

SARS-CoV-2 RT-PCR

Kit para la detección del virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mediante One-Step Real-Time RT-PCR



Consulte las instrucciones de uso adecuadas según el formato que utilice:

1. Formato Wet..... (16 pág.)
2. Formato Liofilizado..... (17 pág.)



PÁGINA EN BLANCO / BLANK PAGE

SARS-CoV-2 RT-PCR

Kit para la detección del virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave
Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mediante One-Step Real-Time RT-PCR

REF Ref. MAD-003941M
Ref. MAD-003941M-OP
Ref. MAD-003941M-EX

 100 determinaciones

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



TABLA DE CONTENIDO

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



1 USO PREVISTO

El kit **SARS-CoV-2 RT-PCR** es un kit de diagnóstico *in vitro* para la detección cualitativa del RNA del virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a partir del RNA extraído de muestras clínicas humanas de diferente origen como exudados naso- y orofaríngeos, lavados broncoalveolares (BAL) y saliva. Está basado en la técnica One-Step RT-PCR multiplex en tiempo real, utilizando cebadores y sondas fluorescentes para los genes diana N y E de SARS-CoV-2, siguiendo la metodología recomendada por la OMS (11).

El kit está diseñado para la detección universal de coronavirus SARS-like a través de los cebadores y sonda del gen E (Corman et al 2020) y para la detección específica de SARS-CoV-2 mediante los cebadores y sonda del gen N (sonda N2 descrita por la CDC).

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
Gen N	FAM
Gen E	ROX
RNasaP	JOE

Tabla 1. Canales de detección para las diferentes dianas del kit SARS-CoV-2 RT-PCR

Estado Microbiológico: Producto no estéril.

2 INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son virus ARN monocatenarios miembros de la subfamilia Orthocoronavirinae dentro de la familia Coronaviridae (orden Nidovirales). Esta subfamilia se divide en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*, en base a su estructura genética. Los *alpha-* y *betacoronavirus* infectan solo a mamíferos y normalmente son responsables de infecciones respiratorias en humanos y gastroenteritis en animales. Hasta la aparición del SARS-CoV-2, se habían descrito seis *alpha-* y *betacoronavirus* que infectaban seres humanos. Cuatro de ellos (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1) son responsables de un número importante de las infecciones leves del tracto respiratorio superior en personas adultas inmunocompetentes, pero que pueden causar cuadros más graves en niños y ancianos con estacionalidad típicamente invernal. Los betacoronavirus SARS-CoV y MERS-CoV, ambos patógenos emergentes ocasionaron dos brotes responsables de infecciones respiratorias graves de corte epidémico con gran repercusión internacional debido a su morbilidad y mortalidad. El betacoronavirus SARS-CoV-2 supone el séptimo coronavirus aislado y caracterizado capaz de provocar infecciones en humanos.

SARS-CoV-2 se identificó por primera vez en China en diciembre de 2019 como un agente viral que causa infecciones respiratorias agudas con síntomas que incluyen desde fiebre, tos seca e insuficiencia respiratoria hasta complicaciones más graves como neumonía, insuficiencia renal que acaban provocando la muerte. La

transmisión se produce por el contacto directo con personas infectadas o a través de gotas de saliva, tos o estornudos.

El diagnóstico rápido de la infección por SARS-CoV-2 es esencial para contener la propagación del virus. En este contexto, RT-PCR a tiempo real es la técnica más apropiada para la detección de virus, dada su alta sensibilidad y especificidad, y ahora es una herramienta de rutina en los laboratorios de diagnóstico.

3 COMPONENTES

El kit **SARS-CoV-2 RT-PCR** se comercializa como una Master Mix lista para uso 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 agua DEPC libre de RNasas y DNasas para incluirla en los controles negativos (NTC).

Componentes del kit para 100 test:

REFERENCIA (DESCRIPCIÓN)		CONTENIDO	CANTIDAD
MAD-003941M-100 (SARS-CoV-2 MMIX)	MAD-003941-MIX (SARS-CoV-2 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
	MAD-DDW-DEPC (RNase/DNase free water)	---	1 vial (200 µl)
MAD-COV-2 (SARS-CoV-2 PC)		DNA sintético no infeccioso conteniendo parte del genoma SARS-CoV-2 y DNA humano	1 vial (100 µl)

Tabla 2. Reactivos suministrados en el kit SARS-CoV-2 RT-PCR

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 **SARS-CoV-2 RT-PCR** se debe transportar y almacenar a -20 °C*. No obstante, además del transporte recomendado a -20 °C, también es posible realizar el transporte a temperatura de refrigeración (2 °C - 8 °C) siempre y cuando el tiempo de tránsito no supere un máximo de diez días. De cualquier modo, una vez recibido el kit debe ser almacenado a una temperatura de -20 °C.

La mezcla de reacción **SARS-CoV-2 MMix** es sensible a los cambios de estado físico y se ha demostrado que soporta hasta siete 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 SARS-CoV-2 MMix debe descongelarse antes de su uso y 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 o solicitada en regulatory@vitro.bio.
- El kit SARS-CoV-2 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 **SARS-CoV-2 RT-PCR** se ha validado para su uso partiendo de material genético purificado de lavado broncoalveolar, exudado naso- y orofaríngeo y saliva.

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.

Respecto a las muestras de saliva se recomienda no comer, beber, fumar ni masticar chicle durante 30 minutos antes de la toma de la muestra. Las muestras recogidas pueden estabilizarse para su transporte.

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, exudados naso- y orofaríngeos y saliva

El kit **SARS-CoV-2 RT-PCR** ha sido ensayado con material genético purificado de lavados broncoalveolares, exudados naso- y orofaríngeos humanos y saliva. 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 (para la purificación con Opentrons se parte de 92 µl de muestra clínica y se eluye en 50 µl de solución 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)
NX48S – Viral NA Kit (Genolution)	Nextractor NX-48S (Genolution)
RNA/DNA viral extraction kit (Robot Opentrons) (Vitro, ref. MAD-003955M)	Opentrons OT-2

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

La reacción de RT-PCR se lleva a cabo en un volumen final de 20 µl. Preparar la Master Mix de la siguiente manera:

1. Descongelar y homogeneizar SARS-CoV-2 MMix (no usar vortex), una vez descongelado centrifugar brevemente.
2. Mezclar en cada tubo de PCR los siguientes volúmenes para cada muestra:

Reactivo	V/test
SARS-CoV-2 MMix	12 µl
Muestra	8 µl

- Incluir un control negativo añadiendo 8 µl del agua que va incluida en el kit.
- Incluir un control positivo añadiendo 8 µl del DNA control positivo SARS-CoV-2 PC incluido en el kit.
- Centrifugar brevemente para asegurarse de que no quedan burbujas de aire en los pocillos.

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

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 SARS-CoV-2 RT-PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de extensión () a través de los canales FAM (gen N), ROX (gen E) y HEX, JOE o VIC (Control Interno).

El kit ha sido validado con los equipos:

- QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- StepOne™ 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™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems QuantStudio™ 3, 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™ 3 o 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
Control Positivo SARS-CoV-2	Señal para los canales FAM, ROX y JOE*	El control/reacción es correcta
	Ausencia de señal para FAM y/o ROX y/o JOE	Problema en la amplificación: repetir análisis
Control Negativo	Señal para los canales FAM y/o ROX y/o JOE	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.

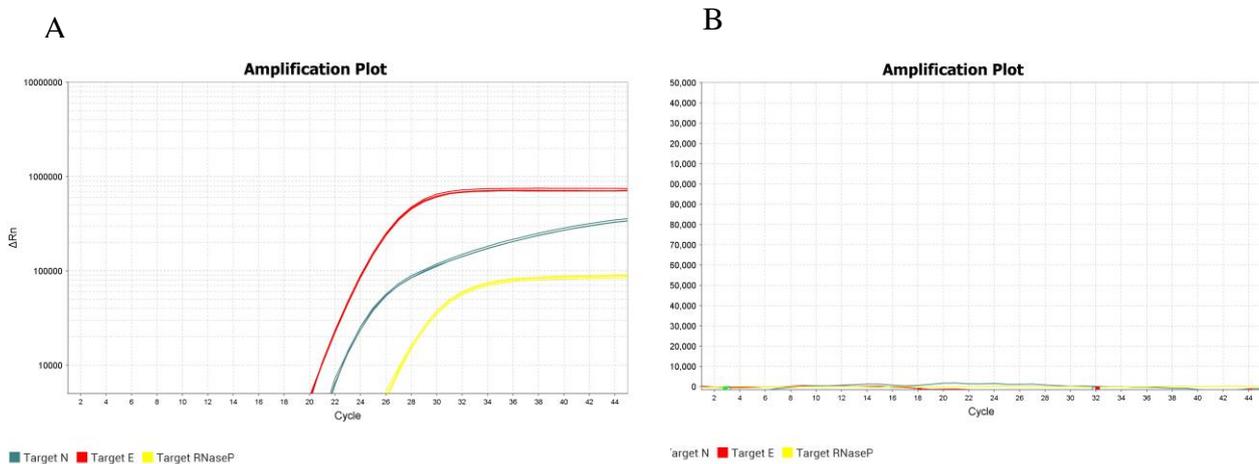


Figura 1: Gráficas de amplificación del control positivo PC (A) y de un control negativo con agua NTC (B). (Valores esperados de Cts para el PC: N (FAM) 21±2; E (ROX) 23 ±2; RNasaP (JOE) 20±2). Experimento realizado en Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System.

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

SARS-CoV-2 RT-PCR			INTERPRETACIÓN
FAM (gen N)	ROX (gen E)	JOE (Control interno)	
Señal	Señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2
		No señal	
No señal	No señal	Señal	Muestra negativa para SARS-CoV-2 ⁽¹⁾
		No señal	Muestra no válida, repetir análisis
Señal	No señal	Señal	Resultados inciertos ⁽²⁾
		No señal	Problemas en la extracción o amplificación: repetir análisis
No señal	Señal	Señal	Resultados inciertos ⁽²⁾
		No señal	Problemas en la extracción o amplificación: repetir análisis

⁽¹⁾ Negativo o por debajo del límite de detección del kit.

⁽²⁾ Se recomienda repetir la PCR o partir de una nueva extracción de RNA.

En una situación de pandemia, se puede aceptar como resultado positivo para SARS-CoV-2 si sólo uno de los dos genes E o N da resultados positivos.

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 ≤ 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 SARS-CoV-2 RT-PCR se determinó realizando seis réplicas de diluciones seriadas de fragmentos sintéticos de cada uno de los genes N y E a concentración conocida.

Se ha establecido que el kit SARS-CoV-2 RT-PCR tiene un límite de detección de 10 copias/reacción para los genes N y E (Figura 2).

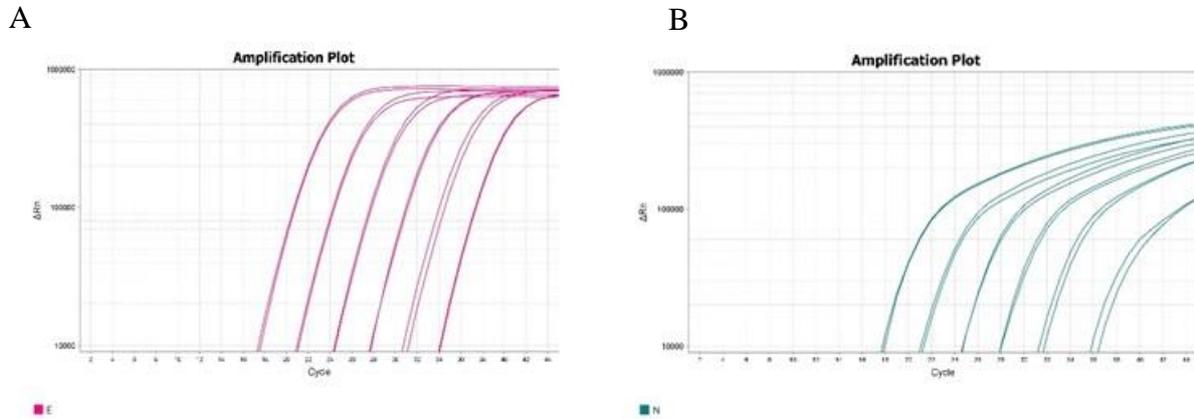


Figura 2: Diluciones seriadas desde 10⁶ copias/reacción hasta 10¹ copias/reacción de fragmentos sintéticos del gen N en el canal FAM (A) y gen E en el canal ROX (B).

La eficiencia de amplificación para cada una de las dianas se evaluó con seis diluciones seriadas de un standard de SARS-CoV-2 desde 10⁶ copias/rxn hasta 10¹ copias/rxn. Ajustando los datos de Cts a una recta se determinó la eficiencia de amplificación, R² y la pendiente para cada uno de los genes.

El gen N presentó una eficiencia del 90.15%, un R² de 0.996 y una pendiente de -3.58. El gen E presentó una eficiencia del 99.95%, un R² de 0.999 y una pendiente de -3.32. El kit SARS-CoV-2 RT-PCR detecta ambos genes a 10 copias/reacción.

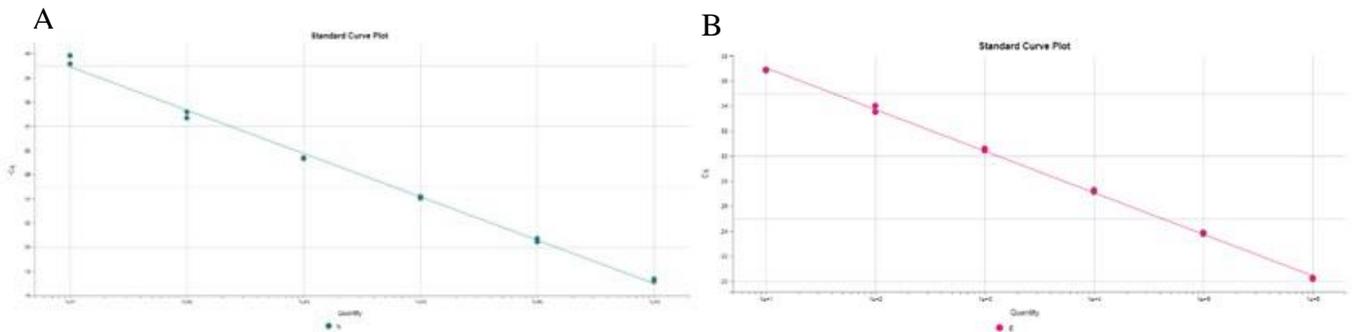


Figura 3: Rectas de calibración del gen N en el canal FAM (A) y gen E en el canal ROX (B) de un SARS-CoV-2 standard.

10.2 Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del SARS-CoV-2 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	
Microorganismo	Resultados
Adenovirus	Negativo
<i>Bordetella parapertussis</i>	Negativo
<i>Bordetella pertusis</i>	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Negativo
Bocavirus humano	Negativo
Coronavirus humano 229E	Negativo
Coronavirus humano HKU1	Negativo
Coronavirus humano NL63	Negativo
Coronavirus humano OC44	Negativo
Virus metapneumovirus humano	Negativo
Virus Parainfluenza humano 1	Negativo
Virus Parainfluenza humano 2	Negativo
Virus Parainfluenza humano 3	Negativo
Virus Parainfluenza humano 4	Negativo
Rinovirus humano	Negativo
Virus influenza A (H1N1)	Negativo
Virus influenza A (H3)	Negativo
Virus influenza B	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Virus Respiratorio Sinticial (VRS) A	Negativo
Virus Respiratorio Sinticial (VRS) B	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo

10.3 Sensibilidad y especificidad clínica

El kit SARS-CoV-2 RT-PCR fue evaluado con 40 muestras respiratorias anonimizadas del biobanco del Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIH). Este panel incluye 19 muestras positivas y 21 muestras negativas, previamente caracterizadas según metodología recomendada por la OMS y optimizada en el CNM.

Los resultados obtenidos con el kit SARS-CoV-2 RT-PCR muestran un total de 19 muestras positivas y 21 muestras negativas, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Se realizó otra validación del kit SARS-CoV-2 RT PCR con RNA extraído de 49 muestras clínicas de exudados naso- y orofaríngeos y lavados broncoalveolares y los resultados se compararon con otro método de referencia RT-PCR con marcado CE-IVD. Los resultados se resumen en la tabla de abajo y muestran un 100% de sensibilidad y especificidad del kit para detectar SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 RT-PCR kit	Método de referencia		
	+	-	Total
+	35	0	35
-	0	14	14
Total	35	14	49

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, lavados broncoalveolares y saliva).
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 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 tras realizar alineamientos con todas las secuencias depositadas del SARS-CoV-2.
7. Un resultado negativo del test no excluye que haya una infección por 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/HeJ 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 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 Y CAJA

	Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Fecha de caducidad
	Número de catálogo		Límite de temperatura
	Código de lote		Fabricante
	Consúltese las instrucciones de uso		Contenido suficiente para <n> ensayos
	Ficha de datos de seguridad		

14 HISTÓRICO DE CAMBIOS

Fecha	Descripción
2020-11-09	<ul style="list-style-type: none">• Incorporación de epígrafe de histórico de cambios.• Incorporación de explicación del pictograma de Ficha de Seguridad.• Se incluye una anotación en el epígrafe 9 haciendo referencia a una situación de pandemia.
2020-12-03	<ul style="list-style-type: none">• Se actualiza la tabla de reactividad cruzada del epígrafe 10.2
2021-04-14	<ul style="list-style-type: none">• Se incluye una nueva muestra en el epígrafe 7.
2021-05-20	<ul style="list-style-type: none">• Se incluyen dos nuevos kits y equipos de extracción de ácidos nucleicos.

PÁGINA EN BLANCO / BLANK PAGE

SARS-CoV-2 RT-PCR

Kit para la detección del virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave
Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mediante One-Step Real-Time RT-PCR

REF Ref. MAD-003941M
Ref. MAD-003941M-OP
Ref. MAD-003941M-EX

 100 determinaciones

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*

Directiva 98/79/CE



TABLA DE CONTENIDO

1	USO PREVISTO	3
2	INTRODUCCIÓN	3
3	COMPONENTES	4
4	MATERIAL ADICIONAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO	5
4.1	Reactivos y materiales.....	5
4.2	Equipamiento.....	5
5	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	5
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	6
7	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA CLÍNICA PARA ANÁLISIS	7
7.1	Toma de muestras.....	7
7.2	Extracción de ácidos nucleicos desde lavados broncoalveolares, exudados naso- y orofaríngeos y saliva.....	8
8	PROTOCOLO DE PCR	9
8.1	Preparación de la Mix de reacción.....	9
8.2	Configuración del instrumento de PCR a tiempo real.....	9
9	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	10
10	CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO	12
10.1	Sensibilidad analítica.....	12
10.2	Especificidad analítica.....	13
10.3	Sensibilidad y especificidad clínica.....	14
11	LIMITACIONES DEL TEST	15
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
13	SÍMBOLOS DE LA ETIQUETA Y CAJA	17
14	HISTÓRICO DE CAMBIOS	17



1 USO PREVISTO

El kit **SARS-CoV-2 RT-PCR** es un kit de diagnóstico *in vitro* para la detección cualitativa del RNA del virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a partir del RNA extraído de muestras clínicas humanas de diferente origen como exudados naso- y orofaríngeos, lavados broncoalveolares (BAL) y saliva. Está basado en la técnica One-Step RT-PCR multiplex en tiempo real, utilizando cebadores y sondas fluorescentes para los genes diana N y E de SARS-CoV-2, siguiendo la metodología recomendada por la OMS (11).

El kit está diseñado para la detección universal de coronavirus SARS-like a través de los cebadores y sonda del gen E (Corman et al 2020) y para la detección específica de SARS-CoV-2 mediante los cebadores y sonda del gen N (sonda N2 descrita por la CDC).

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
Gen N	FAM
Gen E	ROX
RNasaP	JOE

Tabla 1. Canales de detección para las diferentes dianas del kit SARS-CoV-2 RT-PCR

Estado Microbiológico: Producto no estéril.

2 INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son virus ARN monocatenarios miembros de la subfamilia Orthocoronavirinae dentro de la familia Coronaviridae (orden Nidovirales). Esta subfamilia se divide en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*, en base a su estructura genética. Los *alpha-* y *betacoronavirus* infectan solo a mamíferos y normalmente son responsables de infecciones respiratorias en humanos y gastroenteritis en animales. Hasta la aparición del SARS-CoV-2, se habían descrito seis *alpha-* y *betacoronavirus* que infectaban seres humanos. Cuatro de ellos (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HKU1) son responsables de un número importante de las infecciones leves del tracto respiratorio superior en personas adultas inmunocompetentes, pero que pueden causar cuadros más graves en niños y ancianos con estacionalidad típicamente invernal. Los betacoronavirus SARS-CoV y MERS-CoV, ambos patógenos emergentes ocasionaron dos brotes responsables de infecciones respiratorias graves de corte epidémico con gran repercusión internacional debido a su morbilidad y mortalidad. El betacoronavirus SARS-CoV-2 supone el séptimo coronavirus aislado y caracterizado capaz de provocar infecciones en humanos.

SARS-CoV-2 se identificó por primera vez en China en diciembre de 2019 como un agente viral que causa infecciones respiratorias agudas con síntomas que incluyen desde fiebre, tos seca e insuficiencia respiratoria

hasta complicaciones más graves como neumonía, insuficiencia renal que acaban provocando la muerte. La transmisión se produce por el contacto directo con personas infectadas o a través de gotas de saliva, tos o estornudos.

El diagnóstico rápido de la infección por SARS-CoV-2 es esencial para contener la propagación del virus. En este contexto, RT-PCR a tiempo real es la técnica más apropiada para la detección de virus, dada su alta sensibilidad y especificidad, y ahora es una herramienta de rutina en los laboratorios de diagnóstico.

3 COMPONENTES

El kit **SARS-CoV-2 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-003941M-100 (SARS-CoV-2 MMIX)	MAD-003941-MIX* (SARS-CoV-2 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 (Reconstitution solution)	---	1 vial (1700 µl)
MAD-COV-2 (SARS-CoV-2 PC)		DNA sintético no infeccioso conteniendo parte del genoma SARS-CoV-2 y DNA humano	1 vial (100 µl)

Tabla 2. Reactivos suministrados en el kit SARS-CoV-2 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 hibrar el vial añadiendo 660 µl de dicha solución.

Una vez reconstituida, la Mix se debe almacenar a 20 °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 **SARS-CoV-2 RT-PCR** se debe transportar a una temperatura entre 2 y 8 °C* y el almacenamiento a largo plazo debe ser el indicado en la etiqueta para cada uno de sus componentes: SARS-CoV-2 MMIX (mastermix y reconstituyente) a 2 y 8 °C y el SARS-CoV-2 PC (control positivo) a -20°C.

Una vez reconstituida, la mezcla de reacción **SARS-CoV-2 MMix** es estable durante 4 meses almacenada congelada a -20°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 SARS-CoV-2 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 o solicitada en regulatory@vitro.bio.
- El kit SARS-CoV-2 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 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 **SARS-CoV-2 RT-PCR** se ha validado para su uso partiendo de material genético purificado de lavado broncoalveolar, exudado naso- y orofaríngeo y saliva.

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.

Respecto a las muestras de saliva se recomienda no comer, beber, fumar ni masticar chicle durante 30 minutos antes de la toma de la muestra. Las muestras recogidas pueden estabilizarse para su transporte.

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, exudados naso- y orofaríngeos y saliva

El kit **SARS-CoV-2 RT-PCR** ha sido ensayado con material genético purificado de lavados broncoalveolares, exudados naso- y orofaríngeos humanos y saliva. 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)
NX48S – Viral NA Kit (Genolution)	Nextractor NX-48S (Genolution)
RNA/DNA viral extraction kit (Robot Opentrons) (Vitro, ref. MAD-003955M)	Opentrons OT-2

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
SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 Mix 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
SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 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.

Programe 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	
10 °C	∞	

Tabla 5. Programa de PCR del kit SARS-CoV-2 RT-PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de extensión () a través de los canales FAM (gen N), ROX (gen E) y HEX, JOE o VIC (Control Interno).

El kit ha sido validado con los equipos:

- QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- StepOne™ 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™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems QuantStudio™ 3, 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™ 3 o 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

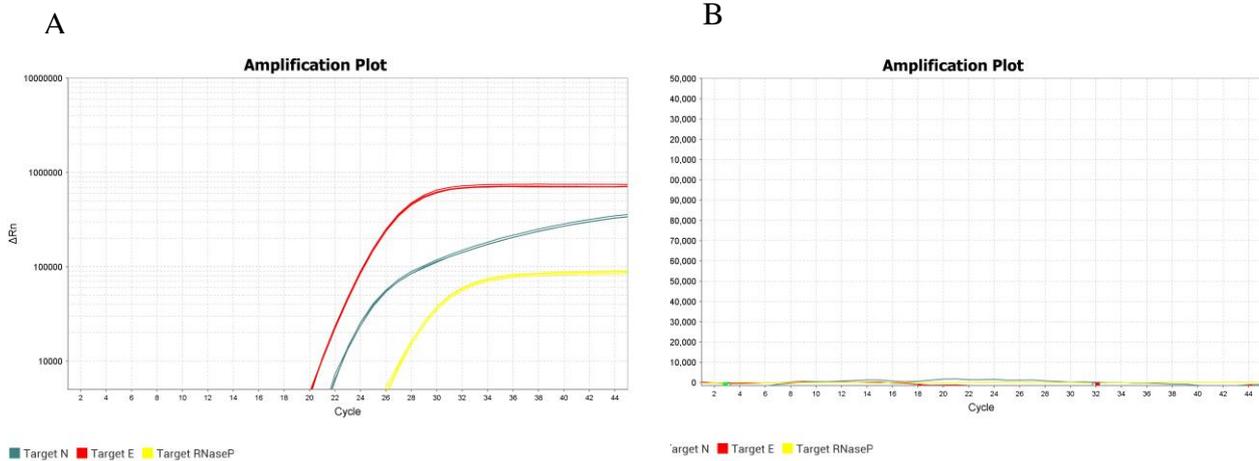
Antes de interpretar los resultados de las muestras clínicas es necesario seguir la guía de interpretación de los controles positivo y negativo, según la siguiente tabla:



	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Control Positivo SARS-CoV-2	Señal para los canales FAM, ROX y JOE*	El control/reacción es correcta
	Ausencia de señal para FAM y/o ROX y/o JOE	Problema en la amplificación: repetir análisis
Control Negativo	Señal para los canales FAM y/o ROX y/o JOE	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.



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

SARS-CoV-2 RT-PCR			INTERPRETACIÓN
FAM (gen N)	ROX (gen E)	JOE (Control interno)	
Señal	Señal	Señal	Muestra positiva para SARS-CoV-2
		No señal	
No señal	No señal	Señal	Muestra negativa para SARS-CoV-2 ⁽¹⁾
		No señal	Muestra no válida, repetir análisis
Señal	No señal	Señal	Resultados inciertos ⁽²⁾

		No señal	Problemas en la extracción o amplificación: repetir análisis
No señal	Señal	Señal	Resultados inciertos ⁽²⁾
		No señal	Problemas en la extracción o amplificación: repetir análisis

⁽¹⁾ Negativo o por debajo del límite de detección del kit.

⁽²⁾ Se recomienda repetir la PCR o partir de una nueva extracción de RNA.

En una situación de pandemia, se puede aceptar como resultado positivo para SARS-CoV-2 si sólo uno de los dos genes E o N da resultados positivos.

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 ≤ 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 SARS-CoV-2 RT-PCR se determinó realizando seis réplicas de diluciones seriadas de fragmentos sintéticos de cada uno de los genes N y E a concentración conocida.

Se ha establecido que el kit SARS-CoV-2 RT-PCR tiene un límite de detección de 10 copias/reacción para los genes N y E (Figura 2).

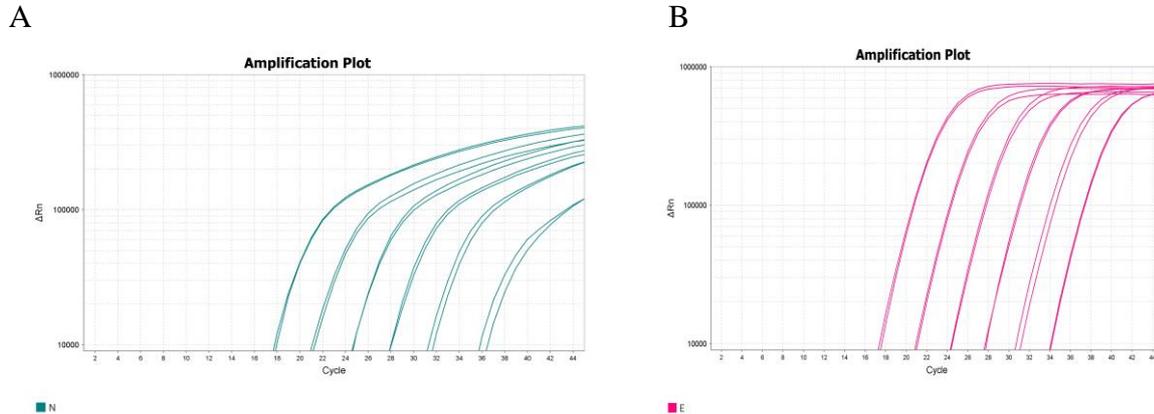


Figura 2: Diluciones seriadas desde 10^6 copias/reacción hasta 10^1 copias/reacción de fragmentos sintéticos del gen N en el canal FAM (A) y gen E en el canal ROX (B).

La eficiencia de amplificación para cada una de las dianas se evaluó con seis diluciones seriadas de un standard de SARS-CoV-2 desde 10^6 copias/rxn hasta 10^1 copias/rxn. Ajustando los datos de Cts a una recta se determinó la eficiencia de amplificación, R^2 y la pendiente para cada uno de los genes.

El gen N presentó una eficiencia del 90.15%, un R^2 de 0.996 y una pendiente de -3.58. El gen E presentó una eficiencia del 99.952%, un R^2 de 0.999 y una pendiente de -3.32. El kit SARS-CoV-2 RT-PCR detecta ambos genes a 10 copias/reacción.

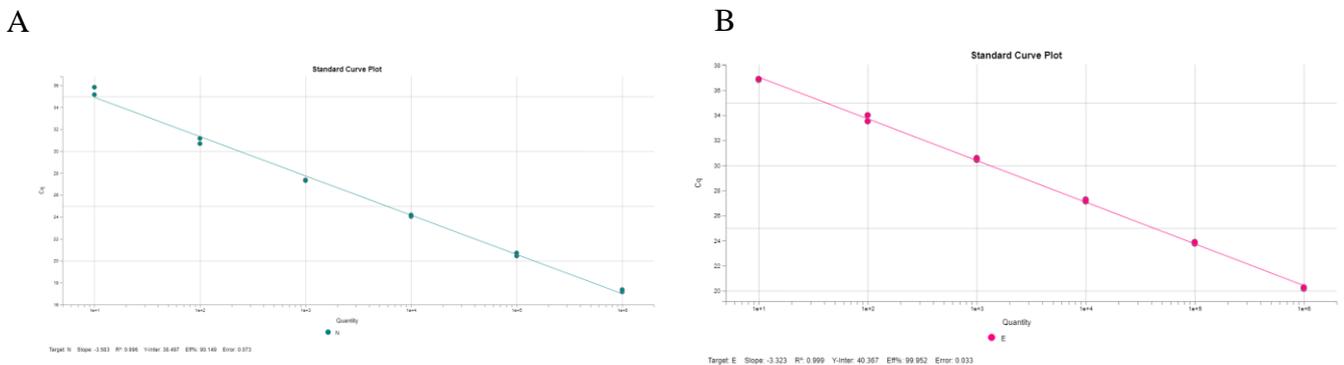


Figura 3: Rectas de calibración del gen N en el canal FAM (A) y gen E en el canal ROX (B) de un SARS-CoV-2 standard.

10.2 Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del SARS-CoV-2 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	
Microorganismo	Resultados
Adenovirus	Negativo
<i>Bordetella parapertussis</i>	Negativo
<i>Bordetella pertusis</i>	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Negativo
Bocavirus humano	Negativo
Coronavirus humano 229E	Negativo
Coronavirus humano HKU1	Negativo
Coronavirus humano NL63	Negativo
Coronavirus humano OC44	Negativo
Virus metapneumovirus humano	Negativo
Virus Parainfluenza humano 1	Negativo
Virus Parainfluenza humano 2	Negativo
Virus Parainfluenza humano 3	Negativo
Virus Parainfluenza humano 4	Negativo
Rinovirus humano	Negativo
Virus influenza A (H1N1)	Negativo
Virus influenza A (H3)	Negativo
Virus influenza B	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
Virus Respiratorio Sinticial (VRS) A	Negativo
Virus Respiratorio Sinticial (VRS) B	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo

10.3 Sensibilidad y especificidad clínica

El kit SARS-CoV-2 RT-PCR fue evaluado con 40 muestras respiratorias anonimizadas del biobanco del Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIII). Este panel incluye 19 muestras positivas y 21 muestras negativas, previamente caracterizadas según metodología recomendada por la OMS y optimizada en el CNM.

Los resultados obtenidos con el kit SARS-CoV-2 RT-PCR muestran un total de 19 muestras positivas y 21 muestras negativas, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Se realizó otra validación del kit SARS-CoV-2 RT PCR con RNA extraído de 49 muestras clínicas de exudados naso- y orofaríngeos y lavados broncoalveolares y los resultados se compararon con otro método de referencia RT-PCR con marcado CE-IVD. Los resultados se resumen en la tabla de abajo y muestran un 100%

de sensibilidad y especificidad del kit para detectar SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 RT-PCR kit	Método de referencia		
	+	-	Total
+	35	0	35
-	0	14	14
Total	35	14	49

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, lavados broncoalveolares y saliva).
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 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 tras realizar alineamientos con todas las secuencias depositadas del SARS-CoV-2.
7. Un resultado negativo del test no excluye que haya una infección por 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/HeV 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 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 Y CAJA

	Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Fecha de caducidad
	Número de catálogo		Límite de temperatura
	Código de lote		Fabricante
	Consúltese las instrucciones de uso		Contenido suficiente para <n> ensayos
	Ficha de datos de seguridad		

14 HISTÓRICO DE CAMBIOS

Fecha	Descripción
2020-11-09	<ul style="list-style-type: none"> Incorporación de epígrafe de histórico de cambios. Incorporación de explicación del pictograma de Ficha de Seguridad. Se incluye una anotación en el epígrafe 9 haciendo referencia a una situación de pandemia.
2020-12-03	<ul style="list-style-type: none"> Se actualiza la tabla de reactividad cruzada del epígrafe 10.2
2021-04-14	<ul style="list-style-type: none"> Se incluye una nueva muestra en el epígrafe 7.
2021-05-20	<ul style="list-style-type: none"> Se incluyen dos nuevos kits y equipos de extracción de ácidos nucleicos.