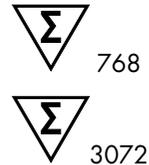


Julio 2021

Instrucciones de uso (manual de uso) de *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



Versión 1



Para uso en diagnóstico in vitro

Para su uso en los instrumentos Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM y ABI[®] 7500 Fast Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

Contenido

| | |
|--|----|
| Uso previsto | 4 |
| Descripción y principio..... | 5 |
| Información sobre el patógeno..... | 5 |
| Resumen y explicación..... | 6 |
| Materiales suministrados | 9 |
| Contenido del kit..... | 9 |
| Componentes del kit | 10 |
| Plataformas y software | 11 |
| Materiales necesarios pero no suministrados | 12 |
| Consumibles | 12 |
| Equipo | 12 |
| Advertencias y precauciones..... | 13 |
| Información de seguridad..... | 13 |
| Precauciones..... | 14 |
| Almacenamiento y manipulación de reactivos..... | 15 |
| Transporte, almacenamiento y manipulación de material de muestras..... | 15 |
| Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras | 15 |
| Protocolo: Preparación de muestras y detección del SARS-CoV-2 en RGQ MDx 5plex HRM..... | 16 |
| Protocolo: Preparación de muestras y detección de SARS-CoV-2 en ABI 7500 Fast Dx..... | 22 |
| Resultados | 27 |

| | |
|--|----|
| Interpretación de los resultados | 29 |
| Limitaciones | 32 |
| Rendimiento | 33 |
| Sensibilidad analítica (límite de detección) | 33 |
| Estudios de especificidad analítica (inclusividad y exclusividad/ reactividad cruzada)..... | 33 |
| Sustancias interferentes | 40 |
| Precisión | 41 |
| Rendimiento clínico..... | 42 |
| Referencias | 46 |
| Guía de resolución de problemas | 47 |
| Símbolos | 49 |
| Información de contacto | 50 |
| Información para pedidos..... | 51 |
| Historial de revisiones del documento | 52 |

Uso previsto

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit es una prueba de real-time RT-PCR destinada a la detección cualitativa de ácido nucleico del SARS-CoV-2 en hisopos nasofaríngeos (Nasopharyngeal Swab, NPS), hisopos nasales e hisopos orofaríngeos de personas con signos y síntomas de infección o de personas asintomáticas o con otros motivos de sospecha de infección por COVID-19.

Está destinado a ayudar en el diagnóstico de la COVID-19 en la fase aguda de infección acompañado de observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

La prueba *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit está diseñada su uso en un entorno de laboratorio de biología molecular por parte de usuarios profesionales, como personal de laboratorios clínicos capacitados que hayan recibido formación específica sobre técnicas de real-time PCR y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como única fuente para tomar decisiones sobre el tratamiento del paciente.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit está diseñado para utilizarse con el sistema Rotor-Gene Q (RGQ) MDx o con ABI 7500 Fast Dx, como sistemas de real-time PCR.

Descripción y principio

Información sobre el patógeno

Los coronavirus, un género de la familia *Coronaviridae*, son virus ARN grandes y encapsulados de hebra positiva que provocan una enfermedad muy virulenta en personas y animales domésticos (1). Se sabe que los coronavirus que infectan a las personas representan un tercio de las infecciones que causan resfriado y también son una causa reconocida de infecciones respiratorias de vías altas hospitalarias en lactantes prematuros (2).

Un nuevo miembro de la familia de coronavirus provocó un brote epidémico de la enfermedad respiratoria en la ciudad de Wuhan, en China (1, 3). Originalmente denominado nuevo coronavirus (2019-nCoV), el SARS-CoV-2 es distinto del SARS-CoV (1, 3), causante del brote epidémico de 2003, y del MERS-CoV, que existe en Oriente Medio desde 2012. El SARS-CoV-2 es el agente causante de la COVID-19. El ARN del SARS-CoV-2 puede detectarse durante las fases iniciales y agudas de la infección a partir de distintas muestras de las vías respiratorias altas (hisopo nasal [NS], orofaríngeo [OPS] y nasofaríngeo [NPS]) (3).

Junto con el historial del paciente y la epidemiología del SARS-CoV-2, los ensayos de RT-PCR se han convertido en el método de referencia para el diagnóstico del SARS-CoV-2. El Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) ha propuesto la combinación de ensayos con RT-PCR con inmunoanálisis para supervisar el estado de la infección y evaluar la eficacia de las medidas restrictivas adoptadas para controlar el brote epidémico (4, 5).

El ensayo SARS-CoV-2 Prep&Amp UM tiene 2 genes víricos diana (genes N1 y N2) detectados con el mismo canal de fluorescencia. Los dos genes diana no están diferenciados y la amplificación de uno o ambos genes diana provoca una señal de fluorescencia. Los resultados positivos son indicativos de la presencia del virus SARS-CoV-2, pero no descartan la coinfección con otros patógenos. Por otro lado, la obtención de resultados negativos de ensayos de RT-PCR no excluye una posible infección.

Resumen y explicación

La prueba *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit es un sistema listo para usar con un sencillo paso de preparación de las muestras seguido de la detección del ARN del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en el sistema RGQ MDx o las plataformas ABI 7500 Fast Dx (figura 1). El SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de una región de 72 pares de bases (pb) y una de 67 pb del genoma del ARN del SARS-CoV-2 y para su detección directa en canal de fluorescencia "Green" de los instrumentos RGQ MDx y con el filtro fluorescente A/1 de ABI 7500 Fast Dx.

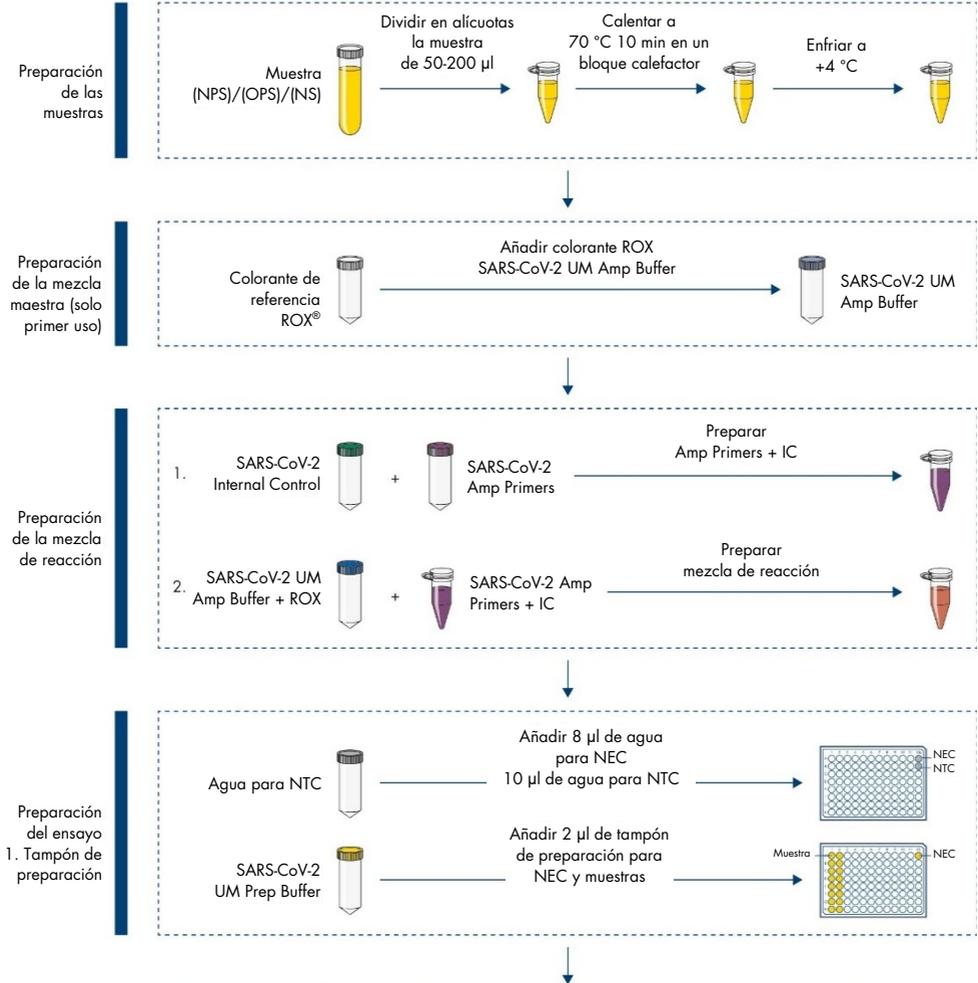
La mezcla de cebadores y sondas de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit también contiene oligonucleótidos necesarios para las amplificaciones de RNase P. Cuando se detectan en el canal de fluorescencia "Yellow" del instrumento RGQ MDx o con el filtro fluorescente B/2 ABI 7500 Fast Dx, esos amplicones garantizan que se ha recogido suficiente muestra biológica en el hisopo. Este control es fundamental para garantizar la presencia de muestras biológicas en muestras negativas para SARS-CoV-2. Una amplificación debe ser siempre detectable; de lo contrario, pondría en duda la calidad de la muestra.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit también contiene un tercer sistema de amplificación heterógeno para revelar una posible inhibición de la RT-PCR. Esta se detecta como un control de ARN interno (Internal Control, IC) en el canal de fluorescencia "Red" de los instrumentos RGQ MDx y con el filtro de fluorescencia E/5 de ABI 7500 Fast Dx. Dado que el IC está incluido en SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, su amplificación debe ser constante, a menos que haya un inhibidor de la RT-PCR en la muestra o en la reacción por RT-PCR, el cual retrasaría o impediría la amplificación.

En *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit se suministran controles externos positivos y negativos (SARS-CoV-2 Positive Control y agua exenta de nucleasas utilizada como control sin molde [No Template Control, NTC], respectivamente) para confirmar el rendimiento del paso de la PCR. Se recomienda encarecidamente un control sin extracción (No Extraction Control, NEC) (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer utilizado como NEC) para verificar la ausencia de inhibidores de la RT-PCR en el tampón de la preparación.

En conjunto, estos controles supervisan la eficacia de los pasos de la transcripción inversa y la PCR.

Flujo de trabajo con *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



(Continúa en la página siguiente)

(Continúa de la página anterior)

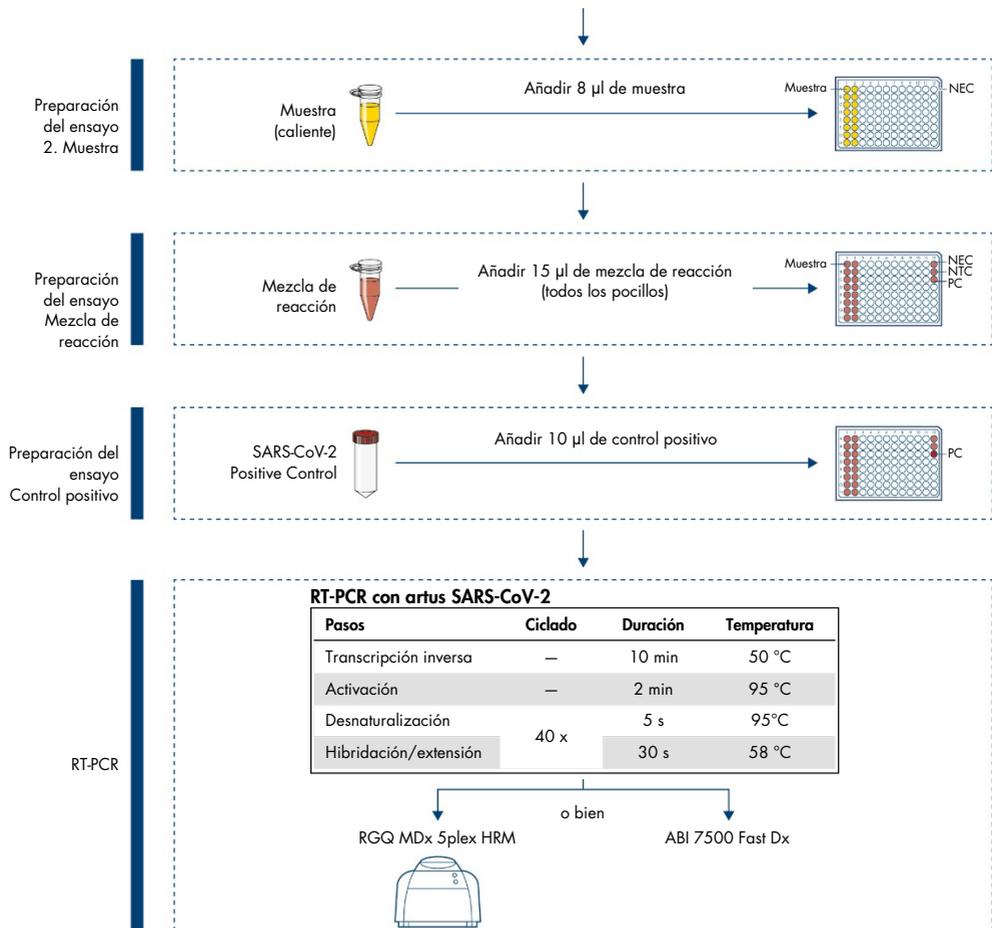


Figura 1 Flujo de trabajo con artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Materiales suministrados

Contenido del kit

| artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit | | | | | |
|---|-------------------------|---|---|---------------------|---------------------|
| N.º de catálogo | | | | 4511460 | 4511469 |
| Número de reacciones | | | | 768 | 3072 |
| Color del tubo | Color de la tapa | Denominación | Tubo ID | Volumen (µl) | Volumen (µl) |
| Transparente | Amarillo | SARS-CoV-2 UM Prep Buffer | Preparation Buffer (Tampón de preparación) | 2 × 930 | 8 × 930 |
| Transparente | Azul | SARS-CoV-2 UM Amp Buffer | Master Mix (Mezcla maestra) | 4 × 1440 | 16 × 1440 |
| Transparente | Morado | SARS-CoV-2 Amp Primers | Primers and Probes (Cebadores y sondas) | 4 × 1680 | 16 × 1680 |
| Transparente | Verde | SARS-CoV-2 Internal Control | Internal Control (IC) (Control interno) | 1 × 1390 | 4 × 1390 |
| Transparente | Rojo | SARS-CoV-2 Positive Control | Positive Control (Control positivo) | 1 × 220 | 4 × 220 |
| Transparente | Transparente | Water for NTC (Agua para NTC) | Water (NTC) (Agua) | 1 × 1900 | 4 × 1900 |
| Transparente | Transparente | ROX Reference Dye (Colorante de referencia ROX) | ROX Dye (Colorante ROX) | 1 × 210 | 4 × 210 |

Componentes del kit

Reactivos

En cada tubo, los volúmenes de reactivo se han optimizado para 8 lotes de 96 muestras (para el kit de 768 reacciones) o 32 lotes de 96 reacciones (para el kit de 3072 reacciones), incluido un control positivo (Positive Control, PC), un control sin molde (No Template Control, NTC) y un control sin extracción (No Extraction Control, NEC).

Pueden analizarse más o menos muestras, pero se producirá un uso subóptimo de reactivo. Se recomienda no realizar varios ciclos de congelación-descongelación. Pueden dividirse los reactivos en partes alícuotas para evitar realizar varios ciclos de congelación-descongelación.

Cebadores y sondas

Los cebadores y las sondas que establecen como diana las secuencias del SARS-CoV-2 se basan en los cebadores y las sondas diseñados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) de Estados Unidos.

Controles y calibradores

El ensayo contiene 5 controles para supervisar la eficacia de la RT-PCR.

Control interno (Internal Control, IC): el control interno es un ARN monocatenario con material IVT que verifica la presencia de contaminantes que podrían inhibir la transcripción inversa. El control interno también supervisa la eficiencia de la transcripción inversa en el control sin molde (No Template Control, NTC) y en el control sin extracción (No Extraction Control, NEC).

Control sin molde (No Template Control, NTC): el control sin molde está compuesto por agua exenta de nucleasas. Se agrega a la placa de PCR para verificar la introducción de contaminantes durante la preparación de la placa de PCR, que podrían dar lugar a una interpretación errónea de las dianas del SARS-CoV-2.

Control positivo (Positive Control, PC): El control positivo es un ADN bicatenario amplificado con cebadores y sondas de SARS-CoV-2 Primers and Probes (mezcla P&P). Su detección verifica la eficacia del reactivo involucrado en el paso de amplificación por PCR.

Control sin extracción (No Extraction Control, NEC): el control sin extracción está compuesto por el SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Se procesa en paralelo con las muestras clínicas para verificar la introducción de contaminantes durante la preparación de las muestras, que podrían dar lugar a una interpretación errónea de las dianas del SARS-CoV-2.

Control de muestreo: El control de muestreo detecta el gen RNase P y es crucial para garantizar la presencia de muestras biológicas en las muestras negativas para SARS-CoV-2. La amplificación del control de muestreo debe ser siempre detectable; de lo contrario, pondría en duda la calidad de la muestra.

Plataformas y software

Antes de usar el producto, asegúrese de que los instrumentos se hayan sometido a mantenimiento y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este kit se puede utilizar en dos flujos de trabajo que requieren el uso de los instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o ABI 7500 Fast Dx y su software correspondiente:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: software Rotor-Gene Q, versión 2.3.1 o superior
- ABI 7500 Fast Dx: software SDS, versión 1.4.1 o superior

Materiales necesarios pero no suministrados

Consumibles

- Guantes de laboratorio sin talco desechables
- Puntas de pipeta estériles y exentas de nucleasas con filtros
- Tubos exentos de PCR de 1,5 ml o 2 ml
- Tubos para PCR de 0,1 ml para uso con Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, n.º de cat. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ para su uso con la plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems 96-well plate, n.º de cat. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film para usar con la plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems, n.º de cat. 4360954)

Equipo *

- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Pipetas (ajustables)
- Agitadora vorticial
- Calentador de bloque
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n.º de cat. 9002032) con la versión del software Rotor-Gene Q 2.3.1 o superior
- Rotor-Disc 72 Rotor (n.º de cat. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (n.º de cat. 9018900)
- Bloque de carga de 72 pocillos (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n.º de cat. 9018901)
- De forma alternativa: Plataforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Thermo Fisher Scientific®, n.º de cat. 4406985) con la versión de software 1.4.1 o superior y una centrifuga para placas de 96 pocillos

* Antes de usar el producto y cuando corresponda, asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que consultar las normativas locales para conocer los requisitos de notificación, en relación a los sucesos graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo; al fabricante y a la autoridad sanitaria del país en el que resida el usuario y/o el paciente.

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

Utilice siempre el equipo de protección personal adecuado, que incluye, entre otros, guantes desechables sin talco, una bata de laboratorio y protección ocular. Protéjase la piel, los ojos y las mucosas. Cámbiese los guantes a menudo cuando manipule muestras.

Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas. Respete siempre las precauciones de seguridad que se describen en las directrices pertinentes, como *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines M29* del Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) y otros documentos pertinentes.

Los materiales de muestra y las muestras son potencialmente infecciosos. Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.

Precauciones

- Respete los procedimientos estándares de laboratorio para mantener el área de trabajo limpia y sin contaminación. Dedique un área con equipo específico para manipular ARN.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas para minimizar la contaminación cruzada.
- Extreme las precauciones para no contaminar con ARNasa durante el experimento y utilice materiales de plástico sin ARNasa.
- Asegúrese de tener una buena trazabilidad con los registros, especialmente para la identificación de las muestras.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Debe prestar especial atención a las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit puede conservarse a entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses o hasta la fecha de caducidad.

Transporte, almacenamiento y manipulación de material de muestras

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit se utiliza con hisopos nasofaríngeos, nasales u orofaríngeos. Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) de Estados Unidos y Public Health England (Reino Unido) han elaborado directrices para la recogida, la manipulación y el análisis de muestras clínicas. Para obtener información adicional, consulte estas directrices u otros protocolos de laboratorio de referencia nacional.

Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras

Para recoger, almacenar y transportar muestras obtenidas con hisopo, consulte las recomendaciones del proveedor del producto. Las muestras obtenidas con hisopo deben sumergirse por completo en medios de transporte para conservar la integridad de la muestra.

Protocolo: Preparación de muestras y detección del SARS-CoV-2 en RGQ MDx 5plex HRM

En este protocolo, se describe la preparación de la muestra y de la RT-PCR para la detección de dianas del SARS-CoV-2 en muestras humanas obtenidas mediante hisopado nasal, nasofaríngeo u orofaríngeo almacenadas en medios de transporte en el RGQ MDx 5plex HRM.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Verifique que se respeten las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento impresas en todas etiquetas de las cajas y los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Utilice equipo calibrado y en buen estado.
- Preste atención para evitar la contaminación con ARNasas durante el experimento y utilice recipientes de plástico exentos de nucleasas.

Antes de comenzar

- Las muestras se pueden conservar a temperatura ambiente durante los pasos de preparación y la configuración de la reacción, pero se recomienda mantenerlas en hielo o a 4 °C en una gradilla de refrigeración.
- Antes de utilizar los siguientes productos, deje que se descongelen por completo a temperatura ambiente (15–25 °C): SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, agua para NTC y SARS-CoV-2 Positive Control. Conserve los tubos a temperatura ambiente y protéjalos de la luz hasta que los utilice.
- Antes de utilizar SARS-CoV-2 UM Prep Buffer y SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, deben homogeneizarse; para ello, inviértalos 2-3 veces (no los agite) y después realice una centrifugación rápida. Todos los demás reactivos individuales pueden homogeneizarse mediante agitación vorticial de pulsos durante 3-5 segundos o invirtiéndolos 2-3 veces y, a continuación, realizar una centrifugación rápida.

- El SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibe las ARNasas presentes en las muestras clínicas para el paso de detección, pero no es una solución inactivadora del virus. Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas.
- Verifique que las condiciones de ciclado de la plataforma de qPCR sean las especificadas en este protocolo.
- Los reactivos se pueden dividir en alícuotas para evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación.
- Use una mezcla de reacción recién preparada (< 2 h antes de activar la placa de RT-PCR).
- Para minimizar la contaminación, la muestra y las preparaciones de RT-PCR deben realizarse en zonas distintas.

Procedimiento

1. Preparación de las muestras
 - 1a. Agite enérgicamente en un vórtex el hisopo que contiene la muestra.
 - 1b. Divida partes alícuotas de 50-200 µl de la muestra en tubos exentos de PCR de 1,5 ml.
 - 1c. Realice el paso de calentamiento a 70 °C durante 10 minutos en un calentador de bloque. Enfríe las muestras en hielo durante al menos 5 minutos. A continuación, conserve las muestras en hielo o a 4 °C.
2. En el primer uso, complete el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer con el colorante de referencia ROX.
 - 2a. Añada 32,8 µl del colorante ROX a 1 tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 2b. Cierre la tapa que contiene el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer y el colorante ROX y dé vuelta al tubo 3 veces.
 - 2c. Centrifugue el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer que contiene el colorante ROX en el fondo del tubo.
3. En el caso de una placa RGQ MDx completa (72 pocillos), prepare una mezcla de partes alícuotas de los SARS-CoV-2 Amp Primers con el SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3a. Transfiera los volúmenes necesarios de SARS-CoV-2 Amp Primers y SARS-CoV-2 Internal Control según se indica en la tabla 1 en un nuevo tubo exento de PCR de 1,5 ml.
 - 3b. Cierre la tapa y dé la vuelta al tubo 3 veces o aplique al tubo agitación vorticial de pulsos durante 3-5 segundos.
 - 3c. Centrifugue los SARS-CoV-2 Amp Primers que contienen el IC en el fondo del tubo.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers

| Mezcla de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers | | | | Número de reacciones Volumen (µl) |
|---|---------------------------------|---------------------|------------|---|
| Reactivos | Concentración de solución madre | Concentración final | 1 reacción | 72 reacciones (+22 % de volumen adicional*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45 x | 1 x | 7,25 | 638 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 132 |
| Mezcla total de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers | | | 8,75 | 770 |

* **Nota:** Ajuste los volúmenes de SARS-CoV-2 UM Amp Primers y de SARS-CoV-2 Internal Control en función del número de muestras que se van a analizar. Considere un volumen adicional para compensar el volumen muerto.

4. Prepare una mezcla de reacción según los datos de la tabla 2 y mézclela bien.

Tabla 2. Preparación de la mezcla maestra

| Mezcla de reacción de RT-PCR | | | | Número de reacciones Volumen (µl) |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------|---|
| Reactivos | Concentración de solución madre | Concentración final | 1 reacción | 72 reacciones (+20 % de volumen adicional*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†] | 4 x | 1 x | 6,25 | 540 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers [‡] | 2,9 x | 1 x | 8,75 | 756 |
| Volumen de reacción total | | – | 15,00 | 1296 |

* **Nota:** Ajuste los volúmenes de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer y de SARS-CoV-2 Amp Primers en función del número de muestras que se van a analizar. Considere un volumen adicional para compensar el volumen muerto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer completado con el colorante de referencia ROX.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers completados con el SARS-CoV-2 Internal Control.

- Dispense 8 µl de agua exenta de nucleasas en el tubo de PCR asignado al NEC.
- Cargue 10 µl de agua exenta de nucleasas en el tubo de PCR asignado al NTC.
- Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en cada tubo de PCR asignado al NEC y las muestras preparadas.
- Añada 8 µl de la muestra preparada a un tubo de PCR que contenga el SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Mezcle los componentes pipeteando arriba y abajo 5 veces.

9. Añada 15 µl de la mezcla de reacción preparada en el paso 4 a los tubos dedicados a las muestras y los controles (la figura 2 se proporciona como ejemplo). Mezcle los componentes pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces, luego cierre las tapas de los tubos de PCR, excepto el reservado como SARS-CoV-2-UM Positive Control.

Nota: Verifique que los tubos estén bien cerrados para evitar la contaminación cruzada.

10. Cargue 10 µl del SARS-CoV-2-UM Positive Control en el tubo de PCR correspondiente. Mezcle los componentes pipeteando arriba y abajo 5 veces.

11. Configure el programa de RT-PCR de RGQ MDx 5plex HRM de acuerdo con las especificaciones de la tabla 3.

Nota: La adquisición de datos debe realizarse durante el paso de hibridación/extensión.

12. Coloque los tubos en el termociclador en tiempo real (en la figura 2 se representa un ejemplo de la disposición del tubo) e inicie el programa de ciclado como se describe en la tabla 3.

Nota: Extreme las precauciones y siga la misma posición y orden de los tubos entre la preparación del ensayo y los pasos del termociclador en tiempo real.

Tabla 3. Programación para SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

| Pasos | Duración | Temperatura del horno (°C) | Número de ciclos | Adquisición |
|---------------------------------------|----------|----------------------------|------------------|--|
| Transcripción inversa | 10 min | 50 | 1 | No |
| Activación de calor inicial de la PCR | 2 min | 95 | 1 | No |
| Ciclado en 2 pasos | | | | |
| Desnaturalización | 5 s | 95 | 40 | No |
| Hibridación/extensión | 30 s | 58 | | Green (FAM), Yellow (HEX) y Red (Atto) |

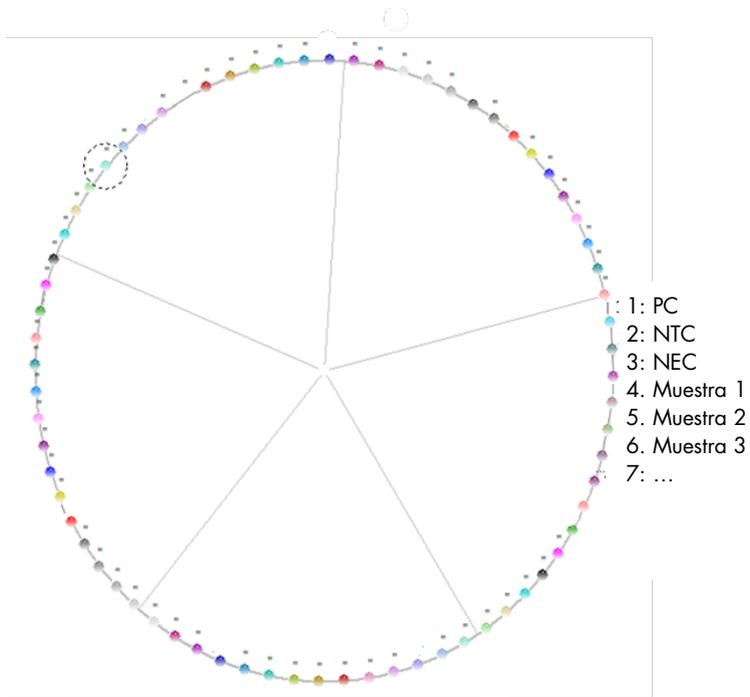


Figura 2. Ejemplo de la distribución de los tubos de la plataforma RGQ MDx 5plex HRM

13. Haga clic en **Gain optimization** (Optimización de ganancia) en “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas) y abra **Auto-gain Optimization Setup**. (Configuración de la optimización de ganancia automática).
14. Verifique que los canales de adquisición estén configurados como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Configuración de RGQ MDx 5plex HRM

| Nombre | Posición del tubo de PC | Lectura mínima (FI) | Lectura máxima (FI) | Ganancia mínima | Ganancia máxima |
|--------|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| Green | 1* | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |
| Yellow | 1* | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |
| Red | 1* | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |

* **Nota:** Esto debe cambiarse de acuerdo con la posición del tubo de SARS-CoV-2-UM Positive Control.

15. Seleccione **Perform optimization before the first acquisition** (Ejecutar la optimización antes de la primera adquisición).

16. Inicie la serie.

17. Al finalizar la serie, analice los resultados (consulte la sección Resultados).

Protocolo: Preparación de muestras y detección de SARS-CoV-2 en ABI 7500 Fast Dx

Este protocolo sirve para preparar y detectar dianas del SARS-CoV-2 en muestras humanas obtenidas mediante hisopado nasal, nasofaríngeo u orofaríngeo almacenadas en medios de transporte en el instrumento ABI 7500 Fast Dx qPCR.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Verifique que se respeten las fechas de caducidad y las condiciones de almacenamiento impresas en todas etiquetas de las cajas y los componentes. No utilice componentes caducados o mal almacenados.
- Utilice equipo calibrado y en buen estado.
- Preste atención para evitar la contaminación con ARNasas durante el experimento y utilice recipientes de plástico exentos de nucleasas.
- Cuando se use ABI 7500 Fast Dx, se debe añadir el colorante ROX al tubo de mezcla maestra antes del primer uso.

Antes de comenzar

- Las muestras se pueden conservar a temperatura ambiente durante los pasos de preparación y la configuración de la reacción, pero se recomienda mantenerlas en hielo o a 4 °C en una gradilla de refrigeración.
- Se requiere el colorante ROX cuando se usa ABI 7500 Fast Dx.
- **Los datos deben adquirirse con el ajuste de colorante pasivo ROX.**
- Antes de utilizar los siguientes productos, deje que se descongelen por completo a temperatura ambiente (15–25 °C): SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, agua para NTC y SARS-CoV-2 Positive Control. Conserve los tubos a temperatura ambiente y protéjalos de la luz hasta que los utilice.

- Antes de utilizar SARS-CoV-2 UM Prep Buffer y SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, deben homogeneizarse; para ello, inviértalos 2-3 veces (no los agite) y después realice una centrifugación rápida. Todos los demás reactivos individuales pueden homogeneizarse mediante agitación vorticial de pulsos durante 3-5 segundos o invirtiéndolos 2-3 veces y, a continuación, realizar una centrifugación rápida.
- El SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibe las ARNasas presentes en las muestras clínicas para el paso de detección, pero no es una solución inactivadora del virus. Todas las muestras deben tratarse como potencialmente peligrosas.
- Verifique que las condiciones de ciclado de la plataforma de qPCR sean las especificadas en este protocolo.
- Los reactivos se pueden dividir en alícuotas para evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación.
- Use una mezcla de reacción recién preparada (< 2 h antes de activar la placa de RT-PCR).
- Para minimizar la contaminación, la muestra y las preparaciones de RT-PCR deben realizarse en zonas distintas.

Procedimiento

1. Preparación de las muestras
 - 1a. Agite enérgicamente en vórtex el hisopo que contiene la muestra.
 - 1b. Divida partes alícuotas de 50-200 µl de la muestra en tubos exentos de PCR de 1,5 ml.
 - 1c. Realice un paso de calentamiento a 70 °C durante 10 minutos en un calentador de bloque. Enfríe las muestras en hielo durante al menos 5 minutos y después conserve las muestras en hielo o a 4 °C.
2. En el primer uso, complete el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer con el colorante de referencia ROX.
 - 2a. Añada 32,8 µl de colorante ROX a un tubo de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 2b. Cierre la tapa que contiene el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer y el colorante ROX y dé vuelta al tubo 3 veces.
 - 2c. Centrifugue el SARS-CoV-2 UM Amp Buffer que contiene el colorante ROX en el fondo del tubo.
3. Para una placa ABI 7500 Fast Dx completa (96 pocillos), prepare una mezcla de partes alícuotas de los SARS-CoV-2 Amp Primers con el SARS-CoV-2 Internal Control.

- 3a. Transfiera el volumen requerido de los SARS-CoV-2 Amp Primers y del SARS-CoV-2 Internal Control de acuerdo con la tabla 5 a un nuevo tubo exento de PCR de 1,5 ml.
- 3b. Cierre la tapa y dé la vuelta al tubo 3 veces o aplique al tubo agitación vorticial de pulsos durante 3-5 segundos.
- 3c. Centrifugue los SARS-CoV-2 Amp Primers que contienen el IC para que la solución se quede en el fondo del tubo.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers

| Mezcla de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers | | | | Número de reacciones |
|---|---------------------------------|---------------------|------------|---|
| | | | | Volumen (µl) |
| Reactivos | Concentración de solución madre | Concentración final | 1 reacción | 96 reacciones (+21 % de volumen adicional*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45 x | 1 x | 7,25 | 841 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 174 |
| Mezcla total de IC + SARS-CoV-2 Amp Primers | | | 8,75 | 1015 |

* Nota: Ajuste los volúmenes de SARS-CoV-2 UM Amp Primers y de SARS-CoV-2 Internal Control en función del número de muestras que se van a analizar. Considere un volumen adicional para compensar el volumen muerto.

4. Prepare una mezcla de reacción según los datos de la tabla 6 y mézclela bien.

Tabla 6. Preparación de la mezcla maestra

| Mezcla de reacción de RT-PCR | | | | Número de reacciones |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------|--|
| | | | | Volumen (µl) |
| Reactivos | Concentración de solución madre | Concentración final | 1 reacción | 96 reacciones (+20% de volumen adicional*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†] | 4 x | 1 x | 6,25 | 720 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers [‡] | 2,9 x | 1 x | 8,75 | 1008 |
| Volumen de reacción total | | – | 15,00 | 1728 |

* Nota: Ajuste el volumen del SARS-CoV-2 UM Amp Buffer y los SARS-CoV-2 Amp Primers de acuerdo con la cantidad de muestras que se deban analizar. Considere un volumen adicional para compensar el volumen muerto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer completado con el colorante de referencia ROX

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers completados con el SARS-CoV-2 Internal Control

5. Dispense 8 µl de agua exenta de nucleasas al pocillo asignado al NEC.
6. Cargue 10 µl de agua exenta de nucleasas al pocillo asignado al NTC.

7. Dispense 2 µl de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en cada pocillo asignado al NEC y en las muestras preparadas.
8. Añada 8 µl de la muestra preparada a un pocillo que contenga el SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Mezcle los componentes pipeteando arriba y abajo 5 veces.
9. Añada 15 µl de la mezcla de reacción preparada en el paso 4 a los pocillos específicos para muestras y controles (vea el ejemplo de la figura 3). Mezcle los componentes pipeteando arriba y abajo 5 veces.
10. Cargue 10 µl del SARS-CoV-2-UM Positive Control en el pocillo correspondiente. Mezcle los componentes pipeteando arriba y abajo 5 veces.
11. Selle bien la placa de PCR para evitar la contaminación cruzada. Asegúrese de aplicar presión uniformemente en toda la placa para obtener un sellado hermético en cada pocillo.
12. Centrifugue brevemente la placa de PCR para capturar el líquido que se deposite en el fondo del pocillo.
13. Configure el programa de RT-PCR en el modo de serie "Standard 7500" (Estándar 7500) de ABI 7500 Fast Dx según lo descrito en la tabla 7.
Nota: La adquisición de datos debe realizarse durante el paso de hibridación/extensión.
Nota: Para obtener información adicional, consulte las *Instrucciones de uso de ABI 7500 Fast Dx*.
14. Coloque la placa en el termociclador en tiempo real (en la figura 3, se muestra un ejemplo de disposición de placas de PCR) y comience el programa de ciclo como se describe en la tabla 7.
15. Seleccione los pocillos usados y aplique los colorantes indicadores FAM, VIC y Cy5. Los datos deben adquirirse con el colorante pasivo ROX **ON** (Activado).
16. Verifique que la curva estándar de ABI 7500 Fast Dx esté configurada como Absolute Quantitation (Cuantificación absoluta).
17. Inicie la serie.
18. Al finalizar la serie, analice los resultados (consulte la sección Resultados).

Tabla 7. Programación para SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

| Pasos | Duración | Temperatura del horno (°C) | Número de ciclos | Adquisición |
|---------------------------------------|----------|----------------------------|------------------|---------------------------------------|
| Transcripción inversa | 10 min | 50 | 1 | No |
| Activación de calor inicial de la PCR | 2 min | 95 | 1 | No |
| Ciclado en 2 pasos | | | | |
| Desnaturalización | 5 s | 95 | 40 | No |
| Hibridación/extensión | 30 s | 58 | | Green (FAM), Yellow (VIC) y Red (Cy5) |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | PC | | | | | | | | | | | |
| B | NTC | | | | | | | | | | | |
| C | NEC | | | | | | | | | | | |
| D | Sample 1 | | | | | | | | | | | |
| E | Sample 2 | | | | | | | | | | | |
| F | Sample 3 | | | | | | | | | | | |
| G | ... | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figura 3. Ejemplo de distribución de la placa en ABI 7500 Fast Dx

Resultados

En RGQ MDx 5plex HRM, los datos se analizan utilizando el software Rotor-Gene Q versión 2.3.1 (o superior) siguiendo las instrucciones del fabricante (Guía del usuario de Rotor-Gene Q MDx, revisión 7, septiembre de 2018). Se requieren los siguientes parámetros de análisis para mantener la coherencia entre los diferentes análisis (tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de análisis para RGQ MDx 5plex HRM

| Canales | Green | Red | Yellow |
|--|---|-------|---|
| Umbral de fluorescencia | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Corrección de pendiente | Sí | Sí | Sí |
| Tubo dinámico | Sí | Sí | Sí |
| Punto de inicio | No | 10-20 | 10-20 |
| Valor atípico de eliminación: umbral de eficiencia de reacción | Sí Activado al 0 % | No | No |
| Ciclos de inicio cortado | 5 | 5 | 5 |
| Ciclos de corte | Un valor de Ct >38,00 se considera como 40,00 | No | Un valor de Ct >35,00 se considera como 40,00 |

En el software RGQ, los resultados de las series están disponibles en la cuadrícula de resultados de cuantificación abierta durante el análisis. Los datos de las muestras seleccionadas se resumen en la tabla y pueden exportarse como un archivo Excel® haciendo clic con el botón derecho del ratón en la cuadrícula y seleccionando **Export to Excel** (Exportar a Excel). Asegúrese de que todas las muestras estén seleccionadas antes de exportar los resultados.

En ABI, los datos se analizan con el software 7500 Fast System, versión 1.4.1 (o superior), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Son necesarios los siguientes parámetros para mantener la coherencia entre los diferentes análisis (tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de análisis para ABI 7500 Fast Dx

| Canales | FAM* | VIC/HEX* | Cy5/Atto* |
|-------------------------|---|-----------------|---|
| Colorante pasivo | ROX | ROX | ROX |
| Umbral de fluorescencia | 0,13 | 0,05 | 0,025 |
| Ajuste inicial | Automático | Automático | Automático |
| Ciclos de corte | Un valor de Ct >39,00 se considera como 40,00 | No | Un valor de Ct >35,00 se considera como 40,00 |

* FAM = filtro A/1 en la plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 en la plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 en la plataforma ABI

En el software ABI SDS, los valores de Ct de un grupo seleccionado de pocillos o de toda la placa están disponibles en la hoja **Report** (Informe) de la sección principal **Results** (Resultados). Los datos se pueden exportar en formato de texto con valores separados por comas (.csv) (recomendado): En la ventana del software SDS, seleccione **File** (Archivo) > **Export** (Exportar) > **Results** (Resultados) (también se puede escoger el elemento del menú **Ct**). Seleccione el formato del archivo exportado como .csv.

Interpretación de los resultados

El control positivo (Positive Control, PC) y los genes N1 y N2 se detectan en el canal de fluorescencia Green con RGQ MDx 5plex HRM (o en el canal de fluorescencia FAM en ABI).

El control de muestreo, compuesto por RNase P, se detecta en el canal de fluorescencia Yellow con RGQ MDx 5plex HRM (o en el canal de fluorescencia VIC/HEX con ABI). Cada muestra clínica debe mostrar una amplificación de control de muestreo. En el PC, quizás se observe una amplificación amarilla a pesar de la ausencia de secuencias humanas. En este caso, es posible que se ignore una señal del canal amarillo del PC porque la señal intensa de fluorescencia del canal verde puede interferir en el canal amarillo.

El control interno (Internal Control, IC) está incluido en los SARS-CoV-2 Amp Primers. Se detecta en el control sin molde (No Template Control, NTC), el control sin extracción (No Extraction Control, NEC), el control positivo (Positive Control, PC) y las muestras clínicas con el canal de fluorescencia Red con RGQ MDx 5plex HRM (o en el canal de fluorescencia Cy5/Atto con ABI).

Para validar las series de RT-PCR, los controles PC, NTC y NEC deben amplificarse y detectarse según lo previsto.

Tabla 10. Criterios de validez de la serie e interpretación de resultados para RGQ MDx 5plex HRM

| Control | Detección en el canal Green | Detección en el canal Yellow | Detección en el canal Red | Interpretación |
|---|--|------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Control positivo (PC) | Ct ≤38,00 | Indiferente | Indiferente | Se valida la serie. |
| | Ct >38,00 o sin Ct | Indiferente | Indiferente | Se invalida la serie. |
| Control sin molde (NTC) o Control sin extracción (NEC) | Ct >38,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | Sí | Se valida la serie. |
| | Cualquier otra combinación con amplificación en verde o amarillo | | Indiferente | Se invalida la serie. |

Tabla 11. Criterios de validez de la serie e interpretación de resultados para ABI 7500 Fast Dx

| Control | Detección en el colorante FAM* | Detección en el colorante VIC/HEX* | Detección en el colorante Cy5/Atto* | Interpretación |
|---|---|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| Control positivo (PC) | Ct ≤39,00 | Indiferente | Indiferente | Se valida la serie. |
| | Ct >39,00 o sin Ct | Indiferente | Indiferente | Se invalida la serie. |
| Control sin molde (NTC) o Control sin extracción (NEC) | Ct >39,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | Sí | Se valida la serie. |
| | Cualquier otra combinación con amplificación en FAM o VIC/HEX | | Indiferente | Se invalida la serie. |

* FAM = filtro A/1 en la plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 en la plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 en la plataforma ABI

Para validar las muestras analizadas, estas deben amplificarse y detectarse según lo esperado.

Tabla 12. Criterios de validez de la muestra e interpretación de resultados para RGQ MDx 5plex HRM

| Detección en el canal Green | Detección en el canal Yellow | Detección en el canal Red | Interpretación |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|--|
| Ct ≤38,00 | Indiferente | Indiferente | Muestra positiva para el ARN del SARS-CoV-2. |
| Ct >38,00 o sin Ct | Ct ≤35,00 | Indiferente | Muestra negativa, ARN del SARS-CoV-2 no detectado. |
| Ct >38,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | Sí | Muestra no válida. No hay material humano o es insuficiente. Es necesario repetir el muestreo. |
| Ct >38,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | No | Muestra no válida. Se inhibe la reacción de RT-qPCR. Es necesario repetir el análisis. |

Tabla 13. Criterios de validez de la muestra e interpretación de resultados para ABI 7500 Fast Dx

| Detección en el colorante FAM* | Detección en el colorante VIC/HEX* | Detección en el colorante Cy5/Atto* | Interpretación |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Ct ≤39,00 | Indiferente | Indiferente | La muestra es positiva. |
| Ct >39,00 o sin Ct | Ct ≤35,00 | Indiferente | Muestra negativa, SARS-CoV-2 no detectado. |
| Ct >39,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | Sí | Muestra no válida. No se detecta material humano. Es necesario repetir el muestreo. |
| Ct >39,00 o sin Ct | Ct >35,00 o sin Ct | No | Muestra no válida. Se inhibe la reacción de RT-qPCR. Es necesario repetir el análisis. |

* FAM = filtro A/1 en la plataforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 en la plataforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 en la plataforma ABI

Limitaciones

- Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- Los resultados del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit no están pensados para utilizarse como el único fundamento en el que sustentar el diagnóstico o el tratamiento u otras decisiones de atención médica al paciente. Los resultados negativos no excluyen una infección por SARS-CoV-2 y no deben ser el único fundamento en el que sustentar la decisión de tratamiento de un paciente.
- Este producto debe ser utilizado por personal que haya recibido formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Debe cumplirse de forma estricta la guía del usuario de la plataforma qPCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx o ABI 7500 Fast Dx) para obtener resultados óptimos mediante PCR.
- Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Rendimiento

Sensibilidad analítica (límite de detección)

La sensibilidad analítica, o el límite de detección (Limit of Detection, LoD), se define como la concentración mínima en la que ≥ 95 % de las muestras analizadas generan un resultado positivo.

El LoD se evaluó mediante el análisis de diluciones en serie de muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo preparadas con disoluciones de partida de concentración elevada de partículas víricas inactivadas obtenidas de proveedores comerciales (ZeptoMetrix®). Para confirmar la concentración del LoD establecida, la tasa de detección de todas las réplicas debe ser ≥ 95 % (al menos 19/20 réplicas deben generar una señal positiva). La concentración del LoD se confirmó en ambas plataformas de real-time PCR declaradas mediante dos lotes de reactivos distintos.

El límite de detección declarado para ambas plataformas de real-time PCR para *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit es de 950 cp/ml.

Estudios de especificidad analítica (inclusividad y exclusividad/reactividad cruzada)

Inclusividad

La inclusividad de *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes se ha evaluado mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en la base de datos GISAID (www.gisaid.org). Un total de 722 488 secuencias (disponible el 23/03/2021) se analizaron en COVID CG (<https://covidcg.org>), análisis alimentado por metadatos GISAID.

Las secuencias se alinearon con la secuencia de referencia WIV04 (100 % idéntica a la Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, salvo por la longitud de la cola de poli(A)) y las variantes de un solo nucleótido (Single Nucleotide Variation, SNV) se analizaron en la región genómica diana de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primers and Probes. La prevalencia de las SNV identificadas permanecieron por debajo del 1 %, así como la frecuencia de las mutaciones concomitantes. No se detectó ninguna SNV en los últimos 1-3 nucleótidos desde el extremo 3' en los oligonucleótidos correspondientes, lo que se esperaría que afectara al rendimiento. Se considera que *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit es capaz de detectar el 100 % de las secuencias publicadas.

Exclusividad/reactividad cruzada

Análisis informático

La exclusividad de *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes se ha evaluado mediante un análisis informático de las secuencias almacenadas en el banco de datos del NCBI. El análisis informático mostró que algunos de los patógenos analizados poseen una homología superior al 80 % con respecto a uno de los cebadores o sondas *artus* SARS-CoV-2. Algunos son *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* presentó una homología inferior al 80 % en relación con uno de los cebadores o sondas del ensayo de SARS-CoV-2. No obstante, *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes no mostraron una amplificación posible con las distintas secuencias almacenadas en la base de datos de nucleótidos no redundantes (non-redundant nucleotide, nr/nt) del NCBI.

Se ha analizado un total de 36 cepas de bacterias, virus y hongos mediante PCR con un equipo informático con un tamaño de amplicón posible limitado de 500 bp. Las secuencias de patógenos se obtuvieron de la base de datos del NCBI, aunque ninguno de estos patógenos mostró una amplificación informática.

Tabla 14. Lista de patógenos analizados mediante equipo informático

| Patógenos | Cepa o tipo | ID de la taxonomía | Resultados de la PCR en el sistema informático |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|--|
| <i>Adenovirus de tipo 3</i> | Tipo 3 | 45659 | Sin coincidencia |
| <i>Adenovirus de tipo 4</i> | Tipo 4 | 28280 | Sin coincidencia |
| <i>Adenovirus de tipo 5</i> | Tipo 5 | 28285 | Sin coincidencia |
| <i>Adenovirus de tipo 7A</i> | Tipo 7A | 85755 | Sin coincidencia |
| <i>Adenovirus de tipo 14</i> | Tipo 14 | 10521 | Sin coincidencia |
| <i>Adenovirus de tipo 31</i> | Tipo 31 | 10529 | Sin coincidencia |
| <i>Bordetella pertussis</i> | A639 | 520 | Sin coincidencia |
| <i>Candida albicans</i> | Z006 SC5314 | 5476 | No se pudo realizar la amplificación*† |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | CWL-029 TW-183 | 115713 | Sin coincidencia |
| Enterovirus | Tipo 68 | 42789 | Sin coincidencia |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | KW20 | 727 | Sin coincidencia |
| Coronavirus humano | 229E | 11137 | Sin coincidencia |
| Coronavirus humano | NL63 | 277944 | Sin coincidencia |
| Coronavirus humano | HKU-1 | 290028 | Sin coincidencia |
| Coronavirus humano OC43 | OC43 | 31631 | Sin coincidencia |
| Coronavirus humano | MERS-CoV | 1335626 | Sin coincidencia |
| Metaneumovirus humano | n/a | 162145 | Sin coincidencia |
| Gripe A | H1N1 | 114727 | Sin coincidencia |
| Gripe A | H3N2 | 119210 | Sin coincidencia |
| Gripe B | n/a | 11520 | Sin coincidencia |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | M129 FH | 272634 | Sin coincidencia |

* La coincidencia de la secuencia con uno de los cebadores o sondas mostró una homología <80 %.

† La coincidencia de la secuencia con uno de los cebadores o sondas mostró una homología ≥80 %.

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 14 (continúa desde la página anterior)

| Patógenos | Cepa o tipo | ID de la taxonomía | Resultados de la PCR en el sistema informático |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|--|
| Virus paragripal | Tipo 1 | 12730 | Sin coincidencia |
| Virus paragripal | Tipo 2 | 2560525 | Sin coincidencia |
| Virus paragripal | Tipo 3 | 11216 | Sin coincidencia |
| Virus paragripal | Tipo 4 | 2560526 | Sin coincidencia |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | RU7 | 42068 | Sin coincidencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | PAO1 | 287 | No se pudo realizar la amplificación* |
| Virus respiratorio sincicial | Tipo A (VRS-A) | 208893 | Sin coincidencia |
| Virus respiratorio sincicial | Tipo B (VRS-B) | 208895 | Sin coincidencia |
| Rinovirus | Tipo A | 147711 | Sin coincidencia |
| Rinovirus | Tipo B | 147712 | Sin coincidencia |
| SARS-CoV | Tor2 | 694009 | No se pudo realizar la amplificación† |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | n/a | 1282 | Sin coincidencia |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | n/a | 1314 | No se pudo realizar la amplificación† |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3 | 1304 | No se pudo realizar la amplificación† |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC 700669 NCTC11032 | 1313 | Sin coincidencia |

* La coincidencia de la secuencia con uno de los cebadores o sondas mostró una homología <80 %.

† La coincidencia de la secuencia con uno de los cebadores o sondas mostró una homología ≥80 %.

Análisis *in vitro*

La reactividad cruzada se verificó *in vitro* y los patógenos mostraron una homología ≥80 % con SARS-CoV-2 Amp Primers en el análisis informático. Las muestras se prepararon añadiendo microorganismos que podían causar reactividad cruzada a una matriz de muestras nasofaríngeas obtenidas con hisopo a 10⁶ cp/ml, salvo en el caso de SARS-CoV-1, que se analizó sin diluir siguiendo la recomendación del proveedor. Ninguno de estos patógenos mostró una reactividad cruzada *in vitro*.

La interferencia microbiana del ensayo *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit se evaluó *in vitro* en un panel de patógenos recomendados. Las muestras se prepararon añadiendo un máximo de 5 patógenos —a 10⁵ TCID₅₀/ml para dianas víricas, 10⁶ cp/ml para dianas bacterianas y fúngicas o a la máxima concentración posible en función de la concentración de partida— a muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo enriquecidas a 2,87 × LoD con partículas inactivadas de SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix). Se añadieron directamente partículas víricas inactivadas de SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a paneles NATrol™ y SARS-CoV-1 a 2,87 × LoD. A continuación, se resumen los resultados de cada grupo de microorganismos analizado y las concentraciones correspondientes.

Tabla 15. Lista de patógenos sometidos a análisis *in vitro* de interferencia microbiana.

| ID del grupo o ID de la muestra | Micorganismo | Origen | Concentración final | Unidad | Resultado |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|
| Grupo 1 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Coronavirus humano 229E | ZeptoMetrix (0810229CFHI) | 1,43E+05 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Coronavirus humano OC43 | ZeptoMetrix (0810024CFHI) | 5,86E+04 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Coronavirus humano NL63 | ZeptoMetrix (0810228CFHI) | 2,84E+04 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Adenovirus T3 | ZeptoMetrix (0810016CFHI) | 1,43E+05 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Virus paragripal 1 | ZeptoMetrix (0810014CFHI) | 9,14E+06 | TCID ₅₀ /ml | |
| Grupo 2 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Adenovirus T31 | ZeptoMetrix (0810073CFHI) | 1,67E+04 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Virus paragripal 2 | ZeptoMetrix (0810015CFHI) | 4,29E+04 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Gripe B Florida/02/2006 | ZeptoMetrix (0810037CFHI) | 1,43E+05 | TCID ₅₀ /ml | |
| | Rinovirus T 1A | ZeptoMetrix (0810012CFNHI) | 2,86E+04 | TCID ₅₀ /ml | |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 15 (continúa desde la página anterior)

| ID del grupo o ID de la muestra | Microorganismo | Origen | Concentración final | Unidad | Resultado |
|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------|-----------|-------------------|
| Grupo 3 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Virus paragripal T3 | ZeptoMetrix (0810016CFHI) | 1,43E+07 | TCID50/ml | |
| | <i>Haemophilus influenzae</i> | ATCC (51907D-5) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC (700669DQ) | 3,30E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Candida albicans</i> | ZeptoMetrix (0801504DNA) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC (12228DQ) | 4,60E+06 | CFU/ml | |
| Grupo 4 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Adenovirus T7A | ZeptoMetrix (0810021CFHI) | 1,02E+06 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | ATCC (700294DQ) | 1,00E+07 | CFU/ml | |
| | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | ZeptoMetrix (0801579DNA) | 1,00E+08 | CFU/ml | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC (47085DQ) | 1,00E+07 | CFU/ml | |
| Grupo 5 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Virus respiratorio sincial VRSA | ZeptoMetrix (0810482CFHI) | 7,14E+04 | TCID50/ml | |
| | Gripe A H1N1 California | ZeptoMetrix (0810165CFHI) | 1,43E+04 | TCID50/ml | |
| | Enterovirus tipo 68 Grupo principal | ZeptoMetrix (0810300CFHI) | 1,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Adenovirus T14 | ZeptoMetrix (0810108CFHI) | 2,86E+04 | TCID50/ml | |
| Grupo 6 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | MERS-CoV | ZeptoMetrix (0810575CFHI) | 1,43E+04 | TCID50/ml | |
| | Adenovirus T4 | ZeptoMetrix (0810070CFHI) | 1,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Metaneumovirus humano (MNVh) tipo B | ZeptoMetrix (0810156CFHI) | 7,14E+03 | TCID50/ml | |
| | Virus respiratorio sincial de tipo B (VRS-B) | ZeptoMetrix (0810040CFHI) | 1,43E+03 | TCID50/ml | |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 15 (continúa desde la página anterior)

| ID del grupo o ID de la muestra | Microrganismo | Origen | Concentración final | Unidad | Resultado |
|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------|-----------|-------------------|
| Grupo 7 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | Adenovirus T5 | ZeptoMetrix (0810020CFHI) | 6,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Virus paragripal 4B | ZeptoMetrix (0810060BCFHI) | 7,14E+04 | TCID50/ml | |
| | Gripe A H3N2 Suiza/9715293/13 | ZeptoMetrix (0810511CFHI) | 2,86E+04 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> | ZeptoMetrix (BAA-1024D-5) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| Grupo 8 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | NATrol Panel RP1 (gripe A H3N2 (Brisbane/10/07), gripe A H1N1 (NY/02/2009), rinovirus (tipo 1A), adenovirus T3, virus paragripal T1, virus paragripal T4, metaneumovirus (Perú 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), virus de Coxsackie (tipo A1) | ZeptoMetrix (MDZ001) | Desconocida* | N/D | |
| Grupo 9 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | NATrol Panel RP2 (gripe A H1 (New Caledonia/20/99), gripe B (Florida/02/06), VRS-A, virus paragripal T2, virus paragripal T3, coronavirus HKU recombinante, coronavirus (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639) | ZeptoMetrix (MDZ001) | Desconocida* | N/D | |
| Grupo 10 | SARS-CoV-2 | ZeptoMetrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Sin interferencia |
| | SARS-CoV-1 | ZeptoMetrix (NATSARS-ST) | Desconocida* | N/D | |

* Concentración no comunicada por parte del proveedor.

Sustancias interferentes

Se evaluó el efecto de las supuestas sustancias interferentes (sustancias que figuran en la tabla 16) en el rendimiento de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Los análisis se realizaron en 3 grupos de muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo y 3 grupos de muestras nasofaríngeas positivas obtenidas con hisopo enriquecidas a 4 x LoD con partículas víricas inactivadas de SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix). Los experimentos los llevó a cabo 1 operario en la plataforma RGQ MDx 5plex HRM (en 4 instrumentos) con un kit de prueba.

Cada grupo se dividió en 2 para analizar la sustancia interferente disuelta en un disolvente (muestra de prueba) o el disolvente solo (muestra de control). Las tasas de aciertos en los canales de fluorescencia verde y rojo se compararon entre las muestras de la prueba y sus correspondientes muestras de control. Cuando no hay interferencia, las muestras de la prueba y sus correspondientes muestras de control tienen la misma tasa de acierto.

En la tabla 16 se muestra que ninguna de las sustancias analizadas interfiere con el rendimiento de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit en el canal de fluorescencia verde.

Tabla 16. Lista de sustancias interferentes.

| Sustancias interferentes | Función | Concentración analizada | Resultados en muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo | Resultados en muestras nasofaríngeas positivas obtenidas con hisopo (4 x LoD) |
|--|-------------------------------|-------------------------|---|---|
| Tobramicina | Antibiótico sistémico | 1 mg/ml | Sin interferencia 0/15 | Sin interferencia 0/15 |
| Mupirocina | Pomada nasal antibiótica | 6,6 mg/ml | Sin interferencia 0/15 | Sin interferencia 0/15 |
| Fluticasona | Corticosteroide nasal | 5% (v/v) | Sin interferencia 0/15 | Sin interferencia 0/15 |
| Mentol (pastillas para la garganta) | Anestésico y analgésico bucal | 0,5 mg/ml | Sin interferencia 0/15 | Sin interferencia 0/15 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla 16. (Continúa de la página anterior)

| Sustancias interferentes | Función | Concentración analizada | Resultados en muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo | Resultados en muestras nasofaríngeas positivas obtenidas con hisopo (4 × LoD) |
|---|--------------------|-------------------------|---|---|
| Oximetazolina | Aerosol nasal | 10% (v/v) | Sin interferencia (0/15) | Sin interferencia (0/15) |
| Oseltamivir | Fármaco antivírico | 3,3 mg/ml | Sin interferencia (0/15) | Sin interferencia (0/15) |
| Mucina (glándula submaxilar bovina tipo I-S) | | 2,5 mg/ml | Sin interferencia (0/15) | Sin interferencia (0/15) |
| Sangre total | | 4% (v/v) | Sin interferencia (1/15*) | Sin interferencia (0/15) |

* Se detectó una amplificación correspondiente a un artefacto.

Precisión

El estudio de precisión evaluó la reproducibilidad (repetición de la misma muestra en distintas series y con distintas condiciones: 5 días, 3 lotes de kits, 3 operarios y 2 instrumentos) y la repetibilidad (repetición de la misma muestra en la misma serie y con las mismas condiciones). Se realizaron pruebas en muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo y en muestras nasofaríngeas negativas obtenidas con hisopo enriquecidas a 5 × LoD en la plataforma RGQ MDx.

Para cada nivel de dilución, se recopilaron 204 puntos de datos. Los datos de repetibilidad y reproducibilidad se utilizaron para determinar la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV) para las dianas de SARS-CoV-2 en los canales verde, amarillo y rojo. Tabla 17 se muestra que *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit tiene una precisión total de 0,63 de DE (CV 2,03 %) en el canal verde, 0,54 de DE (CV 2,22 %) en el canal amarillo y de 1,28 de DE (CV 4,10 %) en el canal rojo.

Tabla 17. Desviación estándar y coeficiente de variación de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

| Muestras y canales de detección | Total | Entre días | Entre lotes | Entre operarios | Entre instrumentos | Entre series | En la serie analítica |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| Desviación estándar (DE) (coeficiente de variación [% CV]) | | | | | | | |
| NPS negativa Canal Yellow | 0,54 (2,22) | 0,09 (0,37) | 0,10 (0,42) | 0,06 (0,27) | 0,11 (0,47) | 0,09 (0,36) | 0,50 (2,05) |
| NPS negativa Canal Red | 1,15 (3,68) | 0,0 (0,00) | 0,55 (1,76) | 0,00 (0,00) | 0,12 (0,40) | 0,39 (1,26) | 0,92 (2,96) |
| NPS enriquecida Canal Green | 0,63 (2,03) | 0,18 (0,59) | 0,31 (1,00) | 0,00 (0,00) | 0,08 (0,25) | 0,00 (0,00) | 0,51 (1,64) |
| NPS enriquecida Canal Yellow | 0,47 (1,93) | 0,13 (0,53) | 0,24 (0,98) | 0,05 (0,20) | 0,18 (0,73) | 0,00 (0,00) | 0,33 (1,38) |
| NPS enriquecida Canal Red | 1,28 (4,10) | 0,12 (0,37) | 0,58 (1,84) | 0,11 (0,34) | 0,00 (0,00) | 0,49 (1,57) | 1,02 (3,27) |

Rendimiento clínico

Se evaluó el rendimiento clínico del ensayo *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp* utilizando muestras nasofaríngeas retrospectivas obtenidas con hisopo en medio de transporte que incluían:

- 98 unidades de material de muestra negativas para ARN del SARS-CoV-2
- 52 unidades de material de muestra positivas para el ARN del SARS-CoV-2

Todo el material de muestra se obtuvo de pacientes con signos y síntomas de infección por COVID-19 y se almacenaron congeladas hasta que se utilizaron.

La validación clínica se realizó en la plataforma ABI 7500 Fast Dx. Tabla 18 informa del rendimiento de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* con respecto a un método de referencia, el cual se expresa como porcentaje de concordancia positiva (PCP) y un porcentaje de concordancia negativa (PCN).

Tabla 18. Rendimiento clínico de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit con respecto a un método de referencia

| Tipo de muestra | N | % positivo | IC del 95% | % negativo | IC del 95% |
|-----------------|----|-----------------|------------|-----------------|------------|
| Positivo | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9-99,7 | 5,1 (5/98) | |
| Negativo | 98 | 1,9 (1/52) | | 94,9 (93/98) | 88,7-97,8 |

Los resultados discordantes se evaluaron con un tercer método y se volvieron a analizar con una tabla de contingencia. Los resultados del rendimiento clínico total se expresan como porcentaje de concordancia positiva (PCP) y porcentaje de concordancia negativa (PCN), y se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Rendimiento clínico de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

| Tipo de muestra | N | % positivo | IC del 95% | % negativo | IC del 95% |
|-----------------|----|-----------------|------------|-----------------|------------|
| Positivo | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9-99,7 | 5,1 (5/98) | |
| Negativo | 98 | 1,9 (1/52) | | 94,9 (93/98) | 88,7-97,8 |

A continuación encontrará la fracción de las muestras de los porcentajes de concordancia positiva y negativa (PCP i PCN, respectivamente) con los estados de las muestras previstos:

Porcentaje de concordancia

positiva (%PCP): $51/52 = 98,1 \%$ (IC del 95 %: 89,9 %-99,7 %)

Porcentaje de concordancia

negativa (%PCN): $93/98 = 94,9\%$ (IC del 95 %: 88,6 %-97,8 %)

Rendimiento clínico incluidas personas asintomáticas

Se evaluó el rendimiento clínico del ensayo *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp utilizando material retrospectivo de muestra nasofaríngea obtenida con hisopo en medio de transporte que incluía:

- 100 unidades de material de muestra negativas para ARN del SARS-CoV-2
- 53 unidades de material de muestra positivas para el ARN del SARS-CoV-2

Todas las muestras se recopilaron de pacientes asintomáticos o con otros motivos para sospechar de infección por COVID-19.

La validación clínica se realizó en la plataforma ABI 7500 Fast Dx. Se excluyeron dieciséis muestras del análisis después de analizarlas con *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit debido a un estado no válido de conformidad con los criterios de validez de la muestra (Tabla 13).

La tabla 20 indica el rendimiento del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit con respecto a un método de referencia, el cual se expresa como porcentaje de concordancia positiva (PCP) y porcentaje de concordancia negativa (PCN).

Tabla 20. Rendimiento clínico de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit con respecto a un método de referencia

| Tipo de muestra | N | % positivo | IC del 95% | % negativo | IC del 95% |
|-----------------|----|-----------------|------------|------------------|------------|
| Positivo | 50 | 64,0 (32/50) | 50,1-75,9 | 1,15 (1/87) | – |
| Negativo | 87 | 36,0 (18/50) | – | 98,85 (86/87) | 93,8-99,8 |

Se evaluaron diecinueve resultados discordantes con un tercer método y se volvieron a analizar con una tabla de contingencia. Los resultados del rendimiento clínico total se expresan como porcentaje de concordancia positiva (PCP) y porcentaje de concordancia negativa (PCN), y se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Rendimiento clínico de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

| Tipo de muestra | N | % positivo | IC del 95% | % negativo | IC del 95% |
|-----------------|-----|------------------|------------|--------------------|------------|
| Positivo | 32 | 100,0 (32/32) | 89,3-100,0 | 0,95 (1/105) | - |
| Negativo | 105 | - | - | 99,05 (104/105) | 94,8-99,8 |

Se volvieron a clasificar dieciocho muestras falsas negativas como negativos verdaderos, mientras que una muestras falsa positiva permaneció como falsa positiva.

A continuación encontrará la fracción de las muestras de los porcentajes de concordancia positiva y negativa (PCP i PCN, respectivamente) con los estados de las muestras previstos:

Porcentaje de concordancia

positiva (%PCP): $32/32 = 100,0\%$ (IC del 95 %: 89,3% - 100,0%)

Porcentaje de concordancia

negativa (%PCN): $104/105 = 99,05\%$ (IC del 95 %: 94,8% - 99,8%)

Referencias

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Guía de resolución de problemas

Esta guía para la resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions, FAQ) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Comentarios y sugerencias

Señal Green débil o nula (FAM) en control positivo (Positive Control, PC)

- | | |
|--|---|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de datos de RT-PCR no cumple el protocolo. | Para el análisis de los datos, seleccione el canal de fluorescencia FAM (verde) para las dianas analíticas de RT-PCR del SARS-CoV-2, el canal de fluorescencia HEX/VIC/JOE (amarillo) para el control de muestreo y Cy5/Atto (rojo) para el control interno. |
| b) Programación incorrecta del perfil de temperatura. | Compare el programa de RT-PCR con el protocolo. |
| c) Configuración incorrecta de la reacción de PCR | Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo y repita la PCR en caso necesario. |
| d) Las condiciones de almacenamiento para uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones o el <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit ha caducado. | Siga las condiciones de almacenamiento, verifique la fecha de caducidad de los reactivos y use un nuevo kit, si es necesario. |
| e) Configuración incorrecta de la plataforma de qPCR durante la configuración de los datos. | Aplique las configuraciones recomendadas relativas a su plataforma de qPCR que se describen en este manual. |
| f) Se produjo la inhibición de la PCR. | Siga las prácticas recomendadas para laboratorios de biología molecular a fin de evitar la introducción de contaminantes. Compruebe periódicamente que el espacio de trabajo y los instrumentos estén desinfectados. Siga el protocolo mencionado en este manual. Compruebe la fecha de caducidad del reactivo y, si es necesario, utilice un kit nuevo. Repita el ensayo con otra muestra. |

Señal Green (FAM) en el control sin molde o en el control sin extracción

Se ha producido contaminación con secuencias del SARS-CoV-2 durante la preparación de la placa de RT-PCR.

- Repita la RT-PCR con reactivos nuevos.
- Siga las prácticas recomendadas para laboratorios de biología molecular a fin de evitar la introducción de contaminantes. Siga el protocolo mencionado en este manual de uso.
- Compruebe periódicamente que el espacio de trabajo y los instrumentos estén desinfectados.

Comentarios y sugerencias

Señal roja débil o nula (Cy5/Atto) del control interno

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Se ha introducido una sustancia interferente en la reacción de la RT-PCR. Se produce la inhibición de la PCR. | Siga las prácticas recomendadas para laboratorios de biología molecular a fin de evitar la introducción de contaminantes. Compruebe periódicamente que el espacio de trabajo y los instrumentos estén desinfectados. Siga el protocolo mencionado en este manual. Repita el experimento con una muestra recién recogida. |
| b) | El control interno está deteriorado. | Siga las prácticas recomendadas para laboratorios de biología molecular a fin de evitar la introducción de ARNasas. Siga las recomendaciones mencionadas en este manual. Compruebe periódicamente que el espacio de trabajo y los instrumentos estén desinfectados. Siga las condiciones de almacenamiento y compruebe la fecha de caducidad de los reactivos y, si es necesario, use un nuevo kit. |
| c) | Configuración incorrecta de la plataforma de qPCR durante la configuración de los datos. | Aplique las configuraciones recomendadas relativas a su plataforma de qPCR que se describen en este manual. |

Señal amarilla débil o nula (VIC/HEX) del control de muestreo

- | | | |
|----|---|--|
| a) | La muestra clínica está degradada. | Siga las recomendaciones proporcionadas por el proveedor del dispositivo de recogida para su almacenamiento, manipulación y transporte. Siga el protocolo mencionado en este manual, incluidos los pasos de preparación de las muestras con el SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Siga las condiciones de almacenamiento y compruebe la fecha de caducidad de los reactivos, como el SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, y use un nuevo kit, si es necesario. |
| b) | El material de muestra no se recogió correctamente. No se recogieron suficientes células humanas en el hisopo o no se transfirieron al medio de transporte. | Siga las recomendaciones proporcionadas por el proveedor del dispositivo de recogida para la recogida y manipulación del material de muestra. |
| c) | Configuración incorrecta de la plataforma de qPCR durante la configuración de los datos. | Aplique las configuraciones relacionadas con su plataforma de qPCR que se describen en este manual. |

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado, pueden aparecer los siguientes símbolos:

| Símbolo | Definición del símbolo |
|---|---|
|  | Contiene reactivos suficientes para 768 o 3072 reacciones |
|  | Fecha de caducidad |
|  | Producto sanitario para diagnóstico in vitro |
|  | Número de referencia |
|  | Número de lote |
|  | Componentes |
|  | Contenido |
|  | Número |
|  | Número mundial de artículo comercial |
|  | "R" es la revisión de las Instrucciones de uso y "n" es el número de revisión |
|  | Limitación de temperatura |
|  | Fabricante |
|  | Consultar las instrucciones de uso |
|  | Mantener alejado de la luz solar |
|  | Advertencia/precaución |

Información de contacto

Si desea recibir asistencia técnica y más información, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN en **support.qiagen.com**.

Información para pedidos

| Producto | Contenido | N.º de cat. |
|--|---|-------------|
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768) | Para 768 reacciones: tampón de preparación, colorante ROX, mezcla maestra, cebadores y sondas, control interno, agua (NTC) y control positivo | 4511460 |
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072) | Para 3072 reacciones: tampón de preparación, colorante ROX, mezcla maestra, cebadores y sondas, control interno, agua (NTC) y control positivo | 4511469 |
| Instrumento y accesorios | | |
| PCR Tubes, 0.1 ml para Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Para su uso con 72-Well Rotor, tubos de tiras y tapones | 981103 |
| Software Rotor-Gene Q | Software Rotor-Gene Q, versión 2.3.1 (o superior) | |
| Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Termociclador de Real-time PCR con 5 canales, analizador de disociación de alta resolución, software, ordenador portátil y accesorios. Garantía de 1 año en piezas y mano de obra, instalación. | 9002032 |
| Loading Block | 72 tubos de 0,1 ml | 9018901 |

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías de usuario del kit de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

| Revisión | Descripción |
|-------------------|---|
| R1, abril de 2021 | Versión inicial. |
| R2, julio 2021 | <p>Ampliación de la reclamación: Se ha establecido el análisis para personas asintomáticas. Uso previsto se actualizó para incluir personas asintomáticas o con otros motivos para sospechar de infección por COVID-19. Se añadió la sección sobre Rendimiento clínico incluidas personas asintomáticas a los datos de Rendimiento.</p> <p>Se ha eliminado la afirmación “No se ha establecido el rendimiento de esta prueba en pacientes sin signos y síntomas de infección respiratoria” en la sección Limitaciones.</p> <p>Cambios editoriales y de formato menores.</p> |

Acuerdo de licencia limitada para el *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); ZeptoMetric®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com