

Ascires® SGKit

COVID-19 PCR FAST Lyo-H

Kit para la detección de SARS-CoV-2 mediante amplificación en tiempo real de secuencias específicas del genoma viral a partir de muestras respiratorias.

Para PCR tiempo real

Protocolo

Versión 01, noviembre 2020

Este producto ha sido diseñado y fabricado por Sistemas Genómicos S.L., cuyo sistema de gestión ha sido certificado por AENOR, en base a la norma ISO13485, con número de registro de empresa GS-0001/2015

Este protocolo debe ser leído en su totalidad antes de utilizar el producto

Precauciones y Advertencias

- Antes de utilizar este producto, consulte siempre la versión más reciente de la descripción correspondiente al mismo, así como este protocolo.
- Solamente para uso profesional. El rendimiento del ensayo depende de la habilidad del operario y del seguimiento de las instrucciones del procedimiento. El ensayo deberá llevarse a cabo por profesionales cualificados en técnicas moleculares. La persona responsable de la interpretación de los resultados deberá estar al corriente de los últimos conocimientos científicos de la aplicación en cuestión, así como de cualquier limitación del procedimiento que pudiera llevar a resultados incorrectos.
- Antes de empezar un experimento, asegúrese de leer y comprender la información proporcionada en este protocolo y de disponer del equipo y de los reactivos que se relacionan.



Información de Seguridad

Siga los procedimientos de seguridad estándar de laboratorio, lleve una bata adecuada y guantes desechables para garantizar la seguridad personal. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (MSDS) que ha recibido junto con este protocolo.

Listado de abreviaturas

| Abreviatura | Descripción |
|-------------|--|
| RT-PCR | Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| ORF | <i>Open reading frame</i> |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RT | Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>) |

Avisos legales

- Ninguna parte de este protocolo puede ser reproducida en ninguna forma ni por ningún medio sin la autorización previa y por escrito de Sistemas Genómicos, S.L.
- El material contenido en este documento se proporciona "tal cual" y está sujeto a modificaciones, sin previo aviso, en ediciones futuras. Por ello, debe consultar, tras cada adquisición del producto, el presente protocolo.
- La entidad responsable del presente producto es SISTEMAS GENÓMICOS, S.L., (en adelante "SG"), con domicilio en Paterna (Valencia), Parque Tecnológico, calle G. Marconi, número 6, y con C.I.F. B-96779764.
- SG no cubrirá ni responderá de ninguna de las garantías, expresas o implícitas, contenidas en el presente manual, ni responderá de cualquier información contenida en el mismo, especialmente, pero no limitando, las garantías de comerciabilidad e idoneidad, cuando el producto es usado para un propósito particular no contemplado en el presente manual.
- SG no será responsable por errores o daños, de cualquier tipo y naturaleza, por el mal uso que se lleve a cabo de los productos del presente manual. Los productos incluidos en el presente manual deben ser usados por una persona apta para tal fin.
- Si SG y el usuario de los productos del presente manual, tienen un contrato o acuerdo, por escrito, regulador de los términos y garantías de los productos que se contemplan en el presente manual, y dicho contrato o acuerdo es contradictorio con el presente documento, prevalecerán los términos y garantías del referido contrato o acuerdo que tengan SG y el usuario.

Fabricado por Sistemas Genómicos

Web: www.sistemasgenomicos.com

E-mails:

direcciondeservicios@sistemasgenomicos.com (información y cuestiones técnicas)

comercial@sistemasgenomicos.com (Pedidos)

Contenido

| | | |
|----|--|----|
| A. | Información General | 5 |
| 1. | Introducción | 5 |
| 2. | Contenido del Kit..... | 7 |
| 3. | Equipos, Material y Reactivos necesarios | 8 |
| 4. | Notas sobre el procedimiento..... | 9 |
| 5. | Requisitos de la Muestra..... | 11 |
| B. | Procedimiento de Análisis..... | 12 |
| 1. | Diseño del experimento | 12 |
| 2. | Preparación de la reacción..... | 13 |
| 3. | Análisis de resultados..... | 17 |
| C. | Parámetros técnicos..... | 19 |
| D. | Limitaciones del método..... | 21 |
| E. | Bibliografía | 22 |
| F. | Anexo I..... | 23 |

A. Información General

1. Introducción

Uso Previsto

COVID-19 PCR FAST Lyo-H permite la detección específica del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 a partir de muestras nasofaríngeas sometidas a un tratamiento enzimático y térmico específico con un tampón recomendado (LV4370: Tampón de transporte y extracción viral X 25 o LV4371: Tampón de transporte y extracción viral X100), sin pasar por el proceso de extracción y purificación de ARN con kits comerciales, de una manera rápida, sensible y específica.

El kit detecta 2 regiones conservadas del genoma de los marcos de lectura *Orf1a* y *Orf1b*, respectivamente, que codifican sendas poliproteínas no estructurales implicadas en la replicación viral.

El kit incluye un sistema independiente de comprobación de presencia y calidad de ARN humano en la muestra, mediante la amplificación específica del gen de la RNAsa P humano, y funciona como control de la toma de muestra y la extracción de ARN.

Este manual contiene las instrucciones para la preparación de muestras y amplificación de las dianas específicas del SARS-CoV-2 y de RNAsa P humana. La amplificación se realiza mediante retrotranscripción y PCR en un solo paso (RT-PCR) y la detección mediante sondas fluorescentes específicas para SARS-CoV-2 en una única reacción *multiplex*, y en una reacción independiente para la RNAsa P. La figura 1 muestra el flujo de trabajo con Ascires® SGKit COVID-19 PCR FAST Lyo-H:

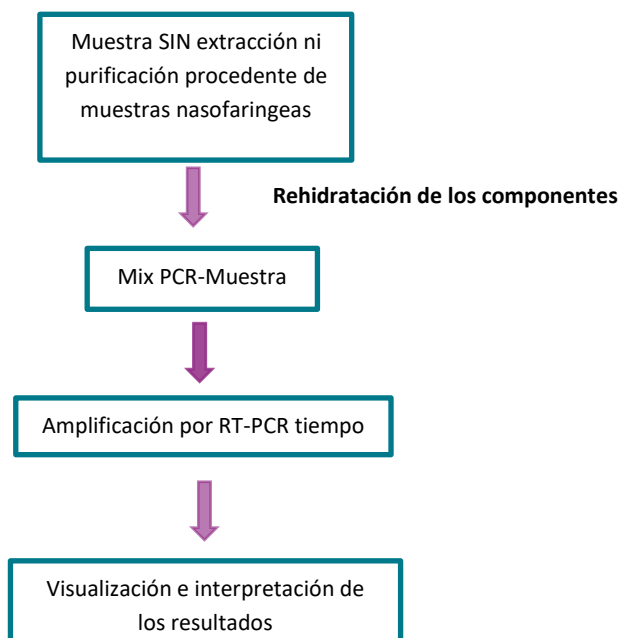


Figura 1. Flujo de trabajo con Ascires® SGKit COVID-19 PCR FAST Lyo-H

Principio del método

Los coronavirus son virus de ARN que están distribuidos entre humanos, otros mamíferos y aves, y pueden causar enfermedades respiratorias, neurológicas y hepáticas [1]. El 31 de diciembre de 2019, la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (China) informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre un grupo de casos de neumonía de causa desconocida [2]. Posteriormente, se identificó el agente causante de esta nueva neumonía como un virus perteneciente a la familia Coronaviridae, nombrado por el comité internacional para la taxonomía de virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) como SARS-CoV-2 [3] y la OMS anunció que el nombre de la enfermedad producida a causa de este virus se denomina COVID-19 [4].

El material genético de SARS-CoV-2, como todos los coronavirus, consiste en una única cadena de ARN. La técnica empleada en el kit es RT-PCR tiempo real, de la cual se ha descrito la validez y utilidad de esta metodología en la detección y diagnóstico de SARS-CoV-2 [5,6,7]. Por lo tanto, se considera actualmente, la *gold standard* para este tipo de análisis y para el diagnóstico de coronavirus.

El proceso de trabajo de **COVID-19 PCR FAST Lyo-H** inicia con una retrotranscripción (RT) en la cual se genera el ADN complementario (ADNc) utilizando como molde el ARN. Posteriormente, se procede a la amplificación mediante PCR tiempo real, utilizando 2 cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción, sondas conjugadas con un fluoróforo y una polimerasa termoestable. De este modo, la sonda que hibrida en la zona intermedia entre los cebadores es hidrolizada por la polimerasa durante el proceso de amplificación y emite la fluorescencia que será posible medir en un termociclador provisto de sensores de fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación por lo que los resultados se visualizan en tiempo real en el ciclo en el que comienza a detectarse las dianas específicas, y directamente en el software disponible en el termociclador.

La reacción de retrotranscripción y PCR se realizan en una única reacción (de allí que sea un solo paso). Asimismo, el empleo de distintos fluoróforos permite combinar distintas dianas en una sola reacción (multiplexado) para ser leídas en distintas longitudes de onda, por lo tanto, la técnica empleada en este kit permite la detección de las dianas específicas del genoma viral *Orf1a* (fluoróforo Cy5) y *Orf1b* (fluoróforo FAM), así como de un control interno (fluoróforo HEX), en una única reacción por muestra. La amplificación de la RNAsa P se realiza en una reacción independiente con una sonda fluorescente para ser leída en la longitud de onda correspondiente (fluoróforo HEX).

Como se indica en la figura 1, la amplificación en el termociclador a tiempo real permite detectar la presencia/ausencia de las dianas y el control interno de la reacción. El flujo de trabajo con este kit permite también incluir un control positivo para la verificación del rendimiento del ensayo y facilitar la interpretación de resultados y un control negativo para descartar contaminación cruzada en la reacción. Una vez finalizados los ciclos en el termociclador, se procede con la visualización e interpretación de los resultados, lo cual se puede realizar en el software disponible en el termociclador.

2. Contenido del Kit

COVID-19 PCR FAST Lyo-H contiene los reactivos necesarios para la realización de 96 reacciones de PCR a tiempo real.

A la recepción del kit, los reactivos podrán almacenarse a temperatura ambiente, protegidos de la luz y la humedad. Una vez resuspendidos, deberán guardarse a -20 °C y protegidos de la luz para asegurar el rendimiento del producto durante la vida útil declarada.

Tabla 1. Contenido del kit

| Reactivo | Abreviatura | Cantidad | Almacenamiento |
|--|-----------------------|---------------------|--|
| Mix Primer/Probe_RTPCR COVID19 | RTPCR COVID-19 MMIX | 96 reacciones | -20 °C una vez rehidratado ^{1, 2} |
| Rehydration Buffer_RTPCR COVID19 | RTPCR COVID-19 BUFFER | 2000 µl | RT |
| Positive Control_RTPCR COVID 19 | RTPCR COVID-19 C+ | 12 reacciones | -20 °C una vez rehidratado ² |
| Control Calidad Muestra_RTPCR COVID 19 | RTPCR COVID-19 CCM | 12 reacciones | -20 °C una vez rehidratado ^{1, 2} |
| Tapas ópticas | | 12 tiras de 8 tapas | RT |

¹Protegido de la luz.

²Almacenamiento a RT protegido de la humedad hasta la rehidratación.

Control de Calidad



Cada lote de **COVID-19 PCR FAST Lyo-H** ha sido sometido a un riguroso control de calidad, mediante la amplificación de las dianas específicas del virus SARS-CoV-2 y RNAsa P humana en termocicladores de PCR a tiempo real, para asegurar la calidad del producto y su consistencia.

3. Equipos, Material y Reactivos necesarios

Antes de proceder con el ensayo, asegúrese de disponer de todos los reactivos, el material y los equipos necesarios. Todos los reactivos, equipos y fungible deben estar libres de nucleasas y de contaminación con ácidos nucleicos.

El protocolo **COVID-19 PCR FAST Lyo-H** ha sido optimizado y validado utilizando el material no suministrado con el kit de la tabla que se muestra a continuación (Tabla 2).

Se recomienda descontaminar las superficies de trabajo con soluciones que eliminan las ARNasas y el ADN.

Tabla 2. Material requerido no suministrado con el kit

| Descripción |
|---|
| Termociclador tiempo real* |
| Pipetas calibradas para volúmenes de 1 a 20µl |
| Puntas con filtro de baja retención |
| Vortex |
| Centrífuga o spin para placas de PCR de 96 reacciones |
| Guantes sin polvo |
| Bloque térmico |
| Tampón de transporte y extracción viral (Formato X 25: LV4370 ó Formato X100) |

*El termociclador empleado debe permitir la lectura de fluorescencia de los fluoróforos FAM, HEX (VIC) y Cy5.

4. Notas sobre el procedimiento

Durante la ejecución del protocolo, debe seguir siempre buenas prácticas de laboratorio de Biología Molecular. Por favor, asegúrese de leer y entender las siguientes pautas.

1. Se deberán tener en cuenta las recomendaciones indicadas por la OMS en sus publicaciones específicas sobre COVID-19. Organización Mundial de la Salud (OMS). Laboratory biosafety guidance related to coronavirusdisease (COVID-19). 13/5/2020.

[https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19))

2. la manipulación de muestras que puedan contener virus vivos sin inactivar debe ser realizada en cabina de seguridad en un laboratorio LBS2, con el equipo de protección adecuado. Las muestras con posible contenido con virus deben ser tratadas en cabina de seguridad según las recomendaciones de la OMS. Para el protocolo SIN extracción NUNCA se deben abrir los Tampones de transporte y extracción con muestras sin haber sido previamente tratados e inactivados según las instrucciones de uso.
3. Para obtener resultados consistentes y reproducibles, es necesario seguir unas buenas prácticas en la manipulación de los reactivos:
 - Utilice pipetas correctamente calibradas.
 - Utilice puntas con filtro de baja retención.
 - Mida cuidadosamente los volúmenes de los reactivos, evitando las salpicaduras y las burbujas.
 - Combine los reactivos como se describe en cada paso. Siga siempre las instrucciones que se especifican en cada punto del protocolo.
 - Cambie de punta entre muestras.
 - Lleve siempre guantes de laboratorio sin polvo.
4. Salvo que se mencione explícitamente, todos los pasos deben llevarse a cabo a temperatura ambiente (20-25 °C).
5. Evite la contaminación con material genético humano que podría dar falsos positivos en la amplificación del control de la muestra RNAsa P humana.
6. Evite la contaminación por productos de PCR:
 - Mantenga el lugar de trabajo limpio, descontamine la superficie de trabajo con soluciones que eliminen las ARNasas y el ADN.
 - Utilice puntas con filtro para evitar la contaminación de las pipetas.

7. Calibración de los equipos:

- Asegure que el termociclador tiempo real ha sido instalado, calibrado y tiene el mantenimiento apropiado, según las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

8. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Obsérvese la regulación local en materia de gestión de residuos.

5. Requisitos de la Muestra

Procedimiento de Toma de muestra recomendado:

- La muestra se toma de un solo orificio nasal, reduciendo las molestias del paciente.
- Tras la toma la muestra se introduce el hisopo en el tubo de recogida que contiene 1ml del buffer de transporte y extracción viral.
- Es muy importante que se realicen 30 vueltas del hisopo tocando las paredes del tubo para soltar todo el contenido celular en el medio.
- Se desecha el hisopo a residuos especiales y se cierra el tubo de recogida de muestra que ya contiene los reactivos necesarios para el tratamiento enzimático siguiente.

El tampón de transporte y extracción viral (Formato X 25: LV4370 ó Formato X100), está diseñado para preservar la muestra durante el transporte a 4°C y en el mismo tiempo realizar la desnaturalización de la cápside viral, la liberación y secuestro del ARN. Esto ocurre mediante acción enzimática que digiere el tejido y la mucosidad además de desnaturalización de las estructuras proteicas presentes en el medio como es la cápside viral, ya que permite el acceso al ARN para posterior amplificación por RT-PCR. La mezcla contiene moléculas que conservan el material genético del virus y evitan su degradación. Algunas de estas enzimas necesitan acción de temperatura para su actividad.

Protocolo de tratamiento enzimático y secuestro del ARN:

- Colocar el tampón de transporte y extracción viral con la muestra en un bloque térmico para tubos de 2ml a 60°C durante 5 min.
- Cambiar el tubo a otro bloque térmico a una temperatura de 98°C durante 2 min. Una vez finalizado, enfría el tubo el hielo.

Se aconseja siempre añadir un tubo adicional sin muestra como control de extracción (CEN). Este debe proporcionar un CI a ciclos menores de 29 y con fluorescencia igual que el tubo de control positivo.

B. Procedimiento de Análisis

1. Diseño del experimento

Se recomienda la inclusión de al menos un control negativo y un control positivo (proporcionados en el kit) en cada ensayo.

Asimismo, se recomienda la inclusión en cada ensayo de un control del proceso de extracción del ARN de la muestra para comprobar que durante la extracción del material genético no se ha producido contaminación.

Si las muestras se encuentran en los rangos límite de cantidad y calidad requeridas para el ensayo, se recomienda realizar con ellas la reacción independiente para detección de RNAsa P como control de presencia e integridad de ARN humano.

2. Preparación de la reacción

SARS-CoV-2 y control de inhibición

En este paso, se mezcla la muestra de ARN con la mix y se procede a la amplificación en un termociclador tiempo real. Tras la amplificación, se procede a la visualización e interpretación de los resultados.

Material requerido

| Reactivo | Abreviatura | Almacenamiento | Proveedor |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------|
| Mix Primer/Probe_RT-PCR COVID-19 | RT-PCR COVID-19 MMIX | -20 °C una vez rehidratado | Ascires® SGKit |
| Rehydration Buffer_RT-PCR COVID-19 | RT-PCR COVID-19 BUFFER | RT | Ascires® SGKit |
| Positive Control_RT-PCR COVID-19 | RT-PCR COVID-19 C+ | -20 °C una vez rehidratado | Ascires® SGKit |
| Tiras de tapas ópticas | | RT | Ascires® SGKit |

Procedimiento

1. Programar el termociclador con la tapa térmica ON, según el programa indicado en la Tabla 3. La captura de los datos de fluorescencia debe realizarse durante el paso de la extensión para Cy5 (Orf1a), FAM (Orf1b) y HEX/VIC (Control Interno). Seleccionar los canales de fluorescencia adecuados según el equipamiento para Cy5, FAM y HEX (VIC). No se requiere de referencia pasiva. En el Anexo I se muestra un listado de los canales de detección para los equipos de PCR tiempo real más comunes.

Tabla 3. Programa para amplificación y detección

| Nº ciclos | Paso | Temperatura | Tiempo |
|-----------|--|-------------|--------------|
| 1 | Transcripción reversa | 45 °C | 10 minutos |
| 1 | Activación polimerasa | 95 °C | 20 segundos |
| 40 | Desnaturalización | 95 °C | 5 segundos |
| | Hibridación/Extensión (Captura de datos) | 58 °C | 20* segundos |

* El mínimo programable puede variar en diferentes instrumentos.



No modificar las condiciones de PCR ya que la calidad de los datos puede verse afectada.

2. Realizar un breve spin de la placa RT-PCR COVID-19 MMIX.

3. Rehidratar la placa RTPCR COVID-19 MMIX con 17,5 µl por pocillo de RTPCR COVID-19 BUFFER. Se recomienda rehidratar solamente las tiras necesarias para la cantidad de muestras y controles que se vayan a utilizar. Una vez rehidratada, la placa RTPCR COVID-19 MMIX debe ser almacenada a -20 °C y protegida de la luz si no la va a emplear inmediatamente.
4. Realizar un breve vórtex y spin y rehidratar el tubo RTPCR COVID-19 C+ con 70 µl RTPCR COVID-19 BUFFER. Una vez rehidratado el tubo de RTPCR COVID-19 C+ debe ser almacenado a -20 °C.
5. Añadir los siguientes volúmenes en el pocillo correspondiente de acuerdo con la configuración de la placa:
 - a. Muestra: Añadir 2,5 ul de muestra
 - b. Control positivo: Añadir 5 ul
 - c. Control negativo: Añadir 5ul (usar como control negativo RTPCR COVID-19 BUFFER)

Tabla 4. Mezcla para amplificación por RT-PCR

| Reactivos | Volumen para 1 reacción |
|---|-------------------------|
| RTPCR COVID-19 MMIX | 15 µl |
| Muestra/ RTPCR COVID-19 C+/ RTPCR COVID-19 BUFFER | 5 µl |
| Total | 20 µl |



Es altamente recomendable incluir el correspondiente control positivo y control negativo suministrados con el kit.

6. Sellar la placa con las tiras de tapas ópticas suministradas con el kit.
7. Realizar un spin de la placa.
8. Cargar la placa en el termociclador y realizar el ensayo según las condiciones de la tabla 3.

RNAsa P

En este paso, se mezcla el ARN de la muestra con la mix y se procede a la amplificación en un termociclador tiempo real. Tras la amplificación, se procede a la visualización e interpretación de los resultados.

Material requerido

| Reactivo | Abreviatura | Almacenamiento | Proveedor |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Mix Primer/Probe_RTPCR COVID-19 | RTPCR COVID-19 CCM | -20 °C | Ascires® SGKit |
| Rehydration Buffer_RTPCR COVID-19 | RTPCR COVID-19 BUFFER | RT | Ascires® SGKit |
| Fungible para PCR tiempo real | | RT | Usuario |

Procedimiento

1. Programar el termociclador con la tapa térmica ON, según el programa indicado en la Tabla 5. La captura de los datos de fluorescencia debe realizarse durante el paso de la extensión para HEX/VIC (RNAsa P). Seleccionar los canales de fluorescencia adecuados según el equipamiento para HEX (VIC). No se requiere de referencia pasiva. En el Anexo I se muestra un listado de los canales de detección para los equipos de PCR tiempo real más comunes.

Tabla 5. Programa para amplificación y detección RNAsa P

| Nº ciclos | Paso | Temperatura | Tiempo |
|-----------|--|-------------|--------------|
| 1 | Transcripción reversa | 45 °C | 10 minutos |
| 1 | Activación polimerasa | 95 °C | 2 minutos |
| 38 | Desnaturalización | 95 °C | 10 segundos |
| | Hibridación/Extensión (Captura de datos) | 62 °C | 25* segundos |

* El mínimo programable puede variar en diferentes instrumentos.



No modificar las condiciones de PCR ya que la calidad de los datos puede verse afectada.

2. Realizar un breve vortex y spin del tubo RTPCR COVID-19 CCM.
3. Rehidratar el tubo RTPCR COVID-19 CCM con 225 µl RTPCR COVID-19 BUFFER. Una vez rehidratado el tubo de RTPCR COVID-19 CCM debe ser almacenado a -20 °C y protegido de la luz.
4. Añadir 15 µl del RTPCR COVID-19 CCM al fondo de cada pocillo de la placa.

5. Añadir los siguientes volúmenes en el pocillo correspondiente de acuerdo con la configuración de la placa:
 - a. Muestra: Añadir 2,5 µl de muestra y 2,5 de agua RNAsa free en cada tubo de reacción.
 - b. Control negativo (RTPCR COVID-19 BUFFER): Añadir 5 µl

Tabla 6. Mezcla para amplificación por RT-PCR

| Reactivos | Volumen para 1 reacción |
|--------------------------------|-------------------------|
| RTPCR-COVID-19 CCM | 15 µl |
| Muestra/ RTPCR COVID-19 BUFFER | 5 µl |
| Total | 20 µl |



Es altamente recomendable incluir el correspondiente control negativo suministrado con el kit. Se recomienda la inclusión de una muestra en la que previamente se haya confirmado la presencia de ARN humano.

6. Sellar la placa con un film o tapa óptica compatible con la placa y el termociclador.
7. Realizar un spin de la placa.
8. Cargar la placa en el termociclador y realizar el ensayo según las condiciones de la tabla 5.

3. Análisis de resultados

SARS-CoV-2 y control de inhibición

El resultado de la RT-PCR debe ser interpretado por personal con experiencia y formación en la técnica. El resultado deberá ser visualizado en el software específico del termociclador tiempo real empleado.

En el Anexo I se incluye una tabla con las equivalencias de los canales de detección en los equipos de PCR a tiempo real más comunes.

- La presencia de curva de amplificación del control interno en el canal HEX (VIC) debe confirmarse en cada muestra para asegurar la ausencia de inhibición de la reacción. Si el control interno no presenta señal positiva o tiene un Ct superior a 30, puede indicar inhibición de la reacción, por lo que se recomienda repetir el ensayo con una dilución del ARN de partida, o bien repetir la extracción y el ensayo, a no ser que muestra amplificación en otro canal.
- Un resultado de **presencia de amplificación para las 2 dianas específicas** de SARS-CoV-2 (Orf1a en Cy5, y Orf1b en FAM) se interpreta como **SARS-CoV-2 POSITIVO**. El control positivo debe presentar siempre amplificación en los dos canales.
- Un resultado de **ausencia de amplificación para las 2 dianas específicas** de SARS-CoV-2 (Orf1a en Cy5, y Orf1b en FAM) se interpreta como **SARS-CoV-2 NEGATIVO**.

Si solamente una de las dianas resulta positiva, se debe repetir el ensayo. Si se reproduce el resultado se interpreta como SARS-CoV-2 POSITIVO.

- Un resultado de **amplificación para alguna diana específica** de SARS-CoV2 (Orf1a en Cy5, y Orf1b en FAM) en el control negativo, indica una contaminación de la reacción por lo que debe repetirse el ensayo.

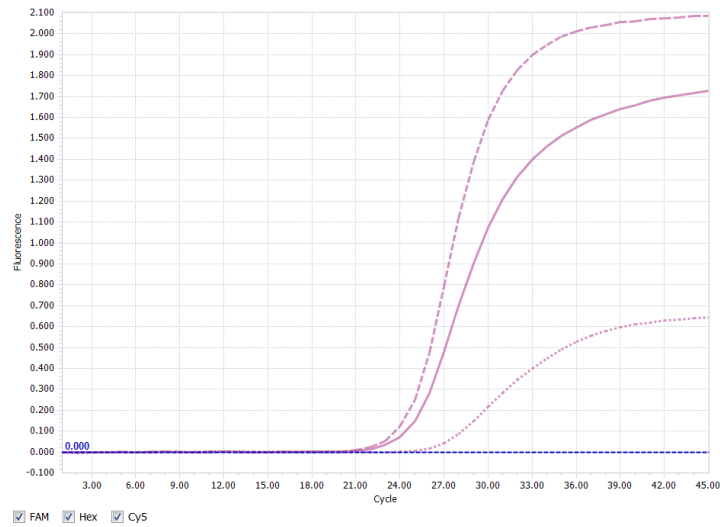


Figura 2. Curvas de amplificación obtenidas en los canales Cy5 (*Orf1a*), FAM (*Orf1b*) y control interno (HEX) de izquierda a derecha.

RNAsaP

- Un valor de Ct superior a 30 podría indicar una baja cantidad o degradación del ARN, por lo que si el resultado para SARS-CoV-2 ha sido negativo y la reacción no está inhibida se recomienda repetir la extracción y el ensayo.

C. Parámetros técnicos

Sensibilidad analítica

COVID-19 PCR FAST Lyo-H presenta un límite de detección (LoD) de 25 copias ARN/reacción para las dianas de SARS-CoV-2 en el 100% de las réplicas. Este límite de detección fue verificado independientemente en 3 termocicladores distintos: Applied Biosystem® 7500 Fast Real-Time PCR System (ABI7500 Fast), Roche LightCycler® 480 II (LC480), Roche LightCycler® 96 (LC96).

Asimismo, se ha podido detectar 5 copias/reacción en un 75% de réplicas en el termociclador LC96.

Sensibilidad clínica

Se analizó un set de muestras positivas para SARS-CoV-2 con **COVID-19 PCR FAST Lyo-H** para determinar la sensibilidad clínica. Además, se realizó una validación externa en centro nacional de referencia, como es el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

La sensibilidad del kit según los datos obtenidos internamente y la validación externa obtenida en el ISCIII es de 99,07% para muestras nasofaríngeas con extracción y purificación de ARN.

Del mismo modo se ha analizado la sensibilidad clínica con muestras de saliva procedentes de laboratorios externos (Datos disponibles en Informe de Validación), obteniendo una correlación del 100%.

Finalmente, se ha analizado la sensibilidad clínica con muestras nasofaríngeas aplicando protocolo directo enzimático y térmico, sin realizar extracción ni purificación convencional, procedentes de laboratorios externos (Datos disponibles en Informe de Validación), obteniendo una sensibilidad 97,12%.

Especificidad

Se llevó a cabo un estudio *in silico* a partir de 600 secuencias del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 de 58 localizaciones distintas, distribuidas en los 5 continentes desde enero hasta abril de 2020 (GISAID). Todos los primers y sondas utilizadas en el producto presentan una homología del 100% con las secuencias analizadas de SARS-CoV-2 y se identifican más de 2 nucleótidos diferentes al hacer un alineamiento con las secuencias

de otros coronavirus cercanos filogenéticamente a SARS-CoV-2 (SARS-CoV, MERS y otros coronavirus asociados a murciélago).

Para evaluar la especificidad clínica, se analizaron muestras negativas para SARS-CoV-2 y muestras positivas para otros virus respiratorios (Tabla 7). De la misma manera, la especificidad se evaluó por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Todas las muestras negativas para SARS-CoV-2 fueron identificadas por el sistema **COVID-19 PCR FAST Lyo-H** como negativas y en ninguna de las muestras analizadas se detectó reactividad cruzada con otros virus. Por lo tanto, se concluye que la especificidad clínica es del 100%.

Tabla 7. Coronavirus y otros virus respiratorios validados para determinar la especificidad del kit

| Virus |
|--------------------------------------|
| Adenovirus |
| Adenovirus, Bocavirus y Rhino/Entero |
| Coronavirus HKU1 |
| Coronavirus NL63 |
| Coronavirus NL63 |
| Coronavirus NL63 |
| Coronavirus OC43 |
| Influenza A |
| Influenza B |
| Metapneumovirus |
| Parainfluenza tipo 1 |
| Bocavirus |
| Rhino/Entero y Coronavirus NL63 |
| VRS-A |
| VRS-A y Coronavirus HKU1 |
| VRS-A y Coronavirus OC43 |
| VRS-B |

Reproducibilidad y repetibilidad

Los resultados de reproducibilidad muestran que para una LoD de 25 copias/reacción y con dos operadores distintos, se obtienen resultados de Ct con coeficiente de variación menor al 10% y en el 100% de las réplicas el resultado es positivo.

En el caso de la repetibilidad y considerando el LoD de 25 copias/reacción, se observa que todas las réplicas de un mismo ensayo son positivas en distintos termocicladores. Sumado a ello, se obtienen resultados de Ct muy similares entre las réplicas de un mismo operador en los distintos equipos.

D. Limitaciones del método

- Al igual que todas las pruebas diagnósticas, un diagnóstico definitivo no debe basarse en el resultado de una sola prueba, sino que debe ser realizado por el médico después de evaluar todos los hallazgos clínicos y del laboratorio. El resultado ha de ser interpretado por el médico.
- Este kit ha sido validado en los equipos Applied Biosystem® 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystem® QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 96 y Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, AriaMx (Agilent), MyGo.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje, y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Existe la posibilidad de tener falsos negativos si la muestra del paciente no se ha obtenido adecuadamente, la calidad o integridad de ARN se ven comprometidas, o si el paciente se encuentra en las fases iniciales o últimas de la infección.
- Existe la posibilidad de tener falsos positivos debido a contaminación producida por:
 - Manejo incorrecto de muestras con alta concentración de ARN viral de SARS-CoV-2.
 - Manejo incorrecto del control positivo incluido en este kit.
 - Presencia de productos de PCR de reacciones anteriores.

E. Bibliografía

1. Zhu, N., et al., A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 382(8),727-733. (2020). doi: 10.1056/NEJMoa2001017. Epub 2020 Jan 24.
2. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation Report-1. [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
3. Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5, 536–544 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
4. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
5. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus [Internet]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/SARS-CoV-2/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>
6. Huan Hana., Fang Liub., Zhihua Lva, Kailang Wub et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta* Volume 505, June 2020, Pages 172-175.
7. Iek Long Lo., Chon Fu Lio, Hou Hon Cheong, Chin Ion Lei et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA Shedding in Clinical Specimens and Clinical Characteristics of 10 Patients With COVID-19 in Macau. *Int J Biol Sci*, 16 (10), 1698-1707 2020 Mar 15 eCollection 2020.

F. Anexo I

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS TERMOCICLADORES TIEMPO REAL MÁS COMUNES

| Termociclador | Canal Ascires® SGKit COVID-19 | Canal de detección | Observaciones |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|--|
| Bio-Rad CFX96 | FAM | FAM | Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si se observa este efecto, en el menú Setting, seleccionar la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para su corrección. |
| | HEX | HEX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| | ROX | ROX | |
| Applied Biosystems ABI 7500 | FAM | FAM | Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, se recomienda modificar la línea base (baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia. |
| | HEX | VIC | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| | ROX | ROX | |
| Roche LightCycler® 480II | FAM | 465/510 | Se requiere compensación de color. |
| | HEX | 533/580 | |
| | Cy5 | 618/660 | |
| | ROX | 533/610 | |
| Roche LightCycler® 96 | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| | ROX | Texas Red | |
| Applied Biosystems QuantStudio 5 | FAM | FAM | |
| | HEX | VIC | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| | ROX | ROX | |
| AriaMx (Agilent) | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |
| | Cy5 | Cy5 | |
| | ROX | ROX | |
| MyGo | FAM | FAM | |
| | HEX | HEX | |