

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

El ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2 es una prueba *in vitro*, cualitativa, usada para la identificación del ARN de los coronavirus SARS (SARS-CoV) (examen) así como para la identificación específica del ARN del nuevo SARS-CoV-2 (confirmación) en el esputo, frotis, LBA (lavado broncoalveolar), secreto traqueal o material fecal de origen humano.

2 Campo de aplicación

Los coronavirus del SARS, tales como el SARS-CoV-2 (causa etiológica de la pandemia de COVID-19), se propagan principalmente de persona a persona, por medio de gotitas en el aire que respiramos. Los síntomas pueden variar desde fiebre, tos y dificultad para respirar, hasta neumonía y síndrome de dificultad respiratoria aguda y finalmente la muerte en las personas con comorbilidad.

El ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2 se aplica para el examen e identificación específica (confirmación) del SARS-CoV-2.

3 Principio de la prueba

El presente test es un sistema de análisis de RCP (transcriptasa inversa) (TI) en tiempo real. Utiliza iniciadores específicos y sondas marcadas para la delimitación del ARN en el ADNc, amplificación y detección del ARN de los SARS-CoV y SARS-CoV-2.

Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la muestra del paciente no contengan sustancias inhibitorias de la RCP-RT, se somete la muestra a un control interno (IC) durante el aislamiento del ácido nucleico. Este control interno se delimita, amplifica y detecta en la misma mezcla reactiva de la RCP-RT en el ADNc. De esta manera es posible excluir resultados negativos incorrectos de la prueba debido a una inhibición de la reacción de RCP-RT. El control interno se usa al mismo tiempo para la identificación de la extracción del ácido nucleico de la muestra del paciente.

Las sondas para la detección específica del agente patógeno específico de los ácidos nucleicos están marcadas con el colorante informador FAM (SARS-CoV. E-Gen) y HEX (SARS-CoV-2: ORF1a). Las sondas para la detección del control interno están marcadas con ATTO 647N. De este modo es posible la detección simultánea de todas las secuencias de interés en una mezcla de reacción. La sonda marcada con FAM detecta los coronavirus SARS. La diferenciación del SARS-CoV-2 tiene lugar en el canal HEX.

El valor Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) describe la parte de la curva en la cual la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente, sobrepasando el valor de fondo.

4 Reactivos

4.1 Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 50 (500) comprobaciones. Cada juego de reactivos contiene:

P&P MIX	150 µl (1x 1500 µl) de mezcla de Primer & Probe para SARS-CoV, SARS-CoV-2 y control interno (tapón verde)
ENZYME	600 µl (4x 1500 µl) mezcla de enzimas (tapón blanco) Contiene transcriptasa inversa y ADN polimerasa. (El componente está coloreado de azul.)
CONTROL INT	250 µl (2x 1250 µl) de control interno (tapón incoloro)
CONTROL +	170 µl (1x 1700 µl) de control positivo (tapón rojo)
CONTROL -	2x 1800 µl (8x 1800 µl) de control negativo (tapón azul)
INSTRU	1 Instrucciones de uso

4.2 Otros reactivos, materiales y aparatos necesarios

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation para LightCycler® 480 II (Roche)
- Kit comercial para aislar el ácido nucleico. Se recomienda el siguiente sistema de extracción de ácido nucleico: MagNA Pure® 24, kit de aislación total NA (Roche)
- Termociclador en tiempo real. Recomendamos utilizar el siguiente termociclador: LightCycler® 480 II (Roche) o MIC (bms)
- Placas para RCP de 96 pocillos y láminas o recipientes de reactivo (PCR-clean), en función del termociclador

- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl
- Mezclador de tipo vórtice
- Minicentrífugadora
- En caso dado, centrifugadoras de placas
- PBS para el uso de algodón montado de fibra de floculación de nylon
- Guantes protectores desechables, exentos de talco
- Bloque de refrigeración

5 Durabilidad y manipulación

- Conserve los reactivos antes y después de su uso, a una temperatura entre -25 °C y -18 °C.
- Es preciso evitar que los componentes se descongelen y vuelvan a congelar repetidas veces (no más de diez veces). Recomendamos llevar a cabo un cálculo alícuota de los componentes de la prueba después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2 °C a +8 °C).
- Se deben proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución del análisis.
- Antes de iniciar la prueba, es necesario descongelar completamente todos los reactivos, mezclarlos brevemente con el vórtice y luego centrifugarlos.
- Los envases llevan una fecha de caducidad. A partir de esta fecha, rechazaremos todo reclamo por garantía de calidad.
- El análisis debe ser llevado a cabo exclusivamente por personal profesional autorizado.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones considerables del producto o bien de la prescripción de uso, es posible que la aplicación esté fuera del propósito especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede provocar resultados incorrectos de la prueba. Añada cuidadosamente las muestras de los pacientes y los controles. Tenga cuidado de evitar que las mezclas de reactivos se depositen en otras concavidades.

6 Advertencias y medidas de seguridad

- Utilice el producto exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras de los pacientes deben manejarse como si fueran potencialmente infecciosas.
- Durante todo el análisis es necesario usar guantes desechables adecuados.
- Todos los reactivos y materiales que entran en contacto con las muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o deben eliminarse de acuerdo con las normas de higiene vigentes en el lugar de aplicación. Es necesario observar las concentraciones y los tiempos de incubación especificados por el fabricante.
- No reemplace nunca ni mezcle los reactivos con reactivos de otros lotes de kits, con otros kits de RCP de MIKROGEN ni con reactivos de otros fabricantes.
- Lea detenidamente y observe las instrucciones de uso, antes de empezar el análisis. Si no se observa el protocolo indicado en las instrucciones de uso, pueden obtenerse resultados incorrectos.

7 Obtención de muestras y preparación de los reactivos

7.1 Material y preparación de muestras

El material inicial para el ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2 es el ARN extraído del esputo, frotis, LBA, secreción traqueal o material fecal de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado de la prueba. Es necesario garantizar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología de RCP en tiempo real.

7.1.1 Preparación de muestras

Para el uso de algodón montado de fibra de floculación de nylon:

1. Incubar el algodón montado en 0,5 ml PBS durante 5 minutos a la temperatura ambiental.
2. Desechar el algodón montado y utilizar la suspensión de PBS para la extracción del ácido nucleico.

7.2 Extracción de los ácidos nucleicos

Extraiga usted los ácidos nucleicos de la muestra del paciente y del control negativo (NC). Para la extracción recomendamos un volumen inicial de 200 µl, y para la elución, un volumen de 50 µl. Las extracciones de 400 µl de material inicial eluidas en 100 µl mostraron resultados parecidos. Siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

1. Descongele el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).
Asegúrese de que el IC y el NC estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle el IC y el NC un momento con el agitador de vórtice; luego, centrifúgelos durante un tiempo breve.
2. Durante la extracción, agregue 5 µl de IC a cada muestra del paciente y al NC (en relación con 50 µl de eluido). El IC debe añadirse a la mezcla de la solución amortiguadora para lisis de las muestras y no directamente al material de muestra. (Nota: No es posible aplicar el IC a la RCP sin llevar a cabo la extracción.)
3. Extraiga las muestras del paciente y el NC. (Nota: No es posible aplicar el NC a la RCP sin llevar a cabo la extracción.)
4. El control positivo no se extrae.

Se recomienda el siguiente sistema de extracción de ácido nucleico y se ha utilizado para la evaluación del rendimiento:

Sistema de extracción	Volumen de la muestra	Volumen de elución
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl

Si desea utilizar otros métodos de extracción, comuníquese con el fabricante para aclarar la compatibilidad.

7.3 Preparación de la mezcla maestra

1. Descongele la mezcla de Primer & Probe (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteja los reactivos de la luz.
Asegúrese de que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con el agitador de vórtice y luego centrifúgelos durante un tiempo breve.
2. Prepare la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Componente	Mezcla maestra para 1 reacción
Mezcla de Primer & Probe	3 µl
Mezcla de enzimas	12 µl
Volumen total	15 µl

3. Mezcle la mezcla maestra con el agitador de vórtice y luego centrifúguela durante un tiempo breve.
4. Prepare 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de RCP.

7.4 Preparación de la reacción de RCP de RT

1. Descongele el control positivo (PC) (tapón rojo).
Asegúrese de que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con el agitador de vórtice y luego centrifúgelos durante un tiempo breve.

Componente	1 reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluido de muestra o eluido de NC o bien PC	10 µl

2. Pipetee 10 µl de eluido de la muestra en la mezcla maestra.
3. Pipetee 10 µl de control positivo (no preparado) en la mezcla maestra.
4. Pipetee 10 µl del eluido del control negativo en la mezcla maestra.

Cada ejecución debe contener un control positivo y un control negativo.

Selle la placa de RCP con un adhesivo, una película óptica o los recipientes de reacción con las tapas proporcionadas.

 **Las placas de RCP o los recipientes de reacción deben agitarse en vórtice durante 1 segundo y luego deben centrifugarse brevemente.**

8 Programación del termociclador en tiempo real

El ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2 se evaluó con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Ajuste de los canales de detección

	SARS-CoV	SARS-CoV-2	Control interno (IC)
Colorante informador	FAM	HEX	ATTO 647N
Color	Verde	Amarillo	Rojo
Emisión	510 nm	580 nm	660 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

La información en relación con las longitudes de onda de los canales de detección se refiere al LightCycler® 480 II.

Con el LightCycler® 480 II es necesario utilizar previamente una compensación de color provista por MIKROGEN.

8.2 Programa de RCP

Retrotranscripción	50°C	8 min.
Desnaturalización	95°C	3 min.
Amplificación	45 ciclos	
• Desnaturalización	95°C	10 seg.
• Hibridación/Alargamiento	60°C	45 seg.

Para informaciones básicas sobre la programación de los diferentes termocicladores en tiempo real, véase el manual de instrucciones del termociclador respectivo. Si desea información específica sobre la programación del termociclador de RCP en tiempo real, utilizando el ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2, sírvase contactar al fabricante.

9 Resultados

La evaluación de los datos tuvo lugar en el LightCycler® 480 II, con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validación

1. El control negativo debe estar por debajo del *threshold* (umbral). El control interno (IC) en el control negativo debe mostrar una curva positiva. Si el control negativo muestra una curva positiva (contaminación) o si el IC en el control negativo no es válido, no podrá evaluarse la prueba.
2. El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor de Ct del control positivo debe ser < 33. Si el control positivo se encuentra fuera de esta tolerancia, significa que hay un problema con la amplificación.
3. El control interno (IC) de muestras negativas debe mostrar una curva positiva.
Es necesario comparar la señal del IC de una muestra del paciente con la señal del IC en el control negativo extraído. Uno valor de Ct > 3 del IC de una muestra en comparación con el IC del control negativo o bien una falta de la señal del IC en la muestra pueden indicar que hay una inhibición significativa de la reacción de RCP de la RT. En estos casos, no es válido un resultado negativo de la prueba.

9.2 Evaluación

Las señales de un valor superior al *threshold* (umbral) se consideran resultados positivos. Los campos vacíos en la tabla se consideran un resultado negativo.

Color	SARS-CoV	SARS-CoV-2	Control interno (IC)
Verde	Positivo	---	---
Amarillo	---	Positivo	---
Rojo	---	---	Positivo*

Es posible que el test presente los siguientes resultados:

SARS-CoV (verde)	SARS-CoV-2 (amarillo)	IC (rojo)	Posibles interpretaciones para SARS-CoV-2
Positivo	---	Positivo*	¡Potencialmente positivo! En el material examinado se han encontrado ácidos nucleicos específicos para los coronavirus SARS; No se ha confirmado el SARS-CoV-2 ¡La muestra debe extraerse y examinarse nuevamente o bien debe requerirse una nueva muestra del paciente!
Positivo	Positivo	Positivo*	¡Positivo! En el material examinado se han encontrado ácidos nucleicos específicos para los coronavirus SARS; Se ha confirmado el SARS-CoV-2
---	Positivo	Positivo*	¡Potencialmente positivo! En el material examinado no se han encontrado ácidos nucleicos específicos para los coronavirus SARS; pero se detectaron ácidos nucleicos específicos para el SARS-CoV-2 ¡La muestra debe extraerse y examinarse nuevamente o bien debe requerirse una nueva muestra del paciente!
---	---	Positivo*	¡Negativo! En el material examinado no se han encontrado ácidos nucleicos específicos para los SARS-CoV y SARS-CoV-2
---	---	---	¡Inválido! ¡No es evaluable!

*Si los canales de detección del patógeno presentan señales positivas, no se requiere la señal del control interno para interpretar la prueba. Una carga alta de patógenos en la muestra del paciente puede conducir a una disminución o a la falta de señal para el control interno.

10 Límites del método, restricciones

- Los resultados de las pruebas siempre se deben ver en relación con el cuadro clínico. Las consecuencias terapéuticas del diagnóstico deben establecerse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo de SARS-CoV / SARS-CoV-2 no significa que se puede excluir una infección por los respectivos agentes patógenos.

11 Características de la prestación

11.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

Se determinaron la sensibilidad y la especificidad mediante pruebas definidas como positivas y pruebas definidas como negativas.

Tabla 1: Define muestras positivas del SARS-CoV-2

amplicube Coronavirus SARS-CoV-2	SARS-CoV (n = 8)	SARS-CoV-2 (n = 8)
Negativo	0	0
Positivo	8	8
Sensibilidad	100%	100%

Tabla 2: Define pruebas negativas del SARS-CoV-2

amplicube Coronavirus SARS-CoV-2	SARS-CoV (n = 74)	SARS-CoV-2 (n = 74)
Negativo	74	74
Positivo	0	0
Especificidad	100%	100%

11.2 Sensibilidad analítica

Se determinó el límite de identificación (LoD) del amplicube Coronavirus SARS-CoV-2 mediante series de diluciones de ADN gBlock de concentración conocida en un sistema LightCycler® 480 II System (Roche). Se determinó el límite de identificación del 95 % mediante un análisis de regresión Probit con el software CombiStats™ versión 5.0 (Consejo Europeo). Se confirmó el límite de identificación con 20 repeticiones en el LoD.

Tabla 3: Límite de identificación (LoD)

	SARS-CoV (examen)	SARS-CoV-2 (confirmación)
LoD	1,53	2,23
Límite de detección del 95 % Genoma/RCP	(0,82 – 4,29)	(1,34 – 5,84)

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los iniciadores y sondas del amplicube Coronavirus SARS-CoV-2 detectan específicamente los patógenos seleccionados.

Además, se determinó la especificidad mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus patógenos humanos.

Tabla 4. Bacterias y virus analizados para indicar la especificidad analítica del amplicube Coronavirus SARS-CoV-2.

Bacterias	Virus
<i>Bordetella pertussis</i>	Coronavirus MERS
<i>Bordetella parapertussis</i>	Coronavirus hCoV
<i>Campylobacter coli</i>	Enterovirus
<i>Campylobacter jejuni</i>	Influenza A
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Influenza A H1N1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Influenza A H3N2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Influenza A avian
<i>Legionella pneumoniae</i>	Influenza A H7N9
<i>Legionella longbeachae</i>	Influenza B
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Parainfluenza
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus sincicial respiratorio (VSR) A
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Rhinovirus 58 (A)
<i>Pneumococci</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Ninguna de estas muestras presentó una señal positiva. Los iniciadores y sondas utilizados en el amplicube Coronavirus SARS-CoV-2 no mostraron ninguna reacción cruzada con los agentes patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) era válido en todos los análisis.

11.4 Equivalencia de diferentes materiales de las muestras

Se determinó el coeficiente de variación (CV) del valor de Ct entre el agua y el extracto del respectivo material de la muestra después de añadir ADN de plasmidio de una concentración conocida.

Tabla 5: Equivalencia de diferentes materiales de las muestras.

	SARS-CoV	SARS-CoV-2
CV [%] (LBA, H ₂ O)	1,09	1,59
CV [%] (esputo, H ₂ O)	1,19	1,90
CV [%] (frotis, H ₂ O)	0,72	0,99
CV [%] (heces, H ₂ O)	0,78	2,19

El coeficiente de variación (CV), basado en el valor de Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) entre el agua y los extractos de ácido nucleico (obtenidos de los diferentes materiales de las muestras) fue ≤ 2,19 % en todos los genes de interés.

12 Bibliografía

- Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- F. Wu et al.: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3
- R. Ralph et al.: 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. J Infect Dev Ctries 2020; 14(1): 3–17
- W. G. Carlos et al.: Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. Am J Respir Crit Care Med 2020 Vol. 201, P7–P8
- S.-Q. Deng et H.-J. Peng): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. J. Clin. Med. 2020, 9, 575–584

Estaremos encantados de enviarle más bibliografía previo pedido.

13 Explicación de los símbolos

	El contenido es suficiente para <n> análisis Cantidad de análisis
P&P MIX	Mezcla de Primer & Probe
ENZYME	Mezcla de enzimas
CONTROL INT	Control interno
CONTROL +	Control positivo
CONTROL -	Control negativo
INSTRU	Instrucciones de uso
	Observe las instrucciones de uso
CONT	Contenido, contiene
IVD	Medio de diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	Número de lote
REF	Número de pedido
	Utilizable hasta Fecha de caducidad
	Conservación entre x °C y y °C
	Fabricante

14 Datos del fabricante y de la versión

ampliCube Coronavirus SARS-CoV-2	Nº de artículo 50143 (50144)
Instrucciones de uso válido a partir de	GAACCVS002ES 2020-04
 MIKROGEN GmbH Floriansbogen 2-4 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	



GAACCVS002