

Primerdesign™ Ltd

Coronavirus COVID-19 genesig Real-Time PCR Kit

CE IVD

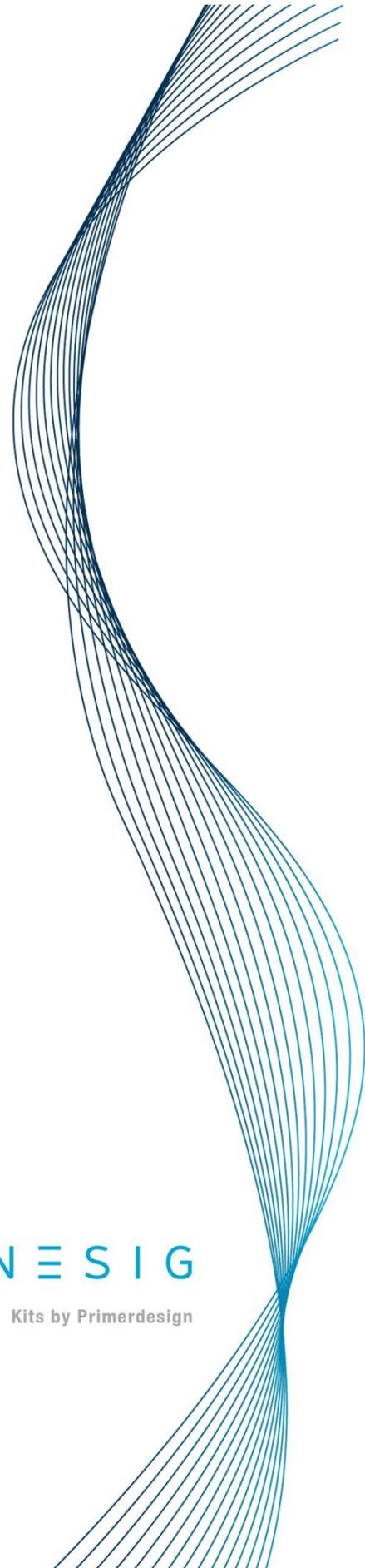
Instrucciones de USO (IDU)

Versión 5.00

22 Septiembre 2020

GENESIG

Kits by Primerdesign



genesig[®]

Coronavirus COVID-19

Real-Time PCR Kit

Test diagnóstico in vitro por PCR Real Time para
Coronavirus COVID 19

Para uso con:

Tipo de muestra	Plataforma de extracción	Plataforma de PCR
Hisopos Nasofaríngeos	Sistema de Extracción CE IVD QIAamp [®] Viral RNA Mini kit (Qiagen extraction system) exsig [®] Mag extraction kit	Applied Biosystem [®] 7500
Hisopos Orofaringeos		Bio-Rad CFX Connect [™]
Espustos		Roche [®] LightCycler 480 II
Saliva		FluoroCycler [®] XT (Bruker Hain Lifescience)
Hisopos nasofaríngeos		QuantStudio 5 (Thermofisher Scientific)

96 tests



REF Z-Path-COVID-19-CE



Contenidos

1.	Uso Previsto.....	5
2.	Resumen y explicación	5
3.	Principios del Procedimiento.....	6
4.	Materiales Proporcionados.....	7
5.	Resumen del proceso de Preparación y Prueba	8
6.	Equipo y consumibles necesarios (no incluidos).....	9
7.	Equipos de PCR- Real Time.....	9
8.	Equipos y kits de Extracción	9
9.	Instalaciones/Requisitos de formación.....	10
10.	Advertencias y Precauciones.....	10
10.1	General.....	10
10.2	Prevención de la contaminación.....	11
10.3	Prevención de contaminación por DNAsa/RNasa.....	11
10.4	Kit / sistema de extracción de muestras de ácido nucleico.....	12
11.	Condiciones de almacenamiento, manipulación y estabilidad de reactivos.....	12
11.1	Condiciones de almacenamiento.....	12
11.2	Estabilidad durante el uso.....	12
12.	Recolección de muestras, manipulación y almacenamiento.....	13
12.1	Recolección de la muestra.....	13
12.2	Transporte de muestras	13
12.3	Almacenamiento.....	13
13.	Preparación de Reactivos y controles.....	14
13.1	Preparación de Oasis™ OneStep 2x RT-qPCR Master Mix	14
13.2	Preparación de la mezcla de sonda / cebador COVID-19 e IEC.....	14
13.3	Preparación del control positivo genesig® COVID-19.....	14
13.4	Preparación del Control Interno de Extracción (IEC).....	15
13.5	Preparación del Control Negativo de Extracción (NEC).....	15
13.6	Control sin molde.....	15
14.	Preparación General.....	15
14.1	Preparación de los instrumentos.....	15

15.	Configuración del ensayo.....	16
15.1	Procedimiento de preparación de la muestra.....	16
15.2	Extracción de ARN.....	16
15.3	Configuración de Master Mix.....	17
15.4	Programación del instrumento de PCR en tiempo real.....	18
16.	Interpretación de Resultados.....	19
16.1	Criterios de aceptación de los controles incluidos en el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD).....	19
16.2	Interpretación de los resultados de las muestras de pacientes.....	19
17.	Limitaciones del procedimiento.....	20
18.	Evaluación del desempeño.....	20
18.1	Sensibilidad Analítica.....	20
18.1.1	Resultados de Sensibilidad Analítica.....	21
18.1.2	Prueba de instrumentos alternativos.....	21
18.1.3	Sistema de extracción exsig Mag.....	22
18.2	Inclusividad.....	23
18.2.1	Lo último en análisis de especificidad in silico.....	23
18.2.2	Especificidad Analítica.....	23
18.3	Precisión.....	24
18.4	Evaluación del rendimiento Clínico.....	26
18.5	Sustancias interferentes.....	26
19.	Eliminación.....	27
20.	Control de Calidad de Primerdesign Ltd.....	27
21.	Requisitos de verificación para el ensayo genesig® Real-TimePCR COVID-19 (CE IVD).....	28
21.1	Proceso de verificación del ARN del SARS-CoV-2.....	28
22.	Soporte Técnico.....	29
23.	Marcas registradas y descargos de responsabilidad.....	29
24.	Explicación de símbolos.....	30

1. Uso previsto

El kit por PCR Real Time genesig® Coronavirus COVID-19 es un ensayo de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) de diagnóstico in vitro en tiempo real con marcado CE destinado a la detección cualitativa de ácido nucleico del SARS-CoV-2 en hisopos nasofaríngeos, hisopos orofaríngeos, esputo, saliva, saliva conservada y muestras de frotis nasales. El ensayo proporciona una detección rápida de individuos sospechosos de infección por SARS-CoV-2 y ayuda en el diagnóstico de sospecha de enfermedad COVID-19 en pacientes. El ensayo está diseñado para su uso con los sistemas de extracción y las plataformas de PCR designadas que se enumeran en las Secciones 7 y 8.

El SARS-CoV-2 generalmente se detecta en muestras durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2. Los resultados positivos no descartan la coinfección con otras bacterias u otros virus. Los resultados negativos no excluyen la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para las decisiones de manejo del paciente. Los resultados positivos y negativos deben combinarse con observaciones clínicas, historial del paciente e información epidemiológica.

El kit por PCR Real Time genesig® Coronavirus COVID-19(CE IVD) está diseñado para que lo utilice personal de laboratorio clínico calificado y capacitado, específicamente instruido y capacitado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico in vitro.

Los resultados de las pruebas de muestras están disponibles para interpretar en menos de tres horas utilizando el ensayo genesig® Real Time PCR Coronavirus COVID-19 (CE IVD). Este tiempo incluye el tiempo necesario para extraer el ácido nucleico de una muestra, la configuración de la PCR, el tiempo de ejecución de la PCR y la disponibilidad de los resultados

2. Resumen y explicación

Un brote de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China se informó inicialmente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en diciembre de 2019. Las autoridades chinas identificaron un nuevo coronavirus SARS-CoV-2 (anteriormente llamado 2019-nCoV) que ha resultado en infecciones humanas confirmadas en todo el mundo y casos de enfermedad COVID-19. Los síntomas de la enfermedad COVID-19 incluyen una enfermedad respiratoria grave que ha provocado la muerte de pacientes. Los pacientes pueden infectarse con el virus SARS-CoV-2 por contacto de persona a persona (a través del contacto con un ambiente o una persona contaminados).

El ensayo genesig® Real Time PCR COVID-19 (CE IVD) es una prueba de diagnóstico molecular in vitro para la detección del ARN del SARS-CoV-2 en hisopos nasofaríngeos, hisopos orofaríngeos, esputo, saliva, saliva preservada y muestras de hisopos nasales. El ensayo se basa en una tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ampliamente utilizada. El producto contiene cebadores oligonucleotídicos y sondas de hidrólisis de doble etiqueta, así como material de control, para su uso en RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa in vitro de ARN del SARS-CoV-2.

Autorizaciones concedidas:

La versión con la marca CE, el ensayo genesig® Real Time PCR Coronavirus COVID-19 (CE IVD) (Catálogo: Z-Path-COVID-19-CE) está registrado en la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios (MHRA) y fue incluido como elegible para la adquisición de la Lista de uso de emergencia (EUL) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 7 de abril de 2020.

La versión estadounidense del ensayo genesig® Real Time PCR COVID-19 (catálogo: Z-COVID-19 (SOLO EE. UU.)) Recibió la autorización de uso de emergencia solo por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) el 17 de marzo de 2020.

3.Principios del procedimiento

El ARN se aísla y se purifica a partir de hisopos nasofaríngeos, hisopos orofaríngeos, esputo, saliva, saliva conservada o hisopos nasales utilizando un sistema de extracción de ácido nucleico CE IVD. Usando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ARN se transcribe de forma inversa a ADNc y posteriormente se amplifica usando cebadores directos e inversos. Se utiliza una sonda marcada con fluorescencia para detectar el amplicón. El sistema de sonda se basa en el sistema de sonda de hidrólisis estándar conocido como tecnología TaqMan® y las sondas están marcadas con fluoróforos reporteros y quenchers.

Durante el ciclo de la PCR, la sonda se hibrida con una secuencia objetivo específica ubicada entre los cebadores directo e inverso. La sonda es escindida por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa durante la fase de extensión del ciclo de PCR, lo que hace que el reportero se separe del quencher, generando una señal fluorescente. Con cada ciclo de PCR, se liberan moléculas del reportero adicionales de la sonda, lo que aumenta la intensidad de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se registra en cada ciclo de la PCR mediante el equipo de PCR en tiempo real.

El ensayo genesig® COVID-19 (CE IVD) incluye una mezcla de cebadores y sondas que contiene una sonda específica de SARS-CoV-2 marcada con el fluoróforo FAM. La mezcla de cebadores/sondas también incluye cebadores y sondas para amplificar y detectar el molde de ARN de control interno de extracción (control de extracción interna de ARN de genesig® (IEC)). La sonda específica IEC está etiquetada con el fluoróforo HEX.

El molde del Control Interno de Extracción se agrega al sistema de extracción de ácido nucleico (no incluido) para proporcionar un control del molde de ARN, detectar la inhibición de la PCR y confirmar la integridad de la corrida. El molde del Control Interno de Extracción genesig® no está relacionado con la secuencia viral del SARS-CoV-2.

Los cebadores oligonucleotídicos y la sonda para la detección de SARS-CoV-2 se seleccionaron de la región del genoma de orf1 ab. La mezcla de cebador / sonda suministrada está diseñada para la detección específica de ARN de SARS-CoV-2 (sonda marcada con fluoróforo FAM) y el Control Interno de Extracción suministrado (la sonda específica de IEC está etiquetada con fluoróforo HEX).

La amplificación por PCR se ha validado con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (software versión 2.3), Roche® LightCycler 480 II (software versión 1.5.1.62 SP3), Bio-Rad CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (software 1.1), FluoroCycler® XT (FC XT 101, Bruker Hain Lifescience) y QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, software v 1.4.3).

4. Materiales Proporcionados

El ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) contiene:

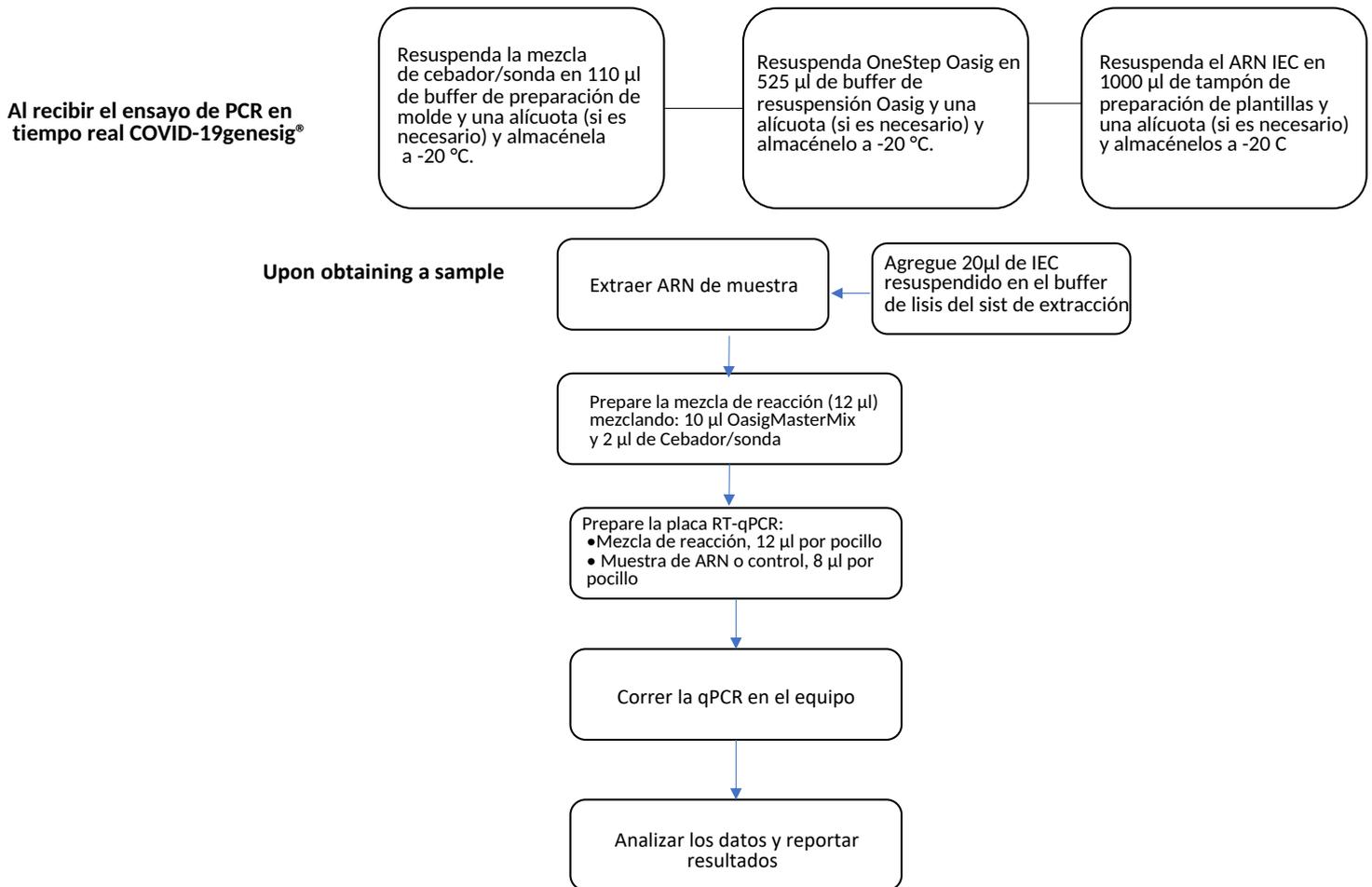
Etiqueta del reactivo	Num de viales 96 tests	Volumen (µL por vial)	Color de la tapa	Resuspendido con
Oasig™ OneStep 2X RT-qPCR Master Mix Lyophilised	2	525*	Roja	Oasig™ resuspension buffer
Mix cebador/sonda COVID-19 (incluye cebador/sonda del Control Int de Extracción)	2	110*	Ámbar	Buffer de preparación del molde
Oasig™ resuspension buffer	2	750	Azul	n/a
Buffer de preparación del molde	2	1500	Amarilla	
Agua ARNase/DNase Free	1	1500	Blanca	
genesig® COVID-19 Control Positivo	1	600*	Roja	Buffer de preparación del molde
genesig® Easy RNA Internal extraction control (IEC)	2	1000*	Azul	

*Volumen una vez resuspendido

La mezcla de cebadores y sondas COVID-19 contiene los cebadores y la sonda marcada con FAM específicos de SARS-CoV-2, e incluye los cebadores y la sonda marcada con HEX específicos para el control interno de extracción (IEC) de genesig®.

La mezcla maestra Oasig™ OneStep 2X RT-qPCR, la mezcla de cebadores y sondas COVID-19, el control positivo genesig® COVID-19 y el control interno de extracción genesig® se suministran liofilizados. La tabla anterior indica qué buffer usar, así como el volumen a agregar, para resuspender estos reactivos.

5. Resumen del proceso de preparación y prueba



6. Equipo y consumibles necesarios (no incluidos)

- Campana de PCR
- Microcentrífuga de mesa
- Mezclador Vortex
- Micropipetas ajustables (2 o 10 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Puntas de pipeta con barrera para aerosoles con filtros
- Guantes desechables
- Dilución 1:10 de hipoclorito comercial al 5,25-6,0%
- Descontaminante de ADN / ARN
- Placas de reacción qPCR compatibles con el instrumento de PCR en tiempo real que se utilizará
- Agua libre de ARNasa / DNasa
- Sellador de placa

7. Equipos de PCR Real Time

El ensayo genesis® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se ha validado con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (software version 2.3, catalogue no: 4351104)
- Roche® LightCycler 480 II (software version 1.5.1.62 SP3, catalogue no: 05015278001)
- Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Maestro™ software version 1.1, catalogue no: 1855201,1855195)
- FluoroCycler® XT (FC XT 101, Bruker Hain Lifescience)
- QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3)

Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se hayan instalado, calibrado y mantenido de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

8. Equipos y kits de Extracción

El ensayo genesis® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se ha validado usando los siguientes sistemas de extracción:

- Sistema de extracción automatizado GenoXtract® de HAIN Lifescience GmbH (Brucker) usando el kit de extracción GXT NA (No de catálogo: 12.08.02)
- Sistema de extracción Qiagen con QIAamp® Viral RNA Mini kit (Número de catálogo: 163013348, Qiagen, Alemania)
- Kit de extracción exsig® Mag de Primerdesign Ltd. (número de catálogo: Z-exsig™ Mag)

Consulte las IDU del sistema de extracción elegido para conocer todos los detalles de uso.

9. Instalaciones / Requisitos de formación

Las pruebas para detectar la presencia de ARN del SARS-CoV-2 deben realizarse en un laboratorio equipado adecuadamente por personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad relevantes:

Consulte la guía del gobierno del Reino Unido sobre el manejo y procesamiento de muestras potenciales de COVID-19 en laboratorios:

www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-guidance-for-clinical-diagnostic-laboratories/wuhan-novel-coronavirus-handling-and-processing-of-laboratory-specimens

Consulte la guía provisional de la Organización Mundial de la Salud sobre bioseguridad en el laboratorio: www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance, a partir del 13 de mayo de 2020.

Y las pautas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC):

Directrices provisionales de bioseguridad de laboratorio para el manejo y procesamiento de muestras asociadas con el SARS-CoV-2:
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html>

10. Advertencias y Precauciones

10.1 General

- Solo para uso diagnóstico in vitro (IVD).
 - Manipule todas las muestras como si fueran infecciosas utilizando procedimientos de laboratorio seguros. El procesamiento de la muestra debe realizarse de acuerdo con las regulaciones nacionales de seguridad biológica.
 - Realice todas las manipulaciones de posibles muestras de virus vivos dentro de una cabina de seguridad biológica de clase II (o superior) (consulte la guía detallada en la Sección 9).
 - Siga las precauciones necesarias al manipular las muestras. Use equipo de protección personal (EPP) de acuerdo con las pautas actuales para el manejo de muestras potencialmente infecciosas.
 - Utilice equipo de protección personal como (pero no limitado) guantes, protección ocular y batas de laboratorio cuando manipule los reactivos del kit mientras realiza este ensayo y manipula materiales, incluidas muestras, reactivos, pipetas y otros equipos y reactivos.
 - Consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) antes de utilizar este kit, que está disponible a pedido.
- El componente del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) “Buffer de preparación de molde” contiene EGTA. Este componente debe manipularse de acuerdo con la SDS. En caso de daños en el embalaje protector, póngase en contacto con Primerdesign para obtener instrucciones.

10.2 Prevención de la Contaminación

Amplification technologies such as PCR are sensitive to accidental introduction of PCR product

Las tecnologías de amplificación como la PCR son sensibles a la introducción accidental de productos de PCR de reacciones de amplificación anteriores. Pueden producirse resultados incorrectos si la muestra clínica o los reactivos utilizados en el paso de amplificación se contaminan por la introducción accidental del producto de amplificación (amplicón).

- El molde de control positivo genesig® COVID-19 se proporciona en un sobre de aluminio sellado y contiene una gran cantidad de copias de molde. Debe abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- o Mantenga áreas separadas para el manejo de la preparación de muestras, la configuración del ensayo previo a la PCR y los ácidos nucleicos amplificados después de la PCR.
- o Mantenga equipos dedicados y separados (por ejemplo, pipetas, microcentrífugas) y suministros (por ejemplo, tubos de microcentrífuga, puntas de pipetas) para la manipulación de la preparación de muestras, la configuración del ensayo previo a la PCR y los ácidos nucleicos amplificados después de la PCR.
- o Use una bata de laboratorio limpia y guantes desechables.
- o Cámbiese los guantes con regularidad y siempre que se sospeche contaminación.
- o Mantenga el reactivo y los tubos de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible.
- o Siempre verifique la fecha de vencimiento antes de usar. No utilice reactivo caducado. No sustituya ni mezcle reactivos de diferentes lotes de kits o de otros fabricantes.
- o Cambie las puntas de las pipetas con filtro entre todas las transferencias de líquido manuales.
- o Durante la preparación de muestras, el cumplimiento de buenas técnicas de laboratorio es esencial para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras y la introducción inadvertida de nucleasas en las muestras durante y después del procedimiento de extracción. Siempre se debe utilizar una buena técnica aséptica cuando se trabaja con ácidos nucleicos.
- o Cuando mezcle reactivos pipeteando hacia arriba y hacia abajo, debe hacerlo con un volumen aproximadamente igual al 50% del volumen total del componente.
- o NO utilice agua para resuspender los componentes del kit. Utilice los buffers adecuados (proporcionados con el kit) como se indica en la tabla de la Sección 4.
- o Las superficies de trabajo, pipetas y centrifugas deben limpiarse y descontaminarse con productos de limpieza (por ejemplo, lejía al 10%, etanol, removedor de ADN / ARN) para minimizar el riesgo de contaminación por ácidos nucleicos.
- Las muestras de ARN deben mantenerse en un bloque frío o en hielo durante la preparación y usarse para asegurar la estabilidad.
- Después de configurar y realizar cada corrida, limpie las superficies de trabajo y el equipo con un removedor de ADN / ARN.
- Manipule las placas de postamplificación con cuidado para asegurarse de que el sello no se rompa.
- Deseche los reactivos del kit no utilizados y las muestras humanas de acuerdo con las regulaciones nacionales (consulte la guía detallada en la Sección 9).

10.3 Prevención de contaminación por DNasa/RNasa

- Utilice pipetas y recipientes de plástico desechables sin DNasa / RNasa reservados para el trabajo de ADN / ARN para evitar la contaminación cruzada con DNasas / RNasas de equipos compartidos.
- Utilice puntas de filtro sin DNasa / RNasa durante todo el procedimiento para evitar la contaminación por aerosoles y líquidos.

10.4 Kit / sistema de extracción de muestras de ácido nucleico

Consulte las Instrucciones de uso (IFU) y la Ficha de datos de seguridad (SDS) correspondientes, disponibles del fabricante, antes de utilizar el sistema / kit de extracción elegido

11. Condiciones de almacenamiento, manipulación y estabilidad de reactivos

11.1 Condiciones de almacenamiento

El ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se envía a temperatura ambiente, pero debe almacenarse a -20 ° C al llegar.

- El ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) debe almacenarse en el embalaje original y es estable hasta 18 meses una vez almacenado a -20 ° C.
- La descongelación y congelación repetidas deben mantenerse al mínimo y no deben exceder los 5 ciclos de congelación-descongelación.
- Si el empaque protector del kit está dañado al recibirlo, comuníquese con Primerdesign para obtener instrucciones. Se debe prestar atención a la fecha de “caducidad” especificada en la etiqueta del paquete y en las etiquetas de los tubos individuales. En esta fecha, el kit debe desecharse siguiendo las instrucciones de eliminación en la Sección 19.
- Siempre verifique la fecha de vencimiento antes de usar. No utilice reactivos caducados.
- La mezcla de cebador / sonda, la mezcla maestra de enzimas, la plantilla de control positivo y el control de extracción interna de ARN se entregan liofilizados y deben resuspenderse en el tampón suministrado apropiado al volumen correcto como se detalla en la tabla de la Sección 4.
- Una vez resuspendidos, los componentes se pueden dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños, si es necesario, y son estables por hasta seis meses si se almacenan a -20 C.
- Es importante proteger la mezcla de cebador / sonda fluorogénica de la luz, ya que este reactivo es fotosensible.

11.2 Estabilidad durante el uso

El ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 debe almacenarse en el empaque original y es estable hasta por seis meses una vez resuspendido y almacenado a -20 ° C.

- El kit no debe usarse después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del paquete y en las etiquetas de los tubos individuales.
- Cuando esté en uso, los componentes del kit deben devolverse al congelador inmediatamente después de su uso para minimizar el tiempo a temperatura ambiente.
- La descongelación y congelación repetidas deben mantenerse al mínimo y no deben exceder los 5 ciclos de congelación-descongelación. Los componentes se pueden dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños después de la resuspensión, si es necesario.

12. Recolección de muestras, manipulación y almacenamiento

12.1 Recolección de la muestra

Es probable que la recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras inadecuados produzcan resultados de prueba falsos. Se recomienda encarecidamente el entrenamiento en la recolección de muestras debido a la importancia de la calidad de las muestras. Se puede hacer referencia al CLSI MM13 (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) como un recurso apropiado.

Consulte la guía del gobierno del Reino Unido sobre el manejo y procesamiento de muestras potenciales de COVID-19 en laboratorios:

<https://www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-guidance-for-clinical-diagnostic-laboratories/wuhan-novel-coronavirus-handling-and-processing-of-laboratory-specimens>

Consulte la guía provisional de la Organización Mundial de la Salud sobre bioseguridad en laboratorio a partir del 13 de mayo de 2020: Pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) en casos presuntos en humanos:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

Consulte las Pautas provisionales para la recolección, manipulación y análisis de muestras clínicas de personas bajo investigación (PUI) para la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19)

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

Siga las instrucciones del fabricante de los dispositivos de recolección de muestras para conocer los métodos de recolección adecuados.

Las muestras de hisopos deben recolectarse usando hisopos con punta sintética, como nailon o Dracon® y con un eje de aluminio o plástico. Los hisopos de alginato de calcio son inaceptables y no se recomiendan los hisopos de algodón con varillas de madera. Coloque inmediatamente los hisopos en tubos estériles que contengan 2-3 ml de medio de transporte viral.

12.2 Transporte de muestras

- Las muestras deben empaquetarse, enviarse y transportarse de acuerdo con la edición actual del Reglamento de mercancías peligrosas de la Asociación de transporte aéreo internacional (IATA). Siga las reglamentaciones de envío para la sustancia biológica ONU 3373, categoría B cuando envíe muestras potenciales de SARS-CoV-2.

12.3 Almacenamiento

- El ácido nucleico extraído debe almacenarse a -70°C o menos.
- Consulte la sección 12.1 enlaces web para obtener orientación.

13. Preparación de reactivos y controles

13.1 Preparación de Oasig™ OneStep 2x RT-qPCR Master Mix

Una vez recibida, la mezcla maestra seca se puede almacenar a -20°C hasta por 18 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.

- Usando una técnica aséptica, resuspenda en 525µl de tampón de resuspensión oasig™, agite suavemente para mezclar.
- Conservar a -20°C. La mezcla maestra resuspendida es estable hasta por seis meses cuando se almacena a -20°C.
- Los ciclos de congelación / descongelación deben minimizarse y no exceder los 5 congelaciones / descongelaciones. Una vez resuspendido, el reactivo puede dividirse en alícuotas en volúmenes más pequeños si es necesario y almacenarse a -20°C.

13.2 Preparación de la mezcla de sonda / cebador COVID-19 e IEC

Una vez recibida, la mezcla de primers / sondas secas se puede almacenar a -20°C hasta por 18 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.

- Precauciones: este reactivo solo debe manipularse en un área limpia y no expuesto a la luz.
- Utilizando una técnica aséptica, resuspenda el reactivo seco en 110 µl (por cada vial) de tampón de preparación de plantilla y agite para mezclar.
- Conservar a -20°C. La mezcla de sonda / cebador resuspendida es estable hasta por seis meses cuando se almacena a -20°C.
- Los ciclos de congelación / descongelación deben minimizarse y no exceder los 5 congelaciones / descongelaciones. Una vez resuspendido, el reactivo puede dividirse en alícuotas en volúmenes más pequeños si es necesario y almacenarse a -20°C.
- Almacene las alícuotas en la oscuridad y manténgalas alejadas de la luz solar expuesta.

13.3 Preparación del control positivo genesig® COVID-19

El control positivo de genesig® COVID-19 (PCT) se proporciona en un sobre de aluminio sellado y contiene una gran cantidad de copias del molde. Debe abrirse y procesarse lejos de las muestras clínicas y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.

El tubo PCT contiene ADN sintético que representa la región genómica de interés del SARS-CoV-2. Después de la resuspensión, esto será a una concentración de 1,7 x 10⁵ copias por µl.

Precaución: Este reactivo contiene un alto número de copias de material de control positivo y debe manipularse con precaución en un área dedicada a la manipulación de ácidos nucleicos para evitar la posible contaminación de otros reactivos del kit y muestras clínicas.

Una vez recibido, el PCT seco se puede almacenar a -20°C durante un máximo de 18 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.

Usando una técnica aséptica, resuspenda el PCT seco en 600 µl de tampón de preparación de molde mezcle suavemente. La PCT resuspendida es estable hasta seis meses cuando se almacena a -20°C. Los ciclos de congelación / descongelación deben minimizarse y no exceder los 5 congelaciones / descongelaciones. Una vez resuspendido, el reactivo puede dividirse en alícuotas en volúmenes más pequeños si es necesario y almacenarse a -20°C.

Para garantizar la validez de la serie de PCR, el PCT debe producir amplificación en el canal FAM.

13.4 Preparación del Control Interno de Extracción (IEC)

El control interno se puede agregar al sistema de extracción de ácido nucleico (no incluido) para proporcionar un control de molde de ARN, detectar la inhibición de la PCR y confirmar la integridad de la corrida de PCR.

- Precauciones: Este reactivo debe manipularse con precaución en un área dedicada a la manipulación de ácidos nucleicos para evitar una posible contaminación.
- Una vez recibido, el IEC seco se puede almacenar a -20°C durante un máximo de 18 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.
- Utilizando una técnica aséptica, resuspenda el IEC seco en 1000µl de tampón de preparación de plantilla, mezcle suavemente. El IEC resuspendido es estable hasta seis meses cuando se almacena a -20°C.
- Los ciclos de congelación / descongelación deben minimizarse y no exceder los 5 congelaciones / descongelaciones. Una vez resuspendido, el reactivo puede dividirse en alícuotas en volúmenes más pequeños si es necesario y almacenarse a -20°C.

13.5 Preparación del Control Negativo de Extracción (NEC)

Prepare al menos 1 control de extracción negativo (NEC) cada vez que se extraiga ARN de una muestra o espécimen clínico.

- El NEC es una extracción sin espécimen / muestra clínica agregada, se prepara extrayendo de agua libre de RNasa / DNasa. El IEC se agrega a la muestra de NEC durante la extracción según las instrucciones de las IFU del fabricante. Este NEC servirá como control negativo para todo el sistema de prueba y para verificar si hay contaminación durante la configuración de la placa de PCR.

13.6 Control sin molde

Se proporciona agua libre de DNasa / RNasa para usar como control sin molde (NTC) si es necesario además del NEC (consulte la Sección 13.5)

El NTC se utiliza para comprobar la contaminación durante la configuración de la placa de PCR.

14. Preparación General

14.1 Preparación de los instrumentos

Limpie y descontamine todas las superficies de trabajo, pipetas, centrifugas y otros equipos antes de su uso.

- Deben usarse agentes descontaminantes como lejía al 10%, etanol al 70% y un eliminador de ARN / ADN para minimizar el riesgo de contaminación por ácidos nucleicos.
- El rendimiento del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) depende de la cantidad y la calidad del ARN purificado de muestras humanas. Los siguientes kits y procedimientos de extracción de ARN disponibles comercialmente se han validado para la recuperación y pureza del ARN para su uso con este ensayo:
 - o Sistema de extracción automatizado GenoXtract® de HAIN Lifescience GmbH (Brucker) utilizando el kit de extracción GXT NA.
 - o Sistema de extracción Qiagen con QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Alemania)
 - o Kit de extracción exsig® Mag con Kingfisher Flex

Se deben seguir los procedimientos recomendados por el fabricante para la extracción de muestras.

15. Configuración del ensayo

15.1 Procedimiento de preparación de la muestra

Prepare al menos 1 control de extracción negativo (NEC) cada vez que se realice una extracción (es decir, una extracción sin espécimen clínico / muestra agregada). Este NEC servirá como control negativo para todo el sistema de prueba.

	Nasopharyngeal swabs, oropharyngeal swabs, nasal swabs, sputum*	Saliva****	Preserved Saliva*****
Collection	Swabs: Dacron or polyester flocked swabs in viral transport medium Sputum: Viral transport medium in sterile container	sterile container	GeneFiX™ Saliva collection device
Transport temperature**	2-8°C ≤ 72hrs	≤ -20°C	20-25°C ≤ 120hrs
Short-term storage (pre-extraction) **	2-8°C ≤ 72hrs	≤ -20°C up to 3 months	≤ -20°C up to 3 months
Long-term storage (pre-extraction) **	≤ -70°C for longer periods	≤ -80 °C	≤ -80 °C
Extraction sample volume	700µL***	700µL***	700µL***
Extraction elution volume	85µL	85µL	85µL

*Espesos deben ser del tracto respiratorio bajo

**Estas son las recomendaciones de los CDC: Directrices provisionales de bioseguridad de laboratorio de los CDC para el manejo y procesamiento de muestras asociadas con el SARS-CoV-2
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html>

***La muestra se refiere al medio de transporte viral proporcionado en el recipiente de la muestra que sirve como depósito para el hisopo.

**** Para el almacenamiento de muestras de saliva, consulte las Directrices de BSI PD CEN / TS 17305: 2019. Es posible que también se apliquen las normativas locales relativas a la manipulación de muestras

***** Para obtener información sobre el dispositivo de recolección de saliva GeneFiX™, consulte la página web del producto.

<https://isohelix.com/products/genefix-saliva-dna-collection-device/>

15.2 Extracción de ARN

Los resultados del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) dependen de la cantidad y la calidad del ARN molde purificado de muestras humanas.

Consulte las instrucciones de uso del sistema de extracción para conocer todos los detalles de uso.

- Prepare al menos 1 control de extracción negativo (NEC) cada vez que se realice una extracción (es decir, una extracción sin muestra clínica añadida).
- El control de extracción interno (IEC) genesig® debe resuspenderse en 1000 µl de tampón de preparación de plantilla.

Debe incorporarse en la extracción según las instrucciones del sistema de extracción IFU. Primerdesign recomienda que se agreguen 20 µl por muestra, directamente en la etapa de lisis de la extracción.

El control de extracción interno no debe agregarse directamente a la muestra / espécimen clínico antes de la extracción de ARN (es decir, no antes de mezclar el espécimen / muestra clínica con un tampón de lisis del sistema / kit de extracción de ácido nucleico). Hacerlo puede comprometer la prueba.

Cuando las IFU no brinden una guía específica para la adición de un control de extracción interno o cuando un sistema automatizado no admita la adición de 20µl de IEC, comuníquese con Primerdesign para obtener orientación.

15.3 Configuración de Master Mix

- a) Resuspender el tubo de sonda / cebador COVID-19 / IEC en tampón de preparación de plantilla, 110 µl de tampón por tubo, agite para mezclar.
- b) Resuspenda la mezcla maestra de oasisig™ OneStep 2X RT-qPCR en 525µl de tampón de resuspensión oasisig™, agite suavemente para mezclar.
- c) La configuración de la placa puede variar según el número de muestras. Se debe incluir un NEC en cada configuración de placa (consulte la Sección 13.5 y 15.2 sobre cómo preparar NEC). Los NTC deben incluirse en cada configuración de placa. Se debe incluir un PCT en cada configuración de placa.
 - a. El PCT se agregará después de que se hayan agregado todos los demás reactivos y muestras a la placa.
 - b. Estará en un área para manipular ácido nucleico y lejos del NEC, NTC y cualquier espécimen / muestra clínica.
 - c. Esto es para evitar la configuración de la placa, el reactivo o la contaminación de la muestra con el PCT.
- d) Determine el número de reacciones (n) para configurar por ensayo (incluidos NEC, PCT y cualquier NTC para cada placa). Es necesario hacer un exceso de mezcla de reacción para permitir el error de pipeteo. Utilice la siguiente guía para determinar el volumen de reactivos para agregar a la mezcla de reacción:
 1. Si el número de muestras (n) es ≤ 10 , entonces $N = n + 1$
 2. Si el número de muestras (n) es > 10 y ≤ 20 , entonces $N = n + 2$
 3. Si el número de muestras (n) es > 20 , entonces $N = n + 10\%$ del número total de muestras
- e) Prepare una mezcla de reacción de los siguientes reactivos a partir de componentes resuspendidos en un tubo sin DNasa / RNasa de 1,5 ml:

Reaction mix Component	1 x volume required (µl) *
Oasisig™ OneStep 2X RT-qPCR Master Mix	10*
COVID-19 and IEC Primer & Probe	2*

*Multiplica todos los números por (N). Consulte el paso (d) anterior para asegurarse de que haya suficiente mezcla de reacción para todas las muestras, NEC, PCT y NTC a analizar.

- f) Agregue 12 µl a la cantidad de pocillos necesarios para su prueba, en una placa de 96 pocillos adecuada para la plataforma de PCR que elija. Incluya 1 pocillo para el PCT, 1 pocillo para el NEC y 1 pocillo para el NTC para cada placa de PCR.
- g) Agregue 8 µl de lo siguiente en los pocillos apropiados de acuerdo con la configuración de su placa:
 - a. NEC (consulte las secciones 13.5)
 - b. NTC (consulte las secciones 13.6)
- h) Cubra toda la placa de reacción y mueva la placa de reacción al área de manipulación de ácido nucleico de la muestra

- i) Agite suavemente los tubos de muestra de ácido nucleico durante aproximadamente 5 segundos.
- j) Centrifugar durante 5 segundos para recoger el contenido en la parte inferior del tubo y luego colocar el tubo en una rejilla fría.
- k) Cámbiese los guantes con frecuencia y cuando sea necesario para evitar la contaminación.
- l) Agregue 8µl del ARN / ácido nucleico extraído de la muestra / muestras clínicas en los pocillos apropiados de acuerdo con la configuración de su placa.
- m) Cubra toda la placa de reacción y mueva la placa de reacción al área de manipulación del control de plantilla positivo.
- n) Agregue 8µl de PCT (consulte las Secciones 13.3) en el pocillo apropiado de acuerdo con la configuración de su placa. Selle la placa con un sello apropiado y colóquela en el instrumento.

15.4 Programación del instrumento de PCR en tiempo real

Consulte uno de los siguientes manuales para obtener información adicional sobre el uso del instrumento:

- Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR system Relative Standard curve and comparative CT Experiments (as per Applied Biosystems manual (2010)).
- LightCycler 480 instrument Operator's manual (July 2016, Addendum 4, Software version 1.5)
- Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System Instrument Guide (as per Bio-Rad Laboratories Inc. Manual (2017))
- FluoroCycler® XT (FC XT 101, Bruker Hain Lifescience)
- QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, QuantStudio Design & Analysis Software v 1.4.3)

a) Ingrese al siguiente programa de amplificación:

Steps	Time	Temperature	Cycles	Detection Format
Reverse Transcription	10 min	55 °C	1	COVID-19 = FAM (465-510) RNA Internal Extraction Control (IEC) = VIC / HEX / Yellow555 (533-580)
Initial Denaturation (Taq Activation)	2 min	95 °C	1	
Denaturation	10 sec.	95 °C	45	
Annealing and Extension	60 sec.	60 °C*		

*La adquisición debe realizarse al final de esta etapa.

Cuando utilice Roche® LightCycler 480 II, seleccione el siguiente formato de detección:

Sonda de hidrólisis de dos colores / Sonda UPL

Cuando utilice el ABI 7500®, seleccione "ninguno" para que el tinte lo utilice como tinte de referencia pasivo en la configuración de la placa

b) Asegúrese de que los pocillos cargados con muestras clínicas estén designados como "Tipo de muestra- Desconocido"

c) Asegúrese de que el pocillo cargado con PCT esté designado como "Tipo de muestra - Control positivo"

16. Interpretación de Resultados

16.1 Criterios de aceptación de los controles incluidos en el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD)

Antes de interpretar los resultados de la muestra, es necesario verificar el éxito de la ejecución. Si no se cumplen los siguientes criterios, es necesario repetir la prueba:

- NEC está libre de amplificación en el canal FAM (465-510) y NEC produce amplificación positiva en el canal VIC / HEX / Yellow555 (533-580) (esto es detección del control genesig® Internal Extraction).
- PCT produce un Cq de entre 14-22 en el canal FAM (465-510). Para obtener orientación específica del instrumento sobre la asignación correcta de valores de Cq, siga las instrucciones del fabricante. Inspeccione manualmente las curvas de amplificación de todas las muestras a las que se les asignó un valor de Cq para verificar la amplificación positiva.

16.2 Interpretación de los resultados de las muestras de pacientes

Si se cumplen todos los criterios de aceptación del control, entonces cada muestra se puede evaluar con la siguiente métrica:

		SARS-CoV-2 Target (FAM (465-510))	
		Cq Positive	Cq Negative
IEC (VIC / HEX / Yellow555 (533-580))	Cq Positive	SARS-CoV-2 Positive*	SARS-CoV-2 Negative**
	Cq Negative	SARS-CoV-2 Positive*	Result invalid Repeat testing of sample

*Todos los casos de amplificación de la muestra de prueba en el canal FAM indican una muestra positiva de SARS-CoV-2. Inspeccione manualmente las curvas de amplificación de todas las muestras a las que se les asignó un valor de Cq para verificar la amplificación positiva.

** Si no hay amplificación en el canal FAM para una muestra de prueba, para confirmar que el resultado FAM es válido como SARS-CoV-2 negativo, debe haber amplificación en el canal VIC / HEX.

Esto confirma que la serie de PCR es válida y que se ha detectado el genesig® Easy RNA IEC agregado a la muestra de prueba durante el proceso de extracción de ARN.

Se deben aplicar los siguientes criterios de aceptación para las muestras negativas de FAM:

- El valor IEC Cq producido por la muestra del paciente debe ser <36 y no debe exceder el valor NEC IEC Cq + 6 (es decir, muestra RNA IEC Cq es menor que NEC RNA IEC Cq + 6).

El incumplimiento de este criterio indica una extracción de muestra comprometida y un resultado no válido; debe repetirse la prueba de la muestra.

17. Limitaciones del procedimiento

Los procedimientos de este manual deben seguirse como se describe. Cualquier desviación puede provocar fallos en el ensayo o resultados erróneos.

- Se requieren buenas prácticas de laboratorio para garantizar el rendimiento del kit, con el cuidado necesario para evitar la contaminación de los componentes del kit. Se debe monitorear la contaminación de los componentes y cualquier componente que se considere contaminado debe desecharse como desechos de laboratorio estándar en una bolsa sellada o bolsa de plástico con cierre hermético.
- Al igual que con cualquier prueba molecular, las mutaciones dentro de la secuencia diana de SARS-CoV-2 podrían afectar el cebador genesig® COVID-19 y / o la unión de la sonda, resultando en una falla en la detección de la presencia del virus.
- Los resultados negativos falsos pueden deberse a:
 - o Recogida, manipulación y / o almacenamiento inadecuados de muestras.
 - o Muestra fuera de la fase virémica.
 - o No seguir los procedimientos de este manual.
 - o Uso de un kit de extracción o plataforma de PCR no autorizados.
- Los resultados falsos positivos pueden deberse a:
 - o Manejo inadecuado de muestras que contienen alta concentración de ARN viral del SARS-CoV-2 o plantilla de control positivo.
 - o Manipulación inadecuada de producto amplificado.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto del historial médico y los síntomas clínicos del paciente.
- Esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos.
- Un resultado negativo para cualquier prueba de PCR no descarta de manera concluyente la posibilidad de infección.

18. Evaluación del Desempeño

La evaluación del rendimiento del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se generó en el sistema Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR con pruebas adicionales en Roche® LightCycler 480 II y Bio-Rad CFX Connect™ Real-Time Instrumentos del sistema de detección Time PCR para sensibilidad analítica (LoD). Se ha realizado un conjunto de pruebas adicionales a nivel de LoD para los instrumentos de qPCR y los sistemas de extracción adicionales enumerados en las Secciones 7 y 8.

18.1 Sensibilidad Analítica

El límite de detección (LoD) se define como la concentración más baja de analito que podría detectarse de manera confiable al menos el 95% del tiempo.

Primero, se evaluó un LoD tentativo probando cinco niveles de artefacto (diluciones) de ARN viral completo del SARS-CoV-2 agregado en cinco muestras negativas para el SARS-CoV-2.

Una vez que se estableció el LoD tentativo, se confirmó analizando 20 muestras artificiales adicionales negativas para el SARS-CoV-2.

El nivel de LD se estableció utilizando hisopos orofaríngeos, hisopos nasofaríngeos y muestras de saliva utilizando ARN viral completo del SARS-CoV-2 suministrado por European Virus Archive-Global (EVAg) o por @Twist Bioscience.

Las muestras se extrajeron con el kit de extracción de ADN / ARN GXT en el sistema Automated GenoXtract® (Bruker HAIN Lifescience).

Los resultados de LoD se describen en las Secciones 18.1.1, 18.1.2 y 18.1.3.

18.1.1 Resultados de Sensibilidad Analítica

El LoD se confirmó analizando 20 muestras orofaríngeas negativas para SARS-CoV-2 elaboradas con ARN viral completo de SARS-CoV-2 suministrado por EVAg a un nivel de invención seleccionado. Las muestras se extrajeron con el kit GXT DNA / RNA Extraction en el sistema Automated GenoXtract® (Bruker HAIN Lifescience) y se analizaron en el Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. El LoD se confirmó aún más analizando 20 hisopos nasofaríngeos y 20 muestras de saliva elaboradas con ARN genómico completo del SARS-CoV-2 suministrado por ®Twist Bioscience; Las muestras se extrajeron con el kit de extracción GXT NA en el sistema Automated GenoXtract® (Bruker HAIN Lifescience) y se analizaron en el Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System:

Sample type	Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System					
	SARS-CoV-2 Mean Concentration (copies/µl)	Overall Mean Concentration (copies/rxn)	Positive calls/Total no. results included in analysis	% Replicate Detection	Mean Cq	Cq Standard Deviation
Oropharyngeal swab	0.33	2.65	20/20	100	36.3	0.97
Nasopharyngeal swabs	0.18	1.44	20/20	100	37.9	0.81
Saliva	0.28	2.24	20/20	100	37.1	0.73
Nasal swabs	0.18	1.44	20/20	100	38.0	0.81
*Preserved saliva	0.43	3.44	20/20	100	36.5	0.67

Estos datos demuestran que el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) detecta $\leq 0,33$ copias / µl de ARN del genoma viral completo del SARS-CoV-2 $\geq 95\%$ en todas las muestras.

Por tanto, este es el límite de detección del ensayo. Además del tipo de muestra mencionado anteriormente dentro de la sensibilidad analítica del ensayo, se ha realizado un análisis de la saliva conservada como parte del rendimiento analítico del ensayo. El límite de detección utilizando tipos de muestras de saliva preservada es $\leq 0,43$ copias / µl.

18.1.2 Prueba de instrumentos alternativos

El LoD se confirmó aún más analizando 20 muestras artificiales (hisopos orofaríngeos elaborados con ARN genómico completo de SARS-CoV-2 suministrado por EVAg) en el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX Connect™ (Bio-Rad) y LightCycler 480 II (Roche®) qPCR:

PCR Instrument	Positive calls/Total no. results included in analysis	% Calls	Mean Cq	Overall Mean Concentration (copies/µl)	Overall Mean Concentration (copies/rxn)	Cq Standard Deviation
CFX Connect™ Real-Time PCR	20/20	100	36.8	0.29	2.34	1.436
LightCycler 480 II qPCR	20/20	100	37.7	0.18	1.41	1.050

El instrumento de PCR en tiempo real FluoroCycler® XT (Bruker Hain Lifescience) se ha validado con el kit de extracción GXT NA y el sistema automatizado GenoXtract® (Bruker HAIN Lifescience) con 20 hisopos orofaríngeos negativos elaborados con ARN genómico completo del SARS-CoV-2 suministrado por EVAg:

PCR Instrument	Positive calls/Total no. results included in analysis	% Calls	Overall Mean Concentration (copies/ μ l)	Overall Mean Concentration (copies/rxn)
<i>FluoroCycler® XT Real-Time PCR</i>	19/20	95	0.36	2.88

El sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific) ha sido validado por Hammersmith Medicines Research Ltd mediante el análisis de muestras artificiales (hisopos orofaríngeos) utilizando una plantilla de ARN sintético con número de copias conocido que representa la región genómica de interés del SARS-CoV-2. Las muestras se extrajeron con el mini kit de ARN viral QIAamp®, se probaron 20 réplicas en el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5.

PCR Instrument	Positive calls/Total no. results included in analysis	% Calls	Overall Mean Concentration (copies/ μ l)	Overall Mean Concentration (copies/rxn)
<i>QuantStudio 5 Real-Time PCR</i>	19/20	95	0.147	1.18

La concentración más baja que produjo una detección de réplicas del 95% fue 0,147 copias / μ l (20/20 réplicas) con una Cq media de 37,68 (STDEV 1,15). Los resultados anteriores confirman que el LoD de 0,33 copias / μ l se mantiene en todos los instrumentos de PCR probados cuando se usa el kit de extracción de ADN / ARN GXT, el equipo de extracción GXT NA o el mini kit de ARN viral QIAamp.

18.1.3 Sistema de extracción exig Mag

El LoD para el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se confirmó aún más analizando 20 muestras artificiales (hisopos orofaríngeos elaborados con ARN genómico completo de SARS-CoV-2 suministrado por Twist Bioscience) con la extracción Kingfisher Flex sistema y el kit de extracción exig® Mag. El LoD tentativo se estableció mediante la preparación de 9 diluciones límite (niveles de artefacto) de ARN genómico completo del SARS-CoV-2 elaborado en quince muestras de hisopos orofaríngeos negativos para COVID-19.

El LoD reclamado se confirmó analizando treinta y seis muestras adicionales de hisopos orofaríngeos negativos para COVID-19 elaboradas con la dilución límite seleccionada:

CFX Connect™ Real-Time PCR					
SARS-CoV-2 Mean Concentration (copies/ μ l)	Overall Mean Concentration (copies/rxn)	Positive calls/Total no. results included in analysis	% Replicate Detection	Mean Cq	Cq Standard Deviation
0.63	5.04	35/36	98%	36.21	0.46
0.18	1.44	36/36	100%	38.13	0.94
0.07	0.56	29/36	76%	39.94	0.91
0.069	0.55	18/36	50%	40.1	1.45

En este estudio, se obtuvo el LoD de 0,18 copias / μ l y se mantuvo un nivel de confianza de > 95% cuando se utilizó el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) en combinación con Kingfisher Flex y el kit de extracción exig® Mag.

18.2 Inclusividad

18.2.1 Lo último en análisis de especificidad in silico:

Para garantizar que los cebadores y la sonda COVID-19 sigan siendo específicos para detectar los genomas del SARS-CoV-2, los bioinformáticos de Primerdesign revisan diariamente las presentaciones de la secuencia del SARS-CoV-2 en la base de datos GISAID EpiCoV. A partir del 21 de septiembre de 2020, el análisis in silico confirma que los cebadores y la sonda del ensayo COVID-19 aún muestran una detección del 100% con las 68.067 secuencias de SARS-CoV-2 de buena calidad y longitud completa publicadas en la base de datos GISAID EpiCoV.

18.2.2 Especificidad analítica

Los patógenos relacionados y los patógenos que probablemente estén presentes en la muestra clínica se han evaluado in silico para identificar la homología entre los cebadores / sonda del ensayo y los patógenos. Tras el análisis in silico, el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) no mostró reactividad cruzada con especies distintas del SARS-CoV-2, excepto por dos secuencias, coronavirus de murciélago (número de acceso NCBI MN996532.1) y secuencias de coronavirus de pangolín (número de acceso NCBI MT084071.1). La secuencia de cebadores / sonda tiene 5 desajustes y 7 desajustes respectivamente, con estos virus y, por lo tanto, muestran una posibilidad limitada de ser detectados con el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD).

Ensayos in vitro:

Para las pruebas in vitro, se obtuvieron 4 paneles:

- Panel de evaluación respiratoria (Qnostics, Escocia, Reino Unido)
- Panel QCMD del programa EQA Coronavirus 2019 (Qnostics)
- Panel de validación respiratoria (ZeptoMetrix)
- Panel de validación de neumonía (ZeptoMetrix)

Las muestras de estos paneles son representativas de verdaderas muestras clínicas humanas y se evalúan mediante el ensayo de PCR en tiempo real COVID-19 genesig® por triplicado.

Los resultados de las pruebas de reactividad cruzada in vitro se presentan a continuación:

Virus	Strain	Source	Detected/Replicates	Final result
INF A H1N1 positive	-	Isolate	0/3	Negative
INF A H3N2 positive	-	Isolate	0/3	Negative
INF B Victoria	-	Isolate	0/3	Negative
INF B Yamagata	-	isolate	0/3	Negative
RSV A	-	isolate	0/3	Negative
RSV B	-	isolate	0/3	Negative
Coronavirus	NL63	isolate	0/3	Negative
Coronavirus	229E	isolate	0/3	Negative
Coronavirus	HKU	isolate	0/3	Negative
Coronavirus	OC43	isolate	0/3	Negative
Influenza AH1	-	isolate	0/3	Negative

Virus	Strain	Source	Detected/Replicates	Final result
Influenza AH3	-	isolate	0/3	Negative
Influenza B		isolate	0/3	Negative
Metapneumovirus	-	isolate	0/3	Negative
Enterovirus	-	isolate	0/3	Negative
Adenovirus 3	-	isolate	0/3	Negative
Parainfluenza 3	-	isolate	0/3	Negative
Rhinovirus	-	isolate	0/3	Negative
<i>S. pyogenes</i>	Z018	isolate	0/3	Negative
Parainfluenza 2	-	isolate	0/3	Negative
<i>S. pneumoniae</i>	Z022	isolate	0/3	Negative
<i>S. marcescens</i>	Z053	isolate	0/3	Negative
<i>S. aureus</i>	MRSA, COL	isolate	0/3	Negative
<i>S. agalactiae</i>	Z019	isolate	0/3	Negative
<i>K. pneumoniae</i>	Z460; NDM-1	isolate	0/3	Negative
Coronavirus SARS	-	isolate	0/3	Negative
Parainfluenza	-	isolate	0/3	Negative
<i>K. pneumoniae</i>	Z138	isolate	0/3	Negative
<i>K. pneumoniae</i>	Z460	isolate	0/3	Negative
<i>P. aeruginosa</i>	Z139, VIM1	isolate	0/3	Negative
<i>P. mirabilis</i>	Z050	isolate	0/3	Negative
<i>K. aerogenes</i>	Z052	isolate	0/3	Negative
<i>H. influenzae</i>	MinnA	isolate	0/3	Negative
<i>E. coli</i>	Z297	isolate	0/3	Negative
<i>E. cloacae</i>	Z101	isolate	0/3	Negative
<i>A. baumannii</i>	307-0294	isolate	0/3	Negative

18.3 Precisión

La evaluación de la repetibilidad (intra-análisis) y reproducibilidad (entre análisis) del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 se ha realizado creando muestras de hisopos orofaríngeos negativos para SARS-CoV-2 con una plantilla de ARN sintético de número de copia conocido que representa la región genómica de interés del SARS-CoV-2 en dos niveles de artificio * (reproduciendo muestras de carga viral media y baja):

- Muestra de carga viral media: 1,06 x 10⁴ copias / ml
- Muestra de baja carga viral: 5,30 x 10³ copias / ml

*Las concentraciones de los niveles de contribución se basaron en la sensibilidad analítica del ensayo en las Secciones 18.1.1 y 18.1.2.

Las muestras se extrajeron con el kit GXT DNA / RNA Extraction en el sistema Automated GenoXtract® (Bruker HAIN Lifescience) y se analizaron en el sistema Applied Biosystems® ABI 7500 Real Time PCR.

La varianza se evaluó a partir de los operadores, los instrumentos y el día de la prueba: 2 operadores diferentes realizaron el estudio durante 3 días, con dos instrumentos Applied Biosystems® ABI 7500 Real Time PCR. Se obtuvo un total de 36 réplicas para cada nivel de dispositivo (muestra de carga viral media y baja).

La precisión se midió informando el coeficiente de varianza que estaba muy por debajo de un estándar industrial aceptado del 9% para todos los estudios:

Resumen de repetibilidad y reproducibilidad para el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 CE IVD (canales FAM y VIC)

		Coefficient of variance (%) for COVID-19 (CE-IVD) genesig® Real-Time PCR assay (FAM)			
Sample concentration (copies /ml)	Repeatability	Inter-Instrument	Inter-operator	Inter-day	
1.06 x 10 ⁴	0.77	4.94	2.75	3.98	
5.30 x 10 ³	1.55	5.22	2.83	3.99	

		Coefficient of variance (%) for COVID-19 (CE-IVD) genesig® Real-Time PCR assay (VIC)			
Sample concentration (copies /ml)	Repeatability	Inter-Instrument	Inter-operator	Inter-day	
1.06 x 10 ⁴	0.87	2.12	1.02	1.87	
5.30 x 10 ³	1.09	2.02	1.08	1.86	

18.4 Evaluación del rendimiento Clínico

La evaluación clínica del ensayo genesisig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se realizó con hisopos orofaríngeos artificiales (50 positivos y 50 negativos) en medio de transporte universal Copan. Se idearon 50 hisopos con ARN genómico viral completo del SARS-CoV-2 (EVAg, Cat: 026N-03889) y se probaron a ciegas para generar la concordancia de porcentaje positivo (PPA) y la concordancia de porcentaje negativo (NPA).

LoD se define como 0,33 copias / µl de ARN del SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 concentration	Results (Detected /Tested)	genesisig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) assay % Positive (95% CIs)
1-2x LoD	36/38	94.7% (82.72 - 98.55)
3x LoD	7/7	100% (64.57 - 100)
4-5x LoD	5/5	100% (56.56 - 100)
Negative	50/50	100% (92.87 - 100)

18.5 Sustancias interferentes

Se examinó cada sustancia interferente para determinar si tenía un efecto adverso sobre el rendimiento del ensayo.

Para cada sustancia interferente, se recolectaron 5 muestras de hisopos orofaríngeos negativos para COVID-19 con hisopos regulares en flocado y se almacenaron en 1 ml de medio de transporte viral (VTM). A continuación, se añadió el volumen apropiado de la sustancia interferente a la concentración pertinente (a continuación) en cada muestra de hisopo para obtener un volumen total de 250 µl.

Se probaron los siguientes interferentes candidatos y se encontró que no tenían un efecto significativo en el rendimiento del sistema de prueba:

Interfering Substance	Tested concentration
Blood (Haemoglobin)	0.2g/ml
Nasacort Allergy Nasal Spray (Triamcinolone acetonide)	10% v/v
Dymista Allergy Nasal Spray (Corticosteroids - Azelastine hydrochloride & Fluticasone)	6.85 mg/ml Az 2.5mg/ml Fl
Corticosteroid - Dexamethasone	1.52µmol/L
Corticosteroids - Fluticasone	0.1mg/ml
Antiviral medication - Guaifenesin	3mg/ml
Antiviral medication - Oseltamivir	0.1mg/ml
Antibacterial medication - Mupirocin	5µg/ml
Antibacterial eye drops - Tobramycin	0.03mg/ml
Throat lozenge (Strepsils - 2,4-Dichlorobenzyl Alcohol, & Amylmetacresol)	1% w/v
Mucin	0.2mg/ml
α-Amylase	7.92mg/ml

Las muestras de hisopo 5x 250µl (para cada sustancia interferente) se extrajeron utilizando el sistema

de extracción automatizado GenoXtract® y kits de extracción GXT NA, con un volumen de elución de 100µl.

Antes de la extracción, cada muestra se diseñó con ARN viral sintético SARS-CoV-2 (a 5 veces el LoD) y control de extracción interno de ARN genesig® (IEC).

Prueba de rendimiento clínico independiente

Los hisopos combinados de nariz y garganta de 57 pacientes fueron evaluados por Hampshire Hospitals NHS Foundation Trust durante febrero y principios de marzo de 2020.

El ensayo genesig® Real Time PCR COVID-19 (CE IVD) detectó todos los positivos verdaderos conocidos (4 muestras) y los negativos verdaderos (53 muestras) muestras clínicas de pacientes que confirman que el ensayo tiene una especificidad del 100% para el virus del SARS-CoV-2. El Servicio Nacional de Infecciones Inglaterra (PHE), Colindale evaluó 195 muestras, incluidas muestras clínicas de las vías respiratorias superiores o inferiores negativas.

La evaluación estadística del tamaño del panel determinó que cuando la especificidad medida para este tamaño de muestra es del 100%, la verdadera especificidad del ensayo de PCR en tiempo real COVID-19 genesig® era al menos del 98,2%.

A continuación se muestra el resumen de los resultados de precisión y rendimiento clínico independientes para el ensayo genesig® Real Time PCR COVID-19 (CE IVD):

Diagnostic test	Assessed by	Samples number	True Positive	False Positive	True Negative	False Negative	Positive % agreement	Negative % agreement
genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD)	1. National Infection Service, Public Health England, Colindale	195	0*	0	195	0	N/A	100%
	2. Hampshire Hospitals NHS Foundation Trust	57	4	0	53	0	100%	100%

** PHE evaluó el ensayo con material conocido positivo para SARS-CoV-2 y confirmó que se detectaron todas las muestras conocidas de SARS-CoV-2, incluso después de una serie de diluciones de tres pasos. Verdadero positivo y verdadero negativo según lo definido por Public Health England.*

19. Eliminación

Deseche los reactivos del kit no utilizados, las muestras humanas y las placas selladas de post-amplificación como desechos clínicos de laboratorio de acuerdo con las regulaciones locales, estatales y federales. Consulte la Sección 12 para obtener orientación sobre los vínculos web.

20. Control de Calidad de PrimerDesign Ltd

De acuerdo con el Sistema de gestión de calidad certificado por Primerdesign Ltd ISO 13485, cada lote del ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD) se prueba con especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad constante del producto.

Primerdesign Ltd realiza un análisis in silico semanal de todos los genomas publicados del SARS-CoV-2 (prueba de diagnóstico GISAID EpiCoV y bases de datos NCBI) para identificar si el virus muta en el cebador COVID-19 y en la región diana de la sonda.

21. Requisitos de verificación para el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD)

21.1 Proceso de verificación del ARN del SARS-CoV-2

- El ARN viral completo del SARS-Cov-2 purificado que se enumera a continuación es un ejemplo de material de verificación. Los laboratorios pueden utilizar otros materiales apropiados disponibles para verificar el ensayo genesig® Real-Time PCR COVID-19 (CE IVD).

- Para este proceso se usó ARN viral completo de SARS-CoV-2 suministrado por EVAg (Cat: 026N-03889). Este ARN del SARS-CoV-2 se purifica a partir de un cultivo celular de la cepa de Coronavirus "BetaCoV / Alemania / BavPat1 / 2020 p.1".

- La concentración estimada de este material es 104 copias / µl. Debe abrirse y procesarse lejos de las muestras clínicas y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.

- Los usuarios deben verificar el ARN viral completo del SARS-Cov-2 preparando una curva estándar de cuatro puntos de tres diluciones seriadas 1:10 hasta 10 copias / µl:

i) Etiquete 3 tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con la concentración de ARN del SARS-CoV-2:

- 103 copias / µl
- 102 copias / µl
- 10 copias / µl.

ii) Pipetee 90 µl de agua libre de RNasa / DNasa en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetado.

iii) Agite y centrifugue muy brevemente el ARN del SARS-CoV-2.

iv) Realice una dilución 1/10 transfiriendo 10 µl del ARN puro del SARS-CoV-2 en un tubo de 103 copias / µl. Agite en el vórtex brevemente, cambie la punta de la pipeta.

v) Realice una dilución 1/10 transfiriendo 10 µl de 103 copias / µl de tubo a 102 copias / µl. Agite en el vórtex brevemente, cambie la punta de la pipeta.

vi) Realice una dilución 1/10 transfiriendo 10 µl de tubo de 102 copias / µl a 10 copias / µl. Agitar en vórtex brevemente.

- Prepare una mezcla de reacción de acuerdo con la Sección 15.3, asegúrese de que se haya preparado suficiente mezcla de reacción para una única réplica de un control positivo, un control negativo y analice cada dilución del ARN del SARS-CoV-2 por triplicado.

- Prepare una placa de reacción de acuerdo con la Sección 15.3 y programe la plataforma de PCR elegida de acuerdo con la Sección 15.4.

- Antes de interpretar los resultados, asegúrese de que se cumplan los siguientes criterios:
 - o NTC está libre de amplificación en el canal FAM (465-510)
 - o PCT produce amplificación en el canal FAM (465-510)

- Todas las concentraciones analizadas del material de referencia de ARN del SARS-Cov-2 deben producir amplificación a través del canal FAM.

22. Soporte Técnico

Para obtener soporte técnico, comuníquese con nuestro equipo de soporte técnico dedicado en:

Teléfono: +44 (0) 800 0156494

Correo electrónico: support@primerdesign.co.uk

23. Marcas registradas y descargos de responsabilidad

Marcas registradas: exsig®, oasig™, genesig® y el logo de Primerdesign.

Todas las demás marcas comerciales que aparecen en estas IDU son propiedad de sus respectivos dueños.

24. Explicación de símbolos

Símbolo	Explicación
	Diagnóstico In vitro
	Fabricante
	Número de catálogo
	Número de tests
	Fecha de vencimiento
	Límite de temperatura
	Consultar Instrucciones electrónicas de Uso
	Código de lote
	Mantener fuera de la luz solar (mezcla sonda/cebador)
	Control Positivo

Primerdesign Ltd
York House, School Lane, Chandlers Ford, SO53 4DG

Phone: +44 (0) 800 0156 494

Email: enquires@Primerdesign.co.uk

Website: www.primerdesign.co.uk

GENESIG

Kits by Primerdesign