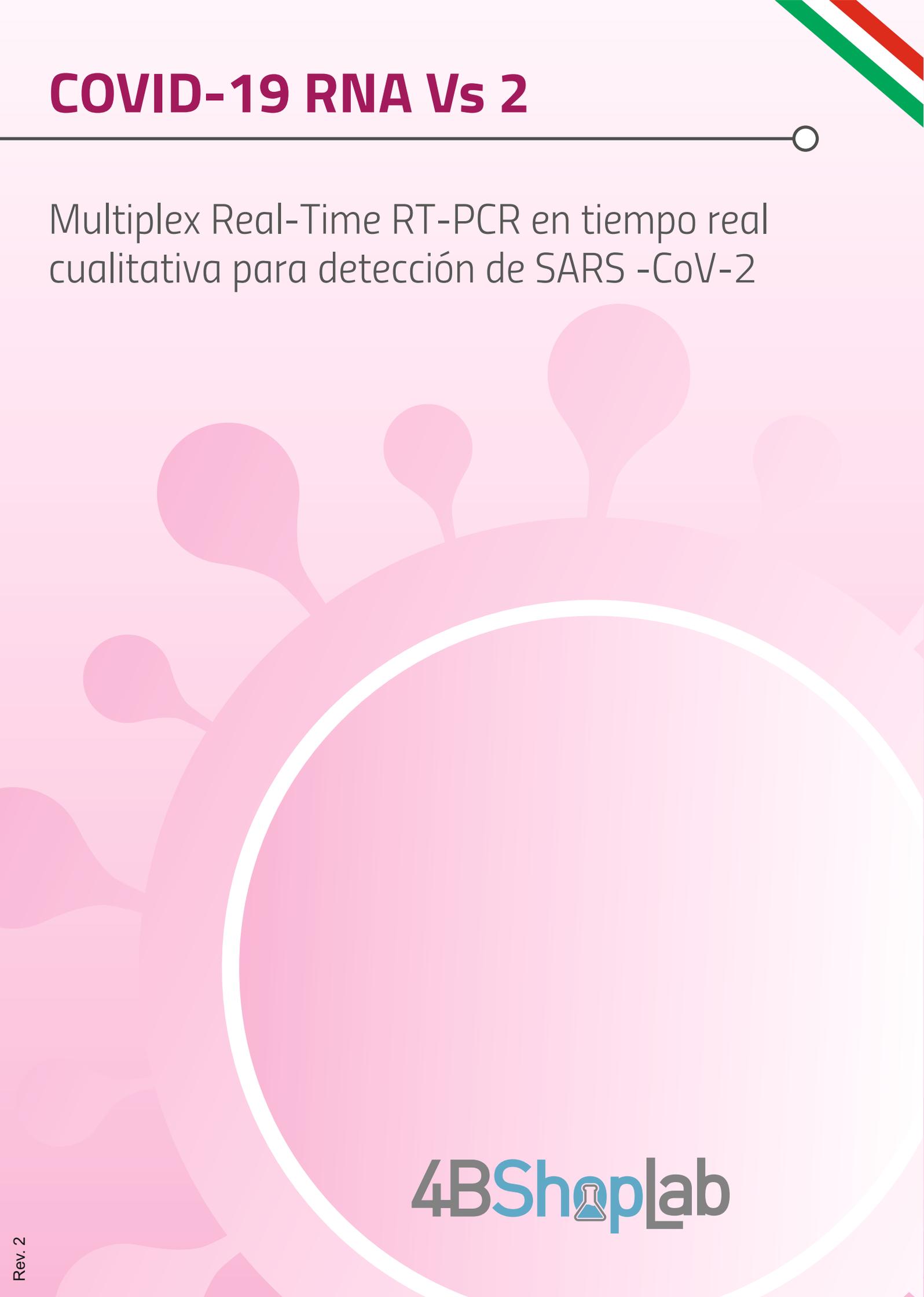


COVID-19 RNA Vs 2



Multiplex Real-Time RT-PCR en tiempo real
cualitativa para detección de SARS -CoV-2

4BShopLab

COVID-19 RNA Vs 2

A. USO PREVISTO

El kit Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex Real-Time RT-PCR codificado **COV19RNALYO.CE** está diseñado para la detección cualitativa específica de SARS-CoV-2 en muestras humanas (consulte el capítulo H) mediante retrotranscripción y amplificación simultáneas de la región objetivo específica del genoma de Sars-CoV-2 (gen RdRp y gen N). En el mismo tubo de reacción se utiliza un gen humano endógeno como control de la reacción de extracción / amplificación (Control interno).

El kit ha sido adaptado para su uso en los termocicladores en tiempo real y el ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versión 1.3.1, Applied Biosystems™ *) y CFX96 Real-Time System (Software CFX manager versión 1.7, Biorad™ **)

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus subsidiarias en los EE. UU. Y / o en algunos otros países.

** Biorad es una marca registrada.

B. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoV) es una gran familia de virus que causan enfermedades que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves.

Los signos comunes de infección incluyen síntomas respiratorios, fiebre, tos, dificultad para respirar. En casos más graves, la infección puede provocar neumonía, síndrome respiratorio agudo severo, insuficiencia renal e incluso la muerte. La enfermedad respiratoria causada por el nuevo coronavirus, detectada por primera vez en la ciudad de Wuhan, China, se ha denominado enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) y el virus se ha denominado SARS-CoV-2. El virus SARS-CoV-2 es un betacoronavirus, como MERS-CoV y SARS-CoV; son virus de ARN monocatenario, de sentido positivo y con envoltura de origen zoonótico. Los ensayos de RT-PCR COV19RNA.CE pueden detectar el ARN viral reduciendo los pasos de manipulación de muestras, proporcionando resultados rápidos y un riesgo realmente bajo de contaminación cruzada para la muestra bajo evaluación.

C. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit **COV19RNALYO.CE** se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicos.

El ARN del SARS-CoV-2, recuperado de la muestra biológica bajo investigación mediante un paso de extracción, se retrotranscribe y amplifica utilizando el sistema de amplificación en tiempo real. El Multiplex RT-PCR se basa en una reacción de un tubo realizada para cada muestra. El ensayo multiplex se dirige específicamente a dos regiones del SARS-CoV-2 (RdRp y N) y un control interno (IC) endógeno (GAPDH). Mientras tanto, el CI endógeno extraído, retrotranscrito y amplificado, sirve como control de Recolección / Extracción / Amplificación para cada muestra procesada individualmente con el objetivo de identificar una buena recolección de muestras respiratorias y la eventual identificación de inhibidores de reacción.

Nota Importante:

El conjunto de cebadores y sondas para la secuencia genómica del SARS-CoV-2 (gen N) está recomendado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

D. COMPONENTES

El formato estándar del código de producto COV19RNALYO.CE contiene reactivos para 100 pruebas.

Componentes	Contenido	COV19RNALYO.CE 100 Pruebas
A CODIFICADO: TODOS / MM-8 CODIGO DE COLOR: AZUL	Master Mix 5x	N ° 1 vial (Disuelva con el volumen de ALL / RB indicado en la etiqueta del vial)
RB CODIFICADO: TODOS / RB CODIGO DE COLOR: AZUL	Tampón de reconstitución de Master Mix	N ° 1 vial / 0,40 ml
B CODIFICADO: COV19 / CB CÓDIGO DE COLOR: AMARILLO	Cebadores / sondas liofilizados para el gen RdRp, Gen N y gen GAPDH	Vial N ° 2 (Disuelva con el volumen de ALL / C indicado en la etiqueta del vial)
C CODIFICADO: TODOS / C CÓDIGO DE COLOR: ROJO	Agua MG	N ° 1 vial/ 1,5 ml
NTC CODIFICADO: TODOS / NTC CODIGO COLOR: BLANCO	Control Negativo	N° 1 vial/1.5 ml
CTRL Control positivo RdRp / N CODIFICADO: COV19 / CTRL CÓDIGO DE COLOR: ROSA	Control positivo de ADN liofilizado para el gen RdRp, Gen N	Vial N ° 2 (Disuelva con el volumen de ALL / C indicado en la etiqueta del vial)
Inserto	Instrucción De uso	1

Nota importante: A pedido, DIA.PRO puede suministrar reactivos para 200 pruebas, como se indica a continuación:

1. Componente A	n°2 vial
2. Componente RB	n°2 vial/0,04 ml
3. Componente B	n°4 vial
4. Componente C	n°2 vial/1.5 ml
5. NTC	n°1 vial/1.5 ml
6. CTRL	n°4 vial
7. Inserto	n°1
Número de pruebas	200
Código	COV19RNALYO.CE.200

E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit COV19RNALYO.CE, después de recibir debe almacenarse a +2°C/+25°C (Temperatura ambiente).

Una vez disueltos, el Componente B (codificado COV19 / CB) y el Componente CTRL (codificado COV19 / CTRL)

son estables hasta por 90 días a -20 ° C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente, deben congelarse en alícuotas, evitando descongelar y congelar repetidamente. Solo se permiten tres procesos de descongelación.

Una vez que el componente ALL / MM-8 disuelto es estable hasta por 90 días a -20 ° C. Si el componente se va a utilizar sólo de forma intermitente, debe congelarse en alícuotas, evitando descongelar y congelar repetidamente. Solo se permiten cinco procesos de descongelación.

F. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl <volumen <1000 µl)
2. Kit de extracción de ARN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Microcentrifuga
6. Gradillas para tubos
7. Puntas filtradas esterilizadas con barrera de aerosol
8. Microtubos libres de nucleasas
9. Microtubos de 0,2 ml o Microplacas PCR recomendadas
10. Guantes desechables sin polvo
11. Termociclador de PCR en tiempo real (*)
12. Pañuelos de papel absorbentes
13. Vortex o herramientas de mezcla similares.

(*) Atención: se debe realizar una calibración válida de los colorantes puros (Archivo Componente Pure Spectra) y del fondo (Archivo Componente Fondo) de forma rutinaria.

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El kit debe ser utilizado únicamente por personal técnico capacitado y debidamente capacitado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe estar profundamente capacitado en el uso de termocicladores en tiempo real, en la manipulación de reactivos de Biología Molecular y capacitado en los protocolos de amplificación por PCR en tiempo real.
3. El kit debe ser utilizado en un laboratorio certificado y habilitado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de Salud o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal involucrado en la realización del ensayo debe usar ropa protectora de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Se debe evitar el uso de cualquier dispositivo afilado (agujas) o cortante (cuchillas). Todo el personal involucrado debe estar capacitado en procedimientos de bioseguridad, según lo recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, EE. UU. E informado en la publicación del Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", de 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra el VHB y el VHA, para lo cual se dispone de vacunas seguras y eficaces.
6. El entorno del laboratorio debe controlarse para evitar contaminantes como el polvo o agentes microbianos en el aire, al abrir los viales del kit y los Componentes y al realizar la prueba.
7. Los componentes A / CB son sensibles a la luz. Protéjalos de la exposición a una luz intensa.
8. Evite la vibración de la superficie del banco donde se realiza la prueba.
9. Una vez recibido, almacenar el kit a +2°C/+25°C.
10. No intercambie componentes entre diferentes lotes de kits. Se recomienda que no se intercambien componentes entre kits del mismo lote.
11. Compruebe que los reactivos sean transparentes y no contengan partículas pesadas o agregados visibles. De lo

contrario, informe al supervisor del laboratorio que inicie los procedimientos necesarios para el reemplazo del kit.

12. Evite la contaminación cruzada entre muestras utilizando puntas desechables y cambiándolas después de cada muestra.

13. Evite la contaminación cruzada entre los reactivos del kit utilizando puntas desechables y cambiándolas entre el uso de cada uno.

14. No utilice el kit después de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta del contenedor externo.

15. Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras humanas deben manipularse de acuerdo con las Directrices de bioseguridad de la OMS y los CDC más recientes para el manejo y procesamiento de muestras asociadas con la enfermedad por coronavirus 2019

16. Almacene y extraiga las muestras por separado de los otros reactivos y utilice una sala separada para su manipulación.

17. Realizar todas las operaciones de trabajo lo más rápido posible manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de enfriamiento.

18. El Workflow del laboratorio debe proceder de forma unidireccional, comenzando en el Área de Extracción y pasando a las Áreas de Amplificación y Análisis de Datos. No devuelva las muestras, el equipo y los reactivos al área donde se han realizado los pasos anteriores.

19. Se recomienda el uso de artículos de plástico desechables en la preparación de los componentes líquidos o en la transferencia de componentes a estaciones de trabajo automatizadas, para evitar la contaminación cruzada.

20. Los residuos producidos durante el uso del kit deben eliminarse de conformidad con las directivas y leyes nacionales relativas a los residuos de laboratorio de sustancias químicas y biológicas. En particular, los desechos líquidos generados por los procedimientos de extracción de muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso e inactivarse antes que los desechos. No poner en contacto los residuos de extracción con lejía.

21. Los derrames accidentales de muestras y operaciones deben adsorberse con pañuelos de papel empapados con lejía y luego con agua. Luego, los tejidos deben desecharse en contenedores adecuados designados para desechos de laboratorio / hospital.

22. Otros materiales de desecho generados (ejemplo: puntas utilizadas para muestras) deben manipularse como potencialmente infecciosos y desecharse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales relativas a los desechos de laboratorio.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

Para las pruebas de diagnóstico iniciales de COVID-19, el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, EE. UU. (CDC) recomienda recolectar y realizar pruebas de las vías respiratorias superiores (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos) y respiratorias inferiores (esputo, si es posible) para aquellos pacientes con tos productiva. No se recomienda la inducción de esputo. Las muestras deben recolectarse tan pronto como sea posible una vez que se identifique a una persona bajo investigación (PUI), independientemente del momento en el que aparezcan los síntomas.

1. Recolecte 2-3 ml de lavado broncoalveolar y muestra de aspirado traqueal en un recipiente de recolección de esputo estéril, a prueba de fugas y con tapón de rosca o en un recipiente seco estéril. Refrigere la muestra a 2-8 ° C (≤ 48 h).

2. Haga que el paciente se enjuague la boca con agua y luego expectore el esputo de la tos profunda directamente en un recipiente estéril, a prueba de fugas y con tapón de rosca para recolección de esputo o en un recipiente seco estéril. Refrigere la muestra a 2-8 ° C (≤ 48 h).

3. Para muestras nasofaríngeas (NP) y orofaríngeas (OP), utilice solo hisopos de fibra sintética con ejes de plástico. No utilice hisopos de alginato de calcio o hisopos con varillas de madera, ya que pueden contener sustancias que inactivan algunos virus e inhiben las pruebas de PCR. Coloque los hisopos inmediatamente en tubos estériles que contengan 2-3 ml de medio de transporte viral. Las muestras de NP y OP deben conservarse en viales separados. Refrigere la muestra a 2-8 ° C (≤ 5 días).
4. Recoger 2-3 ml de lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal en una taza estéril, a prueba de fugas, de recogida de esputo atornillado o recipiente seco estéril. Refrigerar la muestra a 2-8oC (≤ 48h).
5. Evite cualquier adición de conservantes a las muestras.
6. Las muestras deben identificarse claramente con códigos o nombres para evitar una interpretación errónea de los resultados.
7. Las muestras que quieran estar en stock durante un período más largo deben almacenarse a -70oC. Evite ciclos repetidos de congelación/descongelación.
8. Cuando utilice muestras congeladas, descongele las muestras justo antes de la extracción para evitar casos de degradación del ácido nucleico.
9. Se recomienda la recogida de muestras séricas (muestra aguda y muestra convaleciente) para realizar más pruebas serológicas.
10. Todos los especímenes recogidos para investigaciones de laboratorio deben considerarse potencialmente infecciosos.
11. Los trabajadores sanitarios que recojan o transporten muestras clínicas deben adherirse rigurosamente a las directrices de prevención y control de infecciones y a las reglamentaciones nacionales o internacionales para el transporte de sustancias infecciosas a fin de minimizar la posibilidad de exposición a patógenos.

I. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y ADVERTENCIAS

Master Mix:

Component A

- Abra cuidadosamente la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver homogéneamente el componente liofilizado A con el volumen de componente RB (Código: ALL/RB) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantenerlo en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15°C <RT< 25°C)
- Mezclar bien.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protéjalo de la exposición de luz fuerte.

Component RB

- Centrifugar el vial a 11000 rpm durante 1 min.
- Abra cuidadosamente la tapa del vial
- Transfiera 400ul del componente RB (código: ALL/RB) al vial del componente A (código: ALL/MM-8)

Primers/Probes para RdRp gene, N gene y GAPDH gene

Component B

- Centrifugar el vial a 11000 rpm durante 1 min.
- Abra cuidadosamente la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver homogéneamente el componente B liofilizado con el volumen del componente C (Código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantenerlo en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15oC <RT< 25oC)
- Mezcle por un período de tiempo breve en el vortex

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protéjalo de la exposición de luz fuerte.

MG Water:

Component C. Listo para usar.

Control negativo:

NTC. Listo para usar.

Control positivo para el gen RdRp y N:

Component CTRL

- Centrifugar el vial a 11000 rpm durante 1 min.
- Abra cuidadosamente la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver homogéneamente el componente B liofilizado con el volumen del componente C (Código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantenerlo en la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15°C <RT< 25°C)
- Breve vórtice

L. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS EN COMBINACION CON EL KIT

1. Las **micropipetas** deben calibrarse y deben someterse a una descontaminación regular (alcohol doméstico, solución del 10% de lejía, desinfectantes de grado hospitalario) de aquellas partes que puedan entrar accidentalmente en contacto con la muestra. También deben mantenerse regularmente con el fin de mostrar una precisión del 1% y una veracidad de +/-5%.
2. **Dispositivo de extracción:** El COV19RNALYO. CE Kit está diseñado para ser utilizado en combinación sólo con QIAamp Viral RNA Mini kit Coded:52904 (QIAGEN), NucleoSpin Virus Kit Coded: FC140983 (Macherey-Nagel) y QIAamp MinElute Virus Spin kit Coded: 57704 (QIAGEN). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones para su uso suministrada por los fabricantes.
3. **Termocicladores** en tiempo real. El COV19RNALUO. CE Kit está diseñado para su uso en combinación únicamente con los ciclos térmicos en tiempo real ABI 7500, software SDS versión 1.3.1 (Applied Biosystems) y CFX96 Real-Time System, Software CFX Manager versión 1.7, Biorad™
4. Los usuarios finales deben seguir estrictamente las Instrucciones de Instrumentos para su uso suministrado por los fabricantes.

M. CONTROLES Y OPERACIONES PREVIAS AL ENSAYO

1. Compruebe la fecha de caducidad del kit impreso en la etiqueta externa de la caja del kit. No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes no estén contaminados por partículas o agregados visibles a simple vista. Compruebe que no se ha producido ninguna rotura en el transporte y que no haya derrames de líquido dentro de la caja.
3. Encienda los termocicladores, compruebe la configuración y asegúrese de utilizar el protocolo de ensayo correcto.
4. Siga el Manual de Instrumentos suministrado por los fabricantes para el ajuste correcto del termociclador en tiempo real.
5. Compruebe que las micropipetas estén ajustadas al volumen requerido.
6. Compruebe que todos los demás equipos estén disponibles y listos para usar.
7. En caso de problemas, no siga adelante con la prueba y aconseje al supervisor.

N. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

El ensayo debe llevarse a cabo de acuerdo con lo que se indica aquí a continuación.

N.1 Extracción de ARN

La etapa de extracción del ARN genómico Wuhan COVID-19 debe llevarse a cabo exclusivamente en combinación con los siguientes kits:

Material	Descripción	código Kit	fabricante
Muestras respiratorias / Suero	Nucleospin Virus kit	740983	MN™
	QIAamp Viral RNA mini kit®	52904	Qiagen™
	QIAamp Virus MinElute kit®	57704	Qiagen™

El aislamiento del ARN debe llevarse a cabo únicamente de acuerdo con el Manual de Instrucciones suministrado por el fabricante (QIAGEN™; MN™).

Nota importante: Los siguientes volúmenes deben utilizarse estrictamente en los procedimientos de extracción:

Descripción	Volumen de la muestra µl	Volumen de elución µl
NucleoSpin Virus kit	400	60
QIAamp Viral RNA mini kit®	140	60
QIAamp Virus MinElute kit®	200	100

El ARN recogido de las muestras, no utilizado en la ejecución, debe almacenarse congelado (-18°C/-22°C).

Nota importante:

El valor de Tc de control interno para la muestra negativa se utiliza para evaluar si la colección de muestras y los procedimientos de extracción de ARN se han realizado correctamente (ver sección Q).

N.2 Configuración de la reacción

El COV19RNALYO. CE Kit está diseñado para su uso en combinación únicamente con el Termociclador en tiempo real ABI 7500, software SDS versión 1.3.1 (Applied Biosystems) y CFX96 Real-Time System, Software CFX Manager versión 1.7, Biorad™

N.2.1 Preparación del RT-PCR

Importante: Un ejemplo de esquema de dispensación se informa en la Sección O. Por favor, refiérase a él antes de iniciar las operaciones descritas a continuación.

- Preparar los componentes como se describe en la Sección I;
- Preparar el número necesario de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pozos para las muestras bajo evaluación y para el control positivo (preparado como se describe en la sección I).

Nota importante:

1- Utilice únicamente tubos ópticos o microplacas

sugeridos por los fabricantes de termocicladores en tiempo real.

- Tenga en cuenta que las muestras, si es posible, deben probarse por duplicado;
- Incluir al menos 1 tubo para el NTC (control negativo)
- Prepare la mezcla de reacción para muestras, NTC y control positivo (CTRL) como tabla siguiente:

Preparación de la mezcla de reacción

Número de reacciones		x1	x12
A	Master Mix	4 µl	48 µl
B	Cebadores / sondas	2 µl	24 µl
C	MG Agua	4 µ	48 µl
Tot vol.		10 µl	120 µl

- Dispensar 10 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o microplaca bien
- Añadir 10 µl de las muestras, NTC, CTRL a los tubos de reacción.
- Cierre firmemente los tubos de reacción
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm
- No deje los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos y con exposición a la luz (cubra los tubos).
- Cargue los tubos de reacción en el soporte de termobloqueo termociclador en tiempo real.
- Después de las operaciones de ajuste descritas en las Secciones N3 (Programación de Instrumentos) inicie la ejecución de termociclar.

N.3 Programación de instrumentos

Para la programación del instrumento, consulte el Manual de instrucciones de instrumentación proporcionado por los fabricantes.

N.3.1 Perfil térmico RT-PCR

El perfil térmico se indica en la siguiente tabla:

Paso	Ciclo	Temp.	Tiempo
1	1	50°C	20 min
1	1	95°C	10 min
2	45	95°C	15 sec
		58°C (*)	45 sec

NOTA IMPORTANTE: (*) paso para la recopilación de datos en tiempo real.

ADVERTENCIA: Mantenga la atención en la configuración del Termociclo en tiempo real con el perfil térmico correcto siguiendo el Manual del instrumento suministrado por el fabricante del instrumento.

N.3.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores en tiempo real sugeridos (CFX96 y ABI7500) seleccione los detectores reportados en la siguiente tabla:

Gen RdRp / Gen N / Detección de control interno

Detección	Reporte	Quencher
POL (Gen RdRp)	FAM	No fluorescente
NUC (Gen N)	Cy5	No fluorescente
Control Interno (IC)	JOE/VIC	No Fluorescente
Referencia Pasiva (ABI7500)	ROX	

ADVERTENCIA: Mantenga la atención al configurar el Termociclador en tiempo real con los ajustes correctos siguiendo el Manual de Instrumentos suministrado por el fabricante.

O. ESQUEMA DESAY

A continuación, se indica un ejemplo del esquema de dispensación para el Análisis:

Microplate or tubes

	1	2	3
A	CTRL		
B	NTC		
C	Muestra 1		
D	Muestra 2		
E	Muestra 3		
F	Muestra 4		
G	Muestra 5		
H	Muestra 6		

Leyenda: NTC = Control Negativo; CTRL = COVID-19 DNA Control Positivo y Gen RdRp y Gen N; Muestra1,2,3,etc... = Muestras en evaluación.

P. CONTROL INTERNO DE LA CALIDAD

P.1 Pre - Ajustes de análisis

Antes de iniciar el análisis:

- Establecer la "línea de base" (el nivel de fluorescencia de fondo) como se indica a continuación:

"Baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Auto Baseline
BIORAD™ CFX96®	Auto Calculated Baseline

- Ajustar manualmente la fluorescencia FAM/Cy5/JOE/VIC "Umbral"

"Threshold"	ABI™PRISM® 7500 SDS
FAM (POL)	0.15
Cy5 (NUC)	0.15
JOE (IC)	0.15

"Threshold"	BIORAD™ CFX96®
FAM (POL)	250
Cy5 (NUC)	250
VIC (IC)	150

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en el Control Positivo cada vez que se utiliza el kit para verificar si sus valores de Ct son los esperados y se informan en la siguiente tabla.

Chequeo	Requisitos
CTRL	Ct (Threshold Cycle) < 28.5

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra de muestra se supone que el valor JOE/VIC Ct de control interno valida la recopilación, extracción y detección de ARN SARS-CoV-2 como se describe en la tabla siguiente:

POL - FAM	NUC - CY5	Control interno - JOE/VIC	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	MUESTRA POSITIVA	Ct < 33	CORRECTO
		Ct ≥ 33 or indeterminada	CORRECTO*
MUESTRA NEGATIVA	MUESTRA NEGATIVA	Ct < 33	CORRECTO
		Ct ≥ 33 or indeterminada	INVALIDO**
MUESTRA NEGATIVA	MUESTRA POSITIVA	Ct < 33	INVALIDO***
		Ct ≥ 33 or indeterminada	INVALIDO**
MUESTRA POSITIVA	MUESTRA NEGATIVA	Ct < 33	INVALIDO***
		Ct ≥ 33 or indeterminada	INVALIDO**

* La alta concentración inicial de ARN SARS-CoV-2 en la muestra puede conducir a una señal fluorescente REDUCED o ABSENT para el IC de control interno debido a la competencia de reactivos.

** Pueden producirse problemas durante la recogida (muestra inicial que contiene un número insuficiente de células) o durante la etapa de extracción (presencia de inhibidores) o durante el paso de amplificación (ineficiente o ausente retrotranscripción/amplificación) que conduce a un resultado incorrecto.

El procedimiento de prueba debe repetirse a partir del paso de extracción y/o utilizando una nueva muestra procedente del paciente.

*** Pueden producirse problemas durante el paso de extracción o durante el paso de amplificación (ineficiente o ausencia de retrotranscripción/amplificación) lo que conduce a un resultado incorrecto. El procedimiento de prueba debe

repetirse a partir del paso de extracción y/o utilizando una nueva muestra procedente del paciente.

Si el resultado se confirma dos veces, la muestra podrá ser positiva para otro sarbecovirus.

Los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta los síntomas clínicos y los demás parámetros de laboratorio relacionados con las condiciones del paciente.

Los siguientes resultados son posibles:

Tabla de solución de problemas

	POL-FAM	NUC-CY5	JOE	Resultados	CHECK
Muestra desconocida	+	+	+/-	RESULTADO CORRECTO Positivo	¡IMPORTANTE! La alta concentración inicial de ARN SARS-CoV-2 puede conducir a la señal fluorescente REDUCIDO o AUSENTE de Control Interno I.C. debido a la Competencia de reactivos.
Muestra desconocida	+	-	-/+	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento de recogida/amplificación	1. Que el tinte CY5 esté seleccionado para la detección NUC y los tintes JOE/VIC para la detección IC; 2. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 3. que el kit se ha almacenado correctamente; 4. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado 5. que el procedimiento de extracción se haya ejecutado correctamente;
Muestra desconocida	-	+	-/+	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento de recogida/amplificación	1. Que el tinte FAM esté seleccionado para la detección de POL y los tintes JOE/VIC para la detección IC; 2. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 3. que el kit se ha almacenado correctamente; 4. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado 5. que el procedimiento de extracción se haya ejecutado correctamente;
MUESTRA desconocida	-	-	-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento de recogida/amplificación	1. que los componentes se han preparado correctamente 2. que no se ha cometido ningún error en el procedimiento de ensayo; 3. Que el tinte FAM se selecciona para la detección de POL, el tinte CY5 para la detección NUC y los tintes JOE/VIC para la detección IC; 4. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el kit se ha almacenado correctamente; 6. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado el tubo 7. que el procedimiento de extracción se haya

					ejecutado correctamente;
MUESTRA desconocida	-	-	+	RESULTADO CORRECTO <u>Negativo</u>	
CTRL	+	+	-	RESULTADO CORRECTO	¡IMPORTANTE: NO Control interno I.C. señal en CTRL porque control endógeno.
CTRL	-	-	-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteo o en el procedimiento	1. que los componentes se han preparado correctamente 2. que no se ha cometido ningún error en el procedimiento de ensayo; 3. Que el tinte FAM esté seleccionado para la detección de POL y que el tinte CY5 esté seleccionado para la detección NUC 4. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el kit se ha almacenado correctamente; 6. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado el tubo
CTRL	-	+	-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Error en el procedimiento	1. Que el tinte CY5 esté seleccionado para la detección NUC 2. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 3. que el kit se ha almacenado correctamente; 4. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado
CTRL	+	-	-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Error en el procedimiento	1. Que el tinte FAM esté seleccionado para la detección de POL 2. que el análisis se ha ejecutado con la configuración correcta del instrumento; 3. que el kit se ha almacenado correctamente; 4. que ningún posible inhibidor de la PCR haya sido contaminado
NTC	-	-	-	RESULTADO CORRECTO	¡IMPORTANTE: NO Control interno I.C. señal en NTC porque control endógeno.
NTC	+	-	+/-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se han preparado correctamente 2. que no se ha cometido ningún error en el procedimiento de ensayo; 3. que el espacio de trabajo y los instrumentos se descontaminan a intervalos regulares; 4. que el kit se ha almacenado correctamente;
NTC	-	+	+/-	¡Atención! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se han preparado correctamente 2. que no se ha cometido ningún error en el procedimiento de ensayo; 3. que el espacio de trabajo y los instrumentos se

					descontaminan a intervalos regulares; 4. que el kit se ha almacenado correctamente;
--	--	--	--	--	---

Si uno de los problemas descritos en la tabla anterior sucede, después de comprobar, informe cualquier problema residual al supervisor para otras acciones.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe realizarse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y interpretaciones erróneas.
2. Cuando los resultados de las pruebas se transmiten desde el laboratorio a un centro de informática, se debe prestar atención para evitar la transferencia errónea de datos.

R. ACTUACIONES

La evaluación de las prestaciones se ha llevado a cabo de acuerdo con lo informado en las Especificaciones Técnicas Internas o STI.

La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en los laboratorios de DIA.PRO sobre los materiales suministrados por los laboratorios clínicos de referencia.

R.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica puede expresarse como Límite de detección.

Límite de detección (LOD): es la cantidad más baja de objetivo que puede ser detectado por el sistema con una probabilidad declarada.

Para las pruebas NAT se expresa como la concentración más pequeña del analito que se prueba en múltiples repeticiones da un resultado positivo.

El límite de detección (LOD) se determinó mediante pruebas que limitan las diluciones de una muestra cuantificada en el reactivo de investigación NIBSC para EL ARN Sars-CoV-2 (código 19/304).

Las diluciones de la muestra a 750 copias/ml nominales y 500 copias/ml se probaron en 20 réplicas.

Para el kit COV19RNALYO. CE el valor LOD se definió como la cantidad del objetivo resultó positiva 19 de 20 réplicas.

Sobre la base de los resultados obtenidos, el límite de detección al 100% del sistema se ha calculado en 750 copias/ml.

El límite de detección en el 85% del sistema se ha calculado en 500 copias/ml.

Los resultados se indican en las tablas siguientes:

750 copias/ml		Gen RdRp		
		Positivo	Negativo	total
Gen N	Positivo	18	1	19
	Negativo	1	0	1
		19	1	20

500 copias/ml		Gen RdRp		
		Positivo	Negativo	total
Gen N	Positivo	16	0	16
	Negativo	1	3	4
		17	3	20

R.2 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA

R.2.1 Especificidad diagnóstica:

La especificidad de diagnóstico es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador de destino. Así que la verdadera muestra negativa es un espécimen que se sabe que es negativo para el marcador de destino y clasificado correctamente por el dispositivo.

Este parámetro se estudió examinando 25 muestras de hisopado nasofaríngeo negativo DE ARN-CoV-2:

Muestras negativas SARS-CoV-2 ARN

VERDADERAS NEGATIVAS	25
FALSA POSITIVA	0
TOTAL DE MUESTRAS	25
% ESPECIFICIDAD	100

Sobre la base de los resultados obtenidos La Especificidad Diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

R.2.2 Sensibilidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador de destino. Así que la muestra positiva verdadera es un espécimen conocido por ser positivo para el marcador de destino y clasificado correctamente por el dispositivo.

Para el código de kit COV19RNALYO. CE el parámetro se estudió examinando 47 muestras de hisopo Nasofaríngeo de ARN-CoV-2:

Muestras Positivas SARS-CoV-2 RNA

VERDADERAS POSITIVAS	47
FALSA NEGATIVA	0
TOTAL, DE MUESTRAS	47
% SENSIBILIDAD	100

Sobre la base de los resultados obtenidos se ha calculado la Sensibilidad Diagnóstica del sistema en el 100%.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	100 %

R.2.3 Panel de competencia

Las prestaciones del kit Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex En tiempo real RT-PCR codificado **COV19RNALYO.CE** han sido probados con el Programa **QCMD 2020 SARS-CoV-2 EQA** (código). SCV2_20 – C1).

El panel contiene muestras positivas, negativas e interferentes en una de matriz swabline (Transport Medium - TM).

Las muestras se han purificado utilizando el mini kit QIAamp Viral RNA siguiendo el procedimiento del fabricante.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente tabla:

Código	Objetivo	Correlación muestral	Ct POL	Ct NUC	Ct IC
SCV2_101C1-01	Coronavirus 229E	3.93dPCR cp/ml	Und	Und	30.13
SCV2_101C1-02	SARS-CoV2	4.12dPCR cp/ml	29.46	28.43	29.16
SCV2_101C1-03	SARS-CoV2	3.15dPCR cp/ml	32.45	31.41	30.09
SCV2_101C1-04	SARS-CoV2	2.82dPCR cp/ml	33.29	32.31	29.19
SCV2_101C1-05	SARS-CoV2	2.82dPCR cp/ml	33.44	32.33	29.44

R.2.4 Sensibilidad en las variantes del SARS-CoV-2

La capacidad del kit COV19RNALYO.CE para detectar las nuevas variantes del SARS-CoV-2 se estudió examinando diluciones en serie de los controles de ARN disponibles suministrados por proveedores internacionales de referencia (como por ejemplo el AMPLIRUN de Vircell, ESPAÑA).

Los Controles Variantes se han probado desde 1E + 04 copias / ul hasta 5E-01 copias / ul manteniendo como referencia el control ARN AMPLIRUN SARS-CoV-2 (código MBC137-R).

El código del kit COV19RNALYO.CE mostró una sensibilidad igual en todos los controles de ARN Variantes probados, pudiendo detectar con éxito tanto las regiones objetivo (N y RdRp) hasta 1E + 00 copias / ul.

Debido a la falta de preparaciones de referencia internacional para todas las variantes del SARS-Cov-2 que circulan actualmente en todo el mundo, Dia.Pro ha realizado un estudio bio-informático que evalúa la homología de secuencia de las regiones objetivo amplificadas.

Gracias al diseño realizado sobre secuencias altamente conservadas de genes estructurales altamente estables del SARS-Cov-2, el estudio bio-informático mostró una fuerte homología de los Primers y Sondas utilizados en el kit con todas las Variantes de Virus en circulación y hoy depositadas en las bases de datos internacionales más importantes.

Los resultados obtenidos se describen en profundidad en la ficha técnica del producto.

R.3 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad del método para detectar solo la secuencia de ARN de destino.

La especificidad analítica de COV19RNALYO. El ensayo de ARN CE SARS-CoV-2 se ha estudiado de la siguiente manera:

1. El conjunto de imprimación/sonda de gen mediante la sonda se ha elegido analizando las secuencias de destino del genoma con el software adecuado (BioEdit Sequence Alignment Editor, Oligo Analyzer y Primer Express v.3.0" suministrado por Applied Biosystem Inc.).
2. El conjunto de imprimación/sonda de gen N se ha elegido entre los publicados en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta.
3. El conjunto de imprimación/sonda y la secuencia del genoma objetivo han sido controlados por el software "BLAST", con el fin de comprobar si alguna de las secuencias de nucleótidos depositadas en los bancos genómicos mundiales tiene alguna homología con Wuhan Covid-19, y por el software "ClustalW", con el fin de comparar las secuencias objetivo del genoma de los diferentes genotipos de Toxoplasma.
4. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
5. Las muestras procedentes de pacientes con un panel que sufren infecciones debido a posibles organismos que interfieren se obtuvieron del Archivo Europeo de Virus (Marsella, Francia).

Los resultados se notifican en la siguiente tabla:

Organismo	Región RdRp	Región N
HCoV-NL63	Negativa	Negativa
HCoV-229E	Negativa	Negativa
HCoV-OC43	Negativa	Negativa
MERS-CoV	Negativa	Negativa
SARS-CoV	Negativa	Positiva *

* Resultados discordantes entre las dos regiones objetivo podrían significar la homología en la secuencia de la Región N entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2. La región RdRp muestra una especificidad perfecta.

Se ha probado un control adicional de SARS-CoV titulado (1,2E + 04 copias / ul) para verificar mayor la especificidad analítica del kit codificado como COV19RNALYO.CE.

En este caso, no se ha detectado reactividad cruzada en ambas regiones objetivo, lo que significa una especificidad completa del kit COV19RNALYO.CE para el SARS-CoV-2.

T. LIMITACIONES

Se recomienda al usuario de este kit que lea y comprenda cuidadosamente este prospecto. La adherencia estricta al protocolo es necesaria para obtener resultados fiables de las pruebas. En particular, el pipeteo preciso de muestras y reactivos, la aplicación de un flujo de trabajo correcto junto con una programación cuidadosa de los pasos de drenaje térmico es esenciales para una detección precisa y reproducible del ARN SARS-CoV-2.

La determinación del ARN SARS-CoV-2 en una muestra de pacientes tiene amplias implicaciones médicas, sociales, psicológicas y económicas.

La detección de un posible caso humano de patógenos emergentes que causen enfermedades respiratorias agudas graves debe notificarse inmediatamente a las autoridades locales y nacionales de salud pública. De conformidad con el Reglamento Sanitario Internacional (RSI) 2005, la autoridad sanitaria nacional debe notificar a la OMS en un plazo de 24 horas todos los acontecimientos que puedan constituir una emergencia de salud pública.

Se recomienda considerar la confidencialidad, el asesoramiento adecuado y la evaluación médica como un aspecto esencial de la secuencia de pruebas.

U. BIBLIOGRAFÍA

1. Detección del nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) por RT-PCR en tiempo real. V.M. Corman et al. www.eurosurveillance.org
2. Panel RT-PCR en tiempo real para la detección de nuevos coronavirus 2019. Centro de control y prevención de enfermedades (CDC).
3. Detección del nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) en casos humanos sospechosos por RT-PCR. HKU; Facultad de medicina LKS, escuela de salud pública.
4. Directrices provisionales para recoger, manipular y analizar muestras clínicas de personas objeto de investigación (PUI) para la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Centro de control y prevención de enfermedades (CDC).
5. Pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) en casos humanos sospechosos. Organización Mundial de la Salud (OMS) 17 de enero de 2020.
6. Nueva neumonía por coronavirus (2019-nCoV) en China. 0001997-22/01/2020-DGPRES-DGPRES-P. Ministerio de Salud, Dirección General de Prevención Sanitaria.

7. Desarrollo de un ensayo cuantitativo para el coronavirus del SARS y la correlación del ARNm de GAPDH con el coronavirus del SARS en muestras clínicas. S.C.C. Wong et al.; J Clin Pathol 2005;58:276-280.

V. SÍMBOLOS

LEYENDA			
REF	Código de producto		Temperatura de almacenamiento
IVD	Dispositivo para diagnóstico in vitro		Consultar las instrucciones de uso
LOT	N. de Lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
CE	Marca de conformidad (CE)		Fecha de fabricación

4BShopLab



consip

acquistinretepa

DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND 
Because diagnosis matters