

Instrucciones de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

06/2020 ES

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



821019



4800



06 2020



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

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	7
3.	Almacenamiento	8
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	9
5.	Información general.....	10
6.	Descripción del producto.....	10
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	12
6.2	Tipos de muestras.....	12
7.	Advertencias y precauciones	13
8.	Procedimiento	15
8.1	Preparación de las muestras	16
8.2	Configuración de Master Mix	18
8.3	Configuración de reacción	20
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	21
9.1	Configuración	21
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	21
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	22
10.	Análisis de datos.....	22
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	23
10.1.1	Serie válida de tests diagnósticos.....	23
10.1.2	Serie no válida de tests diagnósticos.....	23
10.2	Interpretación de los resultados	23
10.2.1	Análisis cualitativo.....	24

11.	Evaluación de rendimiento	25
11.1	Sensibilidad analítica	25
11.2	Especificidad analítica.....	29
11.2.1	Inclusividad	29
11.2.2	Reactividad cruzada.....	31
11.3	Exactitud	32
11.4	Evaluación del diagnóstico.....	33
12.	Limitaciones	35
13.	Control de calidad.....	36
14.	Asistencia técnica.....	36
15.	Bibliografía	36
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	37
17.	Explicación de los símbolos	38

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 tapa	Componente	Número de viales	Volumen [μ l/vial]
Azul	Master A	100	240
Violeta	Master B	100	720
Rojo	Positive Control*	25	250
Verde	Internal Control	48	1000
Blanco	Water (PCR grade)	4	500

* El control positivo contiene ambos objetivos, B- β CoV 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 Altona 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® 6000 (Corbett Research) o 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.

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).

La prueba 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, utilizando una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de secuencias objetivo

específicas y sondas objetivo específicas para la detección de ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Las sondas específicas para ARN de 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 de 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 (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 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:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipos de muestras

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 un Universal Transport Medium™ (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.

7. Advertencias y precauciones

- 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.

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 2 a 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 regulaciones locales y nacionales para evitar la contaminación ambiental.

PRECAUCIÓN

El almacenamiento de eluidos en condiciones incorrectas puede provocar la degradación de las secuencias objetivo de 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 14. Asistencia técnica).

8.2 Configuración de 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, 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
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 de 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 Configuración de 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 la 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 del 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 PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. 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 de B-βCoV	Gen E objetivo	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de SARS-CoV-2	Gen S objetivo	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 PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. 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 [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 de B-βCoV y SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+*	Solo se ha detectado ARN específico de 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 de 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 de 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 del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se realizó usando diluciones seriadas del sobrenadante del cultivo celular de SARS-CoV-2 inactivado mediante calor (4,6E+05 unidades formadoras de placas [UFP, por sus siglas en inglés] [UFP]/ml antes de la inactivación, Instituto de Virología, Charité Berlin, Alemania).

11.1 Sensibilidad analítica

Estimación del límite de detección (LD):

Se usaron diluciones seriadas del sobrenadante del cultivo celular de SARS-CoV-2 inactivado mediante calor (4,6E+05 unidades formadoras de placas [UFP, por sus siglas en inglés] [UFP]/ml antes de la inactivación, Instituto de Virología, Charité Berlin, Alemania).

Para la extracción, 700 µl de UTM® que contenía matriz nasal simulada (la muestra contenía matriz nasal simulada [5 % p/v de mucina, 5 % v/v de sangre entera, 0,8 % v/v de NaCl [95 % de suero fisiológico] y 0,00002 % p/v de ADN genómico humano) se enriquecieron con sobrenadante de cultivo celular de SARS-CoV-2 diluido y se cargaron en el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) para la extracción del ácido nucleico con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Cada dilución se extrajo en cinco repeticiones y se analizó con el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección). La concentración más baja a la que dieron positivo todas las repeticiones se trató como LD provisional. Los resultados pueden encontrarse en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Determinación del LD provisional utilizando el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 para la extracción del ácido nucleico. Objetivo: Gen E

Objetivo	Concentración [UFP/ml]	Tasa de retirada	Replificado 1 C _t FAM™	Replificado 2 C _t FAM™	Replificado 3 C _t FAM™	Replificado 4 C _t FAM™	Replificado 5 C _t (FAM™)
Gen E	1,00E-01	5/5	32,79	33,30	33,03	33,24	33,14
	3,16E-02	4/5	-	35,23	35,25	39,43	34,22
	1,00E-02	4/5	-	35,68	38,77	36,25	36,10
	3,16E-03	2/5	-	-	-	38,30	38,70
	1,00E-03	0/5	-	-	-	-	-
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Tabla 2: Determinación del LD provisional utilizando el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 para la extracción del ácido nucleico. Objetivo: Gen S

Objetivo	Concentración [UFP/ml]	Tasa de retirada	Replificado 1 C _t (Cy5)	Replificado 2 C _t (Cy5)	Replificado 3 C _t (Cy5)	Replificado 4 C _t (Cy5)	Replificado 5 C _t (Cy5)
Gen S	1,00E-01	5/5	32,75	32,82	33,07	32,95	33,14
	3,16E-02	3/5	-	35,43	34,54	-	35,44
	1,00E-02	4/5	-	37,41	36,01	38,64	39,21
	3,16E-03	1/5	-	-	-	37,80	-
	1,00E-03	2/5	-	-	38,98	-	39,76
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en combinación con el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización)/kit AltoStar® Purification Kit 1.5 y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección) detectó 5/5 repeticiones con una concentración de 1,00E-01 UFP/ml para ambos objetivos, el gen S y el gen E. Por consiguiente, esta concentración se consideró el LD provisional.

Confirmación del límite de detección (LD):

En base al LD provisional, se enriquecieron 20 muestras de UTM® que contenían matriz nasal simulada con el sobrenadante de cultivo celular de SARS-CoV-2 inactivado mediante calor hasta una concentración final de 1,00E-01 UFP/ml. Se extrajeron los ácidos nucleicos con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 y el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización), como se describe anteriormente. Los eluidos obtenidos se analizaron con el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección). Los resultados pueden encontrarse en la tabla 3.

Tabla 3: Confirmación del LD en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección)

Concentración de SARS-CoV-2 = 1,00E-01 UFP/ml				
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (Cy5)	C _t (JOE™)
1	Pos	33,02	33,04	29,57
2	Pos	33,28	33,29	29,34
3	Neg	-	-	29,25
4	Pos	33,34	33,76	29,45
5	Pos	32,82	33,88	29,42
6	Pos	32,79	32,85	29,61
7	Pos	32,43	33,53	29,53
8	Pos	33,14	33,26	29,47
9	Pos	33,01	32,68	29,45
10	Pos	33,2	33,45	29,31
11	Pos	33,21	33,51	29,41
12	Pos	32,99	34,11	29,56
13	Pos	32,69	33,13	29,41
14	Pos	33,67	34,33	29,52
15	Pos	32,55	32,76	29,48
16	Pos	33,26	33,32	29,33
17	Pos	33,2	32,53	29,36
18	Pos	32,78	33,00	29,51
19	Pos	33,13	33,31	29,47
20	Pos	33,28	33,43	29,46
Estadísticas	C _t medio	33,04	33,32	29,45
	SD	0,30	0,47	0,09
	CV %	0,92	1,42	0,32
	Resultado	19/20		

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en combinación con el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización)/kit AltoStar® Purification Kit 1.5 y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección) detectó 19/20 repeticiones con una concentración de 1,00E-01 UFP/ml.

Por tanto, el LD confirmado es 1,00E-01 UFP/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 de 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 Berlin; Alemania/Sobrenadante de cultivo celular inactivado mediante calor	4,6E+05 UFP/ml
2019-nCoV//Italy-INMI1	Archivo Europeo de Virus Global /ARN	1,00E+04 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 1906 secuencias de genoma completo de SARS-CoV-2, de las cuales 1809 se publicaron mediante GISAID e.V. (www.gisaid.org) y 107 se publicaron mediante el National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) a fecha de 27 de marzo de 2020 para el objetivo del gen E y el gen S): kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

1916 secuencias de genoma completo		Homología	Comentario
Gen E	Cebador directo	1915 secuencias: 100 %	1 secuencia 96 % (1 disparidad)
	Cebador inverso	1915 secuencias: 100 %	1 secuencia 95 % (1 disparidad)
	Sonda	1914 secuencias: 100 %	2 secuencias: 95 % (1 disparidad)
Gen S	Cebador directo	1912 secuencias: 100 %	4 secuencias: 95 % (1 disparidad)
	Cebador inverso	1903 secuencias: 100 %	13 secuencias: 95 % (1 disparidad)
	Sonda	1881 secuencias: 100 %	34 secuencias: 95 % (1 disparidad); 1 secuencia 91 % (2 disparidades)

En una única secuencia de oligonucleótidos, los eventos de mutación que dan lugar a ≤ 2 disparidades no tendrán un impacto negativo significativo en la amplificación de la secuencia objetivo respectiva. Ninguna de las 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.

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Coronavirus humano 229E
- Coronavirus humano OC43
- Coronavirus humano NL63
- SARS-coronavirus3
- 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*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*

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	0,13 - 0,75	0,39 - 1,35
Variabilidad interensayo	0,40 - 2,12	0,52 - 0,62
Variabilidad interlote	0,22	1,53
Variabilidad total	2,74	2,02

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_v)] para el Internal Control (control interno) en muestras de UTM® negativas en SARS-CoV-2

	Internal Control (control interno)
Variabilidad intraensayo	0,17 - 0,37
Variabilidad interensayo	0,05 - 0,95
Variabilidad interlote	0,42
Variabilidad total	1,19

11.4 Evaluación del diagnóstico

Para predecir el rendimiento clínico con un intervalo de confianza (IC) del 95 %, se preparó un sobrenadante de cultivo celular de SARS-CoV-2 a diferentes concentraciones, se enmascaró y se añadió a 34 hisopos nasofaríngeos individuales en total resuspendidos en Universal Transport Medium™ (UTM®).

Se enriquecieron diez muestras con ARN, cada una hasta una concentración final de una vez el LD (1,00E-01 UFP/ml), se enriquecieron catorce muestras con ARN, cada una hasta una concentración final del doble del LD (2,00E-01 UFP/ml) y se enriquecieron diez muestras con ARN, cada una hasta una concentración final de 20 veces el LD (2,00E00 UFP/ml). Otros 35 hisopos nasofaríngeos individuales supuestamente negativos en SARS-CoV-2 resuspendidos en Universal Transport Medium™ (UTM®) no se enriquecieron. Todas las muestras fueron enmascaradas y remitidas a un operador neutral. Se extrajeron los ácidos nucleicos con el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 (Altona Diagnostics).

Los eluidos se analizaron con el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección) (Bio-Rad). La clave de adición blindada se desenmascaró después de la conclusión de los resultados. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados del análisis de las muestras clínicas

Concentración de la muestra [UFP/ml]	Porcentaje de marcadores genéticos analizados del total objetivado para el gen S objetivo	Porcentaje de marcadores genéticos analizados del total objetivado para el gen E objetivo
1 x LD (1,00E-01)	9/10	10/10
2 x LD (2,00E-01)	14/14	14/14
20 x LD (2,00E00)	10/10	10/10
negativo	0/35	0/35

El 95 % (23 de 24) de las muestras con una concentración de SARS-CoV-2 de una o dos veces el LD dieron positivo para el gen S objetivo y se notificaron como «Positivas para ARN de SARS-CoV-2». Una muestra dio positivo solo para el gen E objetivo y se notificó como «Presunto positivo para ARN de SARS-CoV-2». Todas estas muestras (100 %) dieron positivo para el gen E objetivo. De entre las muestras con una concentración de 20 veces el LD, todas (el 100 %) dieron positivo para el gen S objetivo, además de para el gen E objetivo. Todas las muestras no enriquecidas (100 %) dieron negativo para ambos objetivos.

12. Limitaciones

- 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.

13. 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.

14. Asistencia técnica

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

correo electrónico: **support@altona-diagnostics.com**

teléfono: **+49-(0)40-5480676-0**

15. 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.

16. Marcas comerciales y aviso legal

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIA Symphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan).

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.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

17. Explicación de los símbolos

Símbol	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» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

Notas:

Notas:

Notas:

Notas:

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

