo utilizando el Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit en combinación con el *m*Sample Preparation Systems RNA (Abbott) y el *m*2000sp Instrument (Abbott), y el RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en combinación con el AltoStar® Purification Kit 1.5 y el AltoStar® Internal Control 1.5 (control interno) en el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) y el CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad). Para el análisis cualitativo se excluyeron todas las muestras con un resultado no válido para uno o ambos ensayos. Los resultados para las 104 muestras restantes figuran en la tabla 8.

Tabla 8: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico para SARS-CoV-2 en muestras de hisopos respiratorios

		Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks)	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	POSITIVO	51	2
	NEGATIVO	0	51

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en comparación con el Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit fueron del 100 % y el 96 %, respectivamente.

12. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

13. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

email: support@altona-diagnostics.com

teléfono: +49-(0)40-5480676-0

14. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.^a edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G. y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

15. Marcas comerciales y aviso legal

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); BD MAX™ (BD); NucliSENS®, EasyMag® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

El SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.















Producto sin licencia de Health Canada y no aprobado ni autorizado por la FDA.



El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 de altona Diagnostics ha recibido una autorización provisional de la Autoridad de Ciencias de la Salud de Singapur.

No disponible en todos los países.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

16. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» tests/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución: Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics si necesita ayuda.

Símbolo	Explicación
	Nota: Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.
	Versión

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

