

# FLU-COVID RT-PCR

Kit de diagnóstico para la detección del RNA del virus Influenza A (FluA),  
Influenza B (FluB) y SARS-CoV-2 mediante One-step Real-Time RT-PCR

REF

Ref. MAD-003942M-L



100 determinaciones

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*  
Directiva 98/79/CE



## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>USO PREVISTO</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPIO DEL MÉTODO</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>COMPONENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL ADICIONAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO</b> .....	<b>5</b>
4.1	Reactivos y materiales .....	5
4.2	Equipamiento.....	5
<b>5</b>	<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD</b> .....	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES</b> .....	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA CLÍNICA PARA ANÁLISIS</b> .....	<b>7</b>
7.1	Toma de muestras .....	7
7.2	Extracción de ácidos nucleicos desde lavados broncoalveolares y exudados naso- y orofaríngeos.....	8
<b>8</b>	<b>PROTOCOLO DE PCR</b> .....	<b>9</b>
8.1	Preparación de la Mix de reacción .....	9
8.2	Configuración del instrumento de PCR a tiempo real .....	10
<b>9</b>	<b>INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>11</b>
<b>10</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO</b> .....	<b>13</b>
10.1	Sensibilidad analítica .....	13
10.2	Especificidad analítica.....	14
10.3	Sensibilidad y especificidad clínica .....	14
<b>11</b>	<b>LIMITACIONES DEL TEST</b> .....	<b>14</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>15</b>
<b>13</b>	<b>SÍMBOLOS DE LA ETIQUETA</b> .....	<b>16</b>



## 1 USO PREVISTO

El kit **FLU-COVID RT-PCR** es un kit de diagnóstico *in vitro* para la detección simultánea cualitativa y la diferenciación del RNA del virus Influenza A<sup>1</sup> (FluA), Influenza B<sup>1</sup> (FluB) y/o SARS-CoV-2, a partir del RNA extraído de muestras clínicas humanas de diferente origen como exudados naso- y orofaríngeos y lavados broncoalveolares (BAL). Está basado en la técnica One-Step RT-PCR multiplex en tiempo real, utilizando cebadores y sondas fluorescentes para los genes diana: Matrix protein de FluA (Mp), Matrix protein de FluB (Mp), gene de la nucleocápside (N) de SARS-CoV-2, siguiendo la metodología recomendada por la OMS (11).

<sup>1</sup>Tipos de Influenza virus detectados:

- Influenza A
  - Genérica
  - H1N1 pandémica 2009
  - H3 genérica
- Influenza B: linajes Victoria y Yamagata.

Se incluyen también cebadores y sonda fluorescente específicos para la detección simultánea del gen RNasaP humano, como control interno de la calidad del material de partida y de amplificación. Los canales de detección de las diferentes dianas son los siguientes:

Diana	Fluoróforo
SARS-CoV-2	FAM
Influenza A	ROX
Influenza B	JOE
RNasaP	Cy5

Tabla 1. Canales de detección para las diferentes dianas del kit FLU-COVID RT-PCR.

Estado Microbiológico: Producto no estéril.

## 2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit **FLU-COVID RT-PCR** es un ensayo multiplex basado en la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real. La Master mix contiene tres juegos de primers y sondas dirigidos a la detección del RNA del virus Influenza A, virus Influenza B y virus SARS-CoV-2. También incluye primers y sondas para detectar el gen humano de la RNasaP en muestras clínicas o muestras control. Los oligonucleótidos usados como primers y sondas fueron seleccionados en regiones evolutivamente conservadas. En un único ensayo, el test permite diferenciar entre del virus Influenza A, virus Influenza B y virus SARS-CoV-2.

En un primer paso de transcripción inversa las regiones de RNA complementarias a los primers son convertidas a cDNA, que posteriormente es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección de los amplicones obtenidos se basa en la tecnología de sondas TaqMan.

Si los ácidos nucleicos diana están presentes estos son amplificados y durante el proceso de PCR las sondas

anillarán de forma específica en las regiones complementarias comprendidas entre los primers *forward* y *reverse*. Mientras ocurre la fase de extensión de la PCR, la actividad 5' nucleasa de la DNA polimerasa degrada las sondas unidas específicamente a sus dianas, produciéndose la separación entre el *reporter* y el *quencher* y se generará una señal fluorescente. Las sondas específicas de cada virus generarán una señal fluorescente a diferentes longitudes de ondas, permitiendo así que el equipo de Real Time PCR pueda diferenciar las distintas señales. En cada ciclo de desnaturalización-extensión se va sumando la ruptura de nuevas moléculas de *reporter* con el consiguiente aumento en la intensidad de la señal fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es monitorizada en los equipos de PCR a tiempo real en cada uno de los ciclos y los datos son analizados con software de análisis específicos para cada equipo.

La detección del RNA viral además de ayudar en el diagnóstico de la enfermedad aporta una información valiosa desde el punto de vista epidemiológico y de vigilancia.

### 3 COMPONENTES

El kit **FLU-COVID RT-PCR** se comercializa como una Master Mix liofilizada que incluye todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR a tiempo real.

Además, a fin de evitar la contaminación con productos de PCR previos, la Mix contiene la enzima Uracil DNA glycosylase (Cod-UNG), que degrada productos de PCR que contengan dUTP.

Junto con la Mix de RT-PCR se suministra un control positivo (PC) y una solución de reconstitución para reconstituir la Master Mix liofilizada y para incluirla en los controles negativos (NTC).

Componentes del kit para 100 test:

REFERENCIA (DESCRIPCIÓN)		CONTENIDO	CANTIDAD
MAD-003942M-100-L (FLU-COVID MMIX)	MAD-003942-MIX-L * (FLU-COVID MMIX)	Transcriptasa inversa, Hot Start ADN Polimerasa, Uracil DNA glicosilasa, cebadores, sondas fluorescentes, tampón de reacción, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)	2 viales con 50 test/vial Liofilizado
	MAD-LYO-SOL (Solución de Reconstitución)	---	1 vial (1700 µl)
MAD-FLU-COVID (FLU-COVID PC)		DNA/RNA sintético no infeccioso conteniendo parte del genoma de FluA, FluB, SARS-CoV-2 y DNA humano	1 vial (100 µl)

Tabla 2. Reactivos suministrados en el kit FLU-COVID RT-PCR

\*Antes de su primer uso, abrir el vial de cristal que contiene la Master Mix liofilizada, agitar la Solución de Reconstitución (MAD-LYO-SOL) en vortex e hidratar el vial añadiendo 660 µl de dicha solución.

Una vez reconstituida, la Mix se debe almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el mismo vial de cristal cerrado, con el “stopper” de caucho y con el tapón de rosca, siendo estable por **un máximo de 4 meses** desde la fecha de reconstitución. Se recomienda **no congelar y descongelar el vial más de 5 veces** una vez reconstituido.

## 4 MATERIAL ADICIONAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO

### 4.1 Reactivos y materiales

- Guantes desechables.
- Puntas de pipeta con filtro libre de DNAsa/RNAsa.
- Kit de extracción de ARN.
- Tiras de tubos/placas/films adhesivos ópticos específicos para cada equipo de Real-Time PCR.

### 4.2 Equipamiento

- Cabina de flujo laminar
- Microcentrífuga para tubos de 1.5ml.
- Microcentrífugas de tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos.
- Vortex.
- Micropipetas automáticas: P1000, P200, P20 y P2.
- Equipo de Real-Time PCR.

## 5 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit **FLU-COVID RT-PCR** se debe transportar a una temperatura entre  $2\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}^*$  y el almacenamiento a largo plazo debe ser el indicado en la etiqueta para cada uno de sus componentes: FLU-COVID MMIX (mastermix y reconstituyente) a  $2\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el FLU-COVID PC (control positivo) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Una vez reconstituida, la mezcla de reacción **FLU-COVID MMix** es estable durante 4 meses almacenada congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y soporta hasta cinco ciclos de congelación / descongelación. Si realiza un run con un bajo número de muestras se recomienda alicuotear el reactivo previamente. La mezcla contiene moléculas fluorescentes y debe almacenarse protegida de la luz directa.

El control positivo es sensible al cambio de estado físico y no debe someterse a más de ocho ciclos de congelación/descongelación. Es conveniente manipular el vial de control positivo de forma separada a las muestras clínicas para evitar posibles contaminaciones que generarían resultados falsos positivos.

Si se guardan a la temperatura recomendada los reactivos de PCR son estables hasta la fecha de caducidad especificada. Los reactivos de PCR deben ser conservados en zonas libres de contaminación por ADN o productos de PCR.

\*Se incluye un indicador de temperatura con el embalaje para controlar las condiciones durante el envío. En caso de que la cadena de frío se rompa se recomienda contactar con el fabricante antes de utilizar los reactivos.

## 6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Lea las instrucciones de uso antes de utilizar este producto.
- El kit debe ser manejado por técnicos cualificados en técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico.
- No use ningún componente del kit después de la fecha de caducidad.
- **La mezcla FLU-COVID MMix debe reconstituirse antes de su primer uso.** Una vez reconstituida debe manipularse en hielo o en placa fría y protegida de la luz. Mezclar las soluciones invirtiendo los tubos varias veces, sin agitar en vortex, y centrifugar brevemente.
- El control positivo debe descongelarse a temperatura ambiente, mezclarse bien y centrifugarse brevemente antes de su uso.
- Las precauciones de seguridad y eliminación de residuos vienen descritas en la Ficha de Datos de Seguridad de este producto. Este producto está destinado únicamente para uso profesional en un laboratorio, y no como fármaco, para uso doméstico ni otros fines. La versión actual de la Ficha de Datos de Seguridad de este producto puede ser descargada en la página web [www.vitro.bio](http://www.vitro.bio) o solicitada en [regulatory@vitro.bio](mailto:regulatory@vitro.bio).
- El kit FLU-COVID RT-PCR utiliza como material de partida ácidos nucleicos previamente extraídos y purificados. Es responsabilidad del cliente incluir los controles necesarios para verificar que el sistema de extracción de material genético utilizado funciona adecuadamente.
- Consideraciones generales para evitar la degradación del ARN con ribonucleasas (RNAsas)

Las RNAsas son enzimas muy estables, difíciles de inactivar, que actúan rápidamente degradando el ARN. Hay que evitar la introducción de RNAsas en la muestra problema y en los reactivos usados para la RT-PCR manteniendo las siguientes precauciones:

- Trabajar en un área limpia libre de RNAsas. La principal fuente de contaminación por RNAsas procede de la piel y las partículas de polvo, portadores de bacterias y hongos.
- Usar siempre guantes desechables para prevenir la contaminación de RNAsas procedentes de la piel.
- Cambiar los guantes con frecuencia y mantener los tubos cerrados.
- Usar tubos de PCR y puntas de pipeta libres de RNAsas.
- Durante todo el proceso de preparación de la muestra para la amplificación, trabajar rápidamente para evitar la degradación de ARN por RNAsas residuales y endógenas.

- **Consideraciones generales para evitar la contaminación con producto de PCR**

La mayor fuente de contaminación suele ser el propio producto de PCR amplificado, por lo cual es recomendable llevar a cabo la amplificación y manipulación de los productos amplificados en una zona diferente a donde se realiza la extracción del ARN y la preparación de la PCR. Es recomendable trabajar en áreas diferenciadas de pre- y post-PCR en donde se realice la manipulación del ARN problema y preparación de tubos de PCR (pre-PCR) y la amplificación y manipulación de los productos amplificados (post-PCR). Estas áreas deben estar separadas físicamente y debe emplearse distinto material de laboratorio (batas, pipetas, puntas..., etc.) para evitar la contaminación de las muestras con el ADN amplificado, lo que podría conducir a falsos diagnósticos positivos. El flujo de trabajo debe ir siempre en una única dirección, desde la zona de pre-PCR hasta la zona de post-PCR y nunca en dirección opuesta. Se debe evitar el flujo de material y personal desde la zona post-PCR a la zona pre-PCR. Además, a fin de evitar la contaminación con productos

de PCR previos, se incluye en el kit la enzima *Uracil DNA glycosylase (Cod-UNG)*, que degrada productos de PCR que contengan dUTP.

**Se recomienda incluir controles negativos de amplificación** sustituyendo la muestra de ARN por agua libre de RNasa/DNasa, con objeto de detectar y controlar cualquier posible contaminación de los reactivos con muestras problema o con productos amplificados.

- **Eliminación de residuos**

La manipulación de residuos generada por el uso de los productos comercializados por Vitro, S.A., debe realizarse de acuerdo con la legislación vigente en el país en el que estos productos sean usados. Como referencia, la siguiente tabla indica la clasificación de los residuos generados por este kit de acuerdo con la legislación europea, específicamente de acuerdo con la decisión de la comisión europea del 18 de diciembre de 2014 enmienda de la decisión 2000/532/CE sobre la lista de residuos conforme a la directiva 2008/98/CE del parlamento europeo y del consejo:

RESIDUOS POTENCIALES GENERADOS TRAS EL USO DE ESTE PRODUCTO	CÓDIGO ELW*	TIPO DE RESIDUO DE ACUERDO A ELW*
1. Desecho de Residuos líquidos	161001	“Residuos acuosos líquidos que contienen sustancias peligrosas” después de añadir un 10% del volumen total de un agente desinfectante. Si la desinfección no es llevada a cabo, estos residuos deben considerarse como “residuos cuyo almacenamiento y eliminación es sometida a requisitos especiales a fin de prevenir infección”
2. Material perecedero (tubos, puntas, etc.) 3. Cualquier elemento que haya estado en contacto con el material genético de partida	180103	“Residuos cuyo almacenamiento y eliminación es sometida a requisitos especiales a fin de prevenir infección”
4. Contenedor para reactivos usados clasificados como peligrosos (de acuerdo a la Ficha de Datos de Seguridad)	150110	“Envases que contienen residuos o contaminados por sustancias peligrosas”

Tabla 3. Clasificación de residuos generados por este kit de acuerdo con la legislación europea. \*ELW: Acrónimo del inglés *European Legislation of Waste*.

\*Nota: Esta clasificación se incluye como pauta general de actuación, estando bajo la responsabilidad final del usuario el cumplimiento de todas las regulaciones locales, regionales y nacionales sobre la eliminación de este tipo de materiales.

## 7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA CLÍNICA PARA ANÁLISIS

### 7.1 Toma de muestras

El kit **FLU-COVID RT-PCR** se ha validado para su uso partiendo de material genético purificado de lavado broncoalveolar y exudado naso- y orofaríngeo.

Las muestras de lavado broncoalveolar se toman en pacientes hospitalizados mediante un broncoscopio, a través de la instilación y posterior aspiración de líquido en uno o varios segmentos o subsegmentos pulmonares.

En el caso de los exudados naso- y orofaríngeos estas muestras son tomadas mediante el uso de torundas. El hisopo se inserta cuidadosamente hasta la parte posterior de la fosa nasal o de la faringe. La punta de la torunda debe ser de poliéster, rayón, o nylon, con un mango suave y flexible hecho de plástico (no se deben usar hisopos con punta de alginato de calcio o algodón). Una vez insertada, la torunda se mantiene en el mismo sitio hasta unos 10 segundos y a continuación se coloca en un tubo seco estéril o preferiblemente en un tubo con medio de transporte (por ejemplo, el medio de transporte universal UTM) para preservar la integridad de la muestra.

Las muestras son recolectadas en un recipiente estéril y se mantienen a 2-8 °C durante un máximo de 5 días. Una vez que las muestras son clasificadas o para almacenamientos prolongados se almacenan a -80 °C, con la finalidad de preservar la viabilidad viral. Los ácidos nucleicos extraídos deben ser almacenados a -80 °C.

## 7.2 Extracción de ácidos nucleicos desde lavados broncoalveolares y exudados naso- y orofaríngeos

El kit **FLU-COVID RT-PCR** ha sido ensayado con material genético purificado de lavados broncoalveolares, y exudados naso- y orofaríngeos humanos. Este kit ha sido validado con material genético de partida obtenido a partir de los siguientes kits de purificación de ADN/ARN y equipos de extracción\* partiendo de 200 µl de muestra clínica y eluyendo en 100 µl de tampón de elución:

KITS DE EXTRACCIÓN	EQUIPOS DE EXTRACCIÓN
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics)	MagNA Pure Compact Instrument. Versión 1.1.2 (Roche Diagnostics)
QIASymphony Certal Kits (Qiagen)	QIASymphony SP (Qiagen)
RNeasy Mini QIAcube Kit (Qiagen)	QIAcube (Qiagen)
PureLink Viral RNA/DNA extraction mini kit (Invitrogen)	Sistema manual
Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)	Maxwell® 16 (Promega)

Tabla 4. Kits y equipos de extracción empleados en la purificación de ADN/ARN a partir de muestras clínicas.

\*Nota: El sistema no ha sido validado con otros sistemas de extracción de ADN/ARN, por tanto, si se emplea otro sistema de purificación diferente éste debe verificarse previamente.

## 8 PROTOCOLO DE PCR

### 8.1 Preparación de la Mix de reacción

**Antes del primer uso**, agitar en vortex la **Solución de Reconstitución (MAD-LYO-SOL)** y reconstituir el vial que contiene la Master Mix liofilizada añadiendo 660 µl de esa solución de reconstitución por vial. Homogeneizar mediante 8 – 10 aspiraciones con micropipeta. La mix reconstituida debe usarse de la siguiente manera:

1. Mezclar en cada tubo de PCR los siguientes volúmenes para cada muestra:

Reactivo	V/test
FLU-COVID MMix	12 µl
Muestra	8 µl

2. Incluir un control negativo añadiendo 8 µl de la Solución de Reconstitución que va incluida en el kit.
3. Incluir un control positivo añadiendo 8 µl del DNA control positivo FLU-COVID PC incluido en el kit.
4. Centrifugar brevemente para asegurarse de que no quedan burbujas de aire en los pocillos.

***El exceso de mix reconstituida puede almacenarse a -20 °C en el mismo vial de cristal, con el tapón "stopper" y el de rosca hasta un máximo de 4 meses, para ser utilizada en ensayos posteriores.***

***Se recomienda mantener la MMix en placa fría durante la preparación de las muestras y no descongelar el vial una vez reconstituido más de cinco veces.***

**Para usos sucesivos**, la reacción de RT-PCR se llevará a cabo de la siguiente manera:

1. Descongelar FLU-COVID MMix y homogeneizar mediante varias aspiraciones-dispensaciones con micropipeta (no usar vortex).
2. Mezclar en cada tubo de PCR los siguientes volúmenes para cada muestra:

Reactivo	V/test
FLU-COVID MMix	12 µl
Muestra	8 µl

3. Incluir un control negativo añadiendo 8 µl de la Solución de Reconstitución que va incluida en el kit.
4. Incluir un control positivo añadiendo 8 µl del DNA control positivo FLU-COVID PC incluido en el kit.
5. Centrifugar brevemente para asegurarse de que no quedan burbujas de aire en los pocillos.

## 8.2 Configuración del instrumento de PCR a tiempo real

Introduzca en el software del instrumento las diferentes dianas y los canales de detección para cada una de ellas. Cree las muestras, el control positivo (PC), los blancos de PCR (NTC) y asigne las posiciones de las muestras en la placa de PCR.

Programa el equipo de PCR a tiempo real con los siguientes pasos:

PROGRAMA PCR		
25 °C	5 min	1 ciclo
50 °C	15 min	1 ciclo
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	15 seg	45 ciclos
56 °C*	40 seg	

Tabla 5. Programa de PCR del kit FLU-COVID RT-PCR.

\*Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de extensión (\*) a través de los canales FAM (SARS-CoV-2), ROX (FluA), HEX, JOE o VIC (FluB) y Cy5 (control interno).

El kit ha sido validado con los equipos:

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene Q (Qiagen)

Para su uso en otros equipos se recomienda verificar la compatibilidad de los fluorocromos con los canales de detección de cada equipo. Si bien los fluorocromos incluidos en el kit son compatibles con la mayoría de los equipos a tiempo real más comunes del mercado.

En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System la opción del control pasivo ROX tiene que estar desactivada.

En el termociclador Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System y Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú "Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties".

## 9 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Antes de interpretar los resultados de las muestras clínicas es necesario seguir la guía de interpretación de los controles positivo y negativo, según la siguiente tabla:

	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
<b>Control Positivo FLU-COVID</b>	Señal para los canales FAM, ROX, JOE y Cy5*	El control/reacción es correcta
	Ausencia de señal para FAM y/o ROX y/o JOE y/o Cy5	Problema en la amplificación: repetir análisis
<b>Control Negativo</b>	Señal para los canales FAM y/o ROX y/o JOE y/o Cy5	Contaminación repetir análisis
	Ausencia de señal	El control/reacción es correcta

\*La señal de amplificación debe determinarse por un aumento rápido y constante de los valores de fluorescencia y no por fenómenos pico o aumento gradual de la señal de fondo (fondo irregular o ruido de fondo elevado) (Fig 1).

El run se considera válido cuando se han obtenido resultados adecuados para todos los controles de reacción.

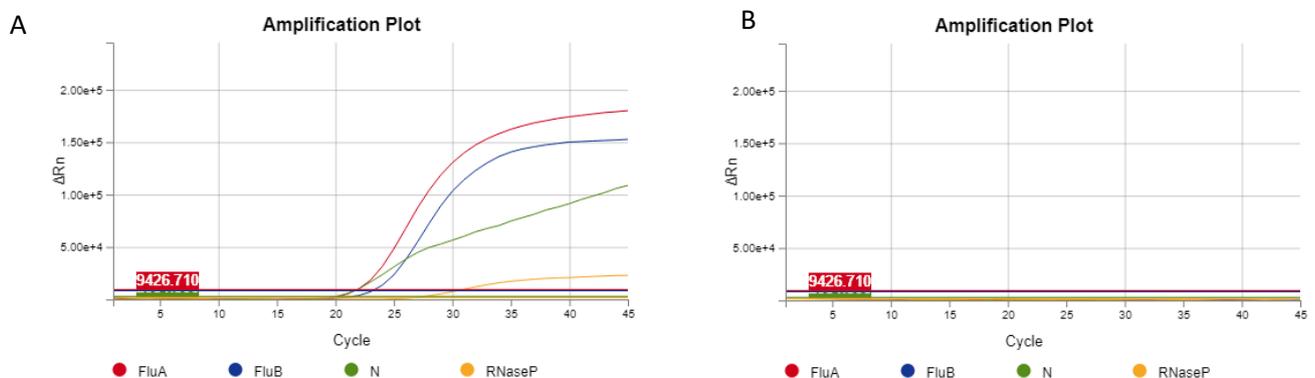


Figura 1: Ejemplo de gráficas de amplificación de un control positivo (A) y un control negativo (B). Experimento realizado en Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o hay falta de amplificación en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

Si el run ha sido dado por válido, interpretar los resultados de las muestras clínicas de acuerdo a la siguiente tabla:

FLU-COVID RT-PCR				INTERPRETACIÓN
SARS-CoV-2 (FAM)	FluA (ROX)	FluB (JOE)	RNasaP (Cy5)	
Señal	No señal	No señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2
			No señal	
No señal	Señal	No señal	Señal	Muestra positiva para influenza A
			No señal	
No señal	No señal	Señal	Señal	Muestra positiva para influenza B
			No señal	
No señal	Señal	Señal	Señal	Muestra positiva para influenza A e influenza B
			No señal	
Señal	Señal	No señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2 e influenza A
			No señal	
Señal	No señal	Señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2 e influenza B
			No señal	
Señal	Señal	Señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2, influenza A e influenza B
			No señal	
No señal	No señal	No señal	Señal	Resultado negativo <sup>(1)</sup>
			No señal	Inválido <sup>(2)</sup> : Problemas en la extracción o amplificación

<sup>(1)</sup> Negativo o por debajo del límite de detección del kit.

<sup>(2)</sup> Se recomienda repetir la extracción de RNA y/o repetir la RT-PCR o partir de una nueva toma.

Se recomienda usar el ajuste automático de umbral que realiza el software por defecto de cada instrumento y en caso necesario se puede ajustar el umbral de forma manual asegurando que cae dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y que el ruido de fondo queda debajo de la línea del umbral.

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es  $\leq 38$  aunque el control interno no muestre una gráfica de amplificación. En ocasiones, puede ocurrir que el control interno no se amplifique correctamente debido a la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico vírico diana, lo que puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno sí la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

## 10 CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

### 10.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit FLU-COVID RT-PCR se determinó realizando seis réplicas de diluciones seriadas de fragmentos sintéticos de cada una de las dianas desde  $10^7$  copias/rxn hasta  $10^1$  copias/rxn.

Se ha establecido que el kit FLU-COVID RT-PCR tiene un límite de detección de 10 copias/reacción para Influenza A, Influenza B y SARS-CoV-2 (Figura 2).

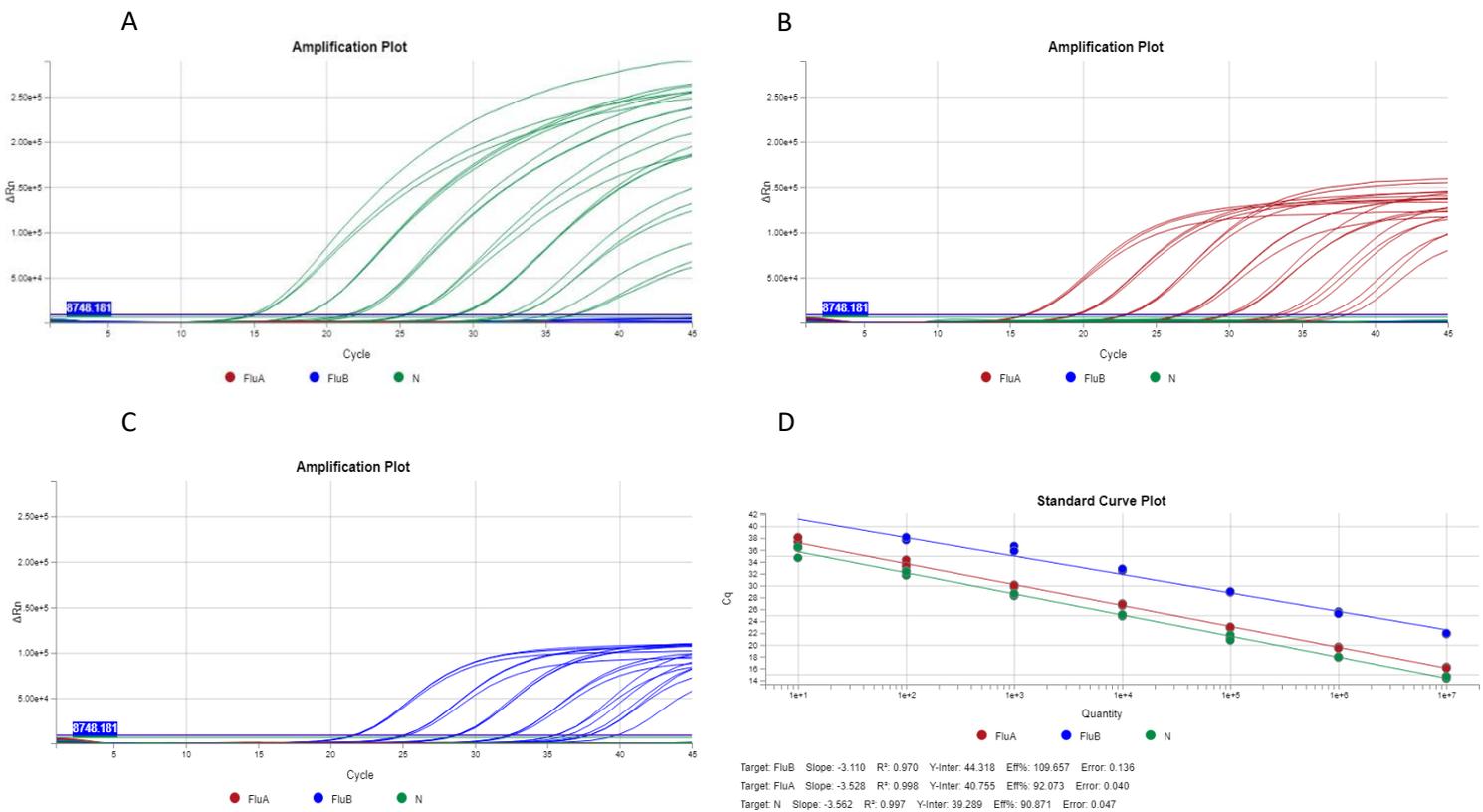


Figura 2: Diluciones seriadas desde  $10^7$  copias/rxn hasta  $10^1$  copias/rxn de fragmentos sintéticos de SARS-CoV-2 en el canal FAM (A), FluA en ROX (B) y FluB en el canal JOE (C). Rectas de calibración obtenidas para las tres dianas (D).

Ajustando los datos de Cts a una recta se determinó la eficiencia de amplificación,  $R^2$  y la pendiente para cada una de las dianas.

El gen N presentó una eficiencia del 90.87%, un  $R^2$  de 0.997 y una pendiente de -3.56. El gen Mp de FluA presentó una eficiencia del 92.07%, un  $R^2$  de 0.998 y una pendiente de -3.52. El gen Mp de FluB presentó una eficiencia del 109.66%, un  $R^2$  de 0.970 y una pendiente de -3.11.

## 10.2 Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del FLU-COVUD se confirmó probando muestras clínicas positivas para diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reactividad cruzada			
Adenovirus	-	Coronavirus humano NL63	-
Virus Parainfluenza humano 1	-	Coronavirus humano HKU1	-
Virus Parainfluenza humano 2	-	Bocavirus humano	-
Virus Parainfluenza humano 3	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A	-
Virus Parainfluenza humano 4	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) B	-
Virus rhinovirus humano	-	Enterovirus	-
Virus metapneumovirus humano	-	<i>Bordetella pertusis</i>	-
Coronavirus humano OC43	-	<i>Bordetella parapertussis</i>	-
Coronavirus humano 229E	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-

## 10.3 Sensibilidad y especificidad clínica

En un estudio retrospectivo se evaluaron un total de 42 muestras respiratorias que habían sido previamente analizadas con un método molecular de referencia. De ellas 8 eran positivas para SARS-CoV-2, 14 eran positivas para influenza A, 10 eran positivas para influenza B (en dos de ellas había coinfección con influenza A) y 10 negativas. La concordancia obtenida con el kit FLU-COVID RT-PCR fue del 100% para los tres virus mostrando una sensibilidad y especificidad del 100%.

## 11 LIMITACIONES DEL TEST

1. Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico.
2. Este ensayo puede utilizarse con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras respiratorias (frotis naso- y orofaríngeo y lavados broncoalveolares).
3. El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
4. Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
5. Un test positivo para FluA, FluB y/o SARS-CoV-2 no excluye la posibilidad de que otros patógenos estén presentes en la muestra clínica.

6. El test funciona dentro de las regiones genómicas en las que las sondas han sido diseñadas. Debido a la alta variabilidad del ARN es posible que ciertos subtipos no se detecten, no obstante, en el momento del diseño no se observaron mutaciones en las regiones diana.

7. Un resultado negativo del test no excluye que haya una infección por FluA, FluB y/o SARS-CoV-2 y no debería usarse como único método diagnóstico para establecer una pauta de tratamiento o de manejo del paciente.

8. Un resultado negativo del test debe ser analizado en el contexto de la historia clínica del paciente y de los datos epidemiológicos.

## 12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>
2. Chan, J.F. et al. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-N/He real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. J Clin Microbiol. Mar 4.
3. Corman, V.M. et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time PCR. Eurosurveill.; 25(3):2000045.
4. Galanti M., et al. Longitudinal active sampling for respiratory viral infections across age groups. Influenza Other Respir Viruses. 2019;13(3):226-32.
5. Kampf G., et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. J Hosp Infect. 2020;104(3):246-51.
6. Killerby M.E., et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2018; 101:52- 6.
7. Lai, C.C., et al. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. International journal of antimicrobial agents, p.105924.
8. Pan, Y. et al. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. The Lancet Infectious Diseases.
9. Paules C.I., et al. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. JAMA. 23 de enero de 2020.
10. Wang, W. et al. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. Published online March 11.

11. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance 19 March 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.

12. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation Report –14. Data as reported by 3 February 2020. Available from [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200203-sitrep-14-ncov.pdf?sfvrsn=f7347413\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200203-sitrep-14-ncov.pdf?sfvrsn=f7347413_2) Accessed February 2020.

13. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine., 2020.

### 13 SÍMBOLOS DE LA ETIQUETA

Explicación de los símbolos de la etiqueta del producto:

	Fecha de caducidad	<b>REF</b>	Número de catálogo
	Límite de temperatura	<b>LOT</b>	Código de lote
	Fabricante		Consúltese las instrucciones de uso
	Contenido suficiente para <n> ensayos	<b>IVD</b>	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>