

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

SARS-CoV-2

Handbuch für folgende Medizinprodukte/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-NCO206L
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-NCO206H
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-NCO212L
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-NCO212H
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-NCO213L
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-NCO213H
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-NCO236
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-NCO272



DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Der VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit ist vorgesehen für die spezifische Identifizierung und Differenzierung des neuartigen Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) in Atemwegsproben von Patienten mit den Symptomen einer COVID-19-Infektion. Dieser Test soll die Diagnose von SARS-CoV-2 in Kombination mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren erleichtern. Dazu wird RNA aus Atemwegsproben extrahiert, durch RT-PCR amplifiziert und anschließend über Sonden mit fluoreszierendem Reporterfarbstoff, die spezifisch für SARS-CoV-2 sind, nachgewiesen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Coronaviren sind behüllte RNA-Viren mit nicht-segmentiertem positivsträngigem Genom, die zur Familie Coronaviridae gehören. Es sind sechs Coronavirus-Spezies bekannt, die beim Menschen Krankheiten verursachen. Vier Viren (229E, OC43, NL63 und HKU1) lösen Symptome grippaler Infekte aus, die anderen beiden (das SARS-assoziierte Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus, SARS-CoV) und das MERS-Coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)) sind zoonotische Viren und verursachen schwerwiegendere Komplikationen. SARS-CoV und MERS-CoV haben in den letzten beiden Jahrzehnten zu mehr als 10.000 kumulativen Fällen geführt, wobei die Mortalitätsrate bei der MERS-CoV-Infektion 34 % und bei der SARS-CoV-Infektion 10 % betrug.

Im Dezember 2019 trat bei einigen Personen, die im Großhandelsmarkt Huanan für Meeresfrüchte in Wuhan in der Provinz Hubei, China, arbeiteten oder in dessen Umgebung wohnten, eine Lungenentzündung unbekannter Ursache auf. Die Analyse der Atemwegsproben von Erkrankten durch Tiefensequenzierung wies auf ein neuartiges Coronavirus hin, das zunächst als „2019 neuartiges Coronavirus (2019-nCoV)“ und später als „SARS-CoV2“ bezeichnet wurde.

Die Übertragung des SARS-CoV-2 von Mensch zu Mensch, selbst während der symptomlosen Inkubationszeit, wurde bestätigt. Das Virus verursacht eine schwere Atemwegserkrankung ähnlich der, die das SARS-CoV auslöst. Die Lungenentzündung ist war die primäre mit dem Virus assoziierte Erkrankung, jedoch kam es bei einigen Patienten zu schwerer Pneumonie, Lungenödem, akutem Atemnotsyndrom, Multiorganversagen und zum Tod. Laut den Centers of Disease Control and Prevention (CDC) können die Symptome einer SARS-CoV-2-Infektion bereits 2 Tage oder auch erst 14 Tage nach der Exposition auftreten, wobei die häufigsten Fieber, Husten, Muskelschmerzen und Atemnot sind. Weniger häufige Symptome sind Halsschmerzen, Kopfschmerzen, Durchfall und Erbrechen. Personen über 60 Jahre, Männer und Personen mit Komorbiditäten scheinen am häufigsten von einem schweren Krankheitsverlauf betroffen zu sein.

Die Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion erfolgt zunächst durch Abklärung der üblichen Ursachen einer Lungenentzündung sowie anschließenden Nachweis mittels Sequenzierung der nächsten Generation oder Real-Time-PCR-Methoden. Derzeit sind verschiedene Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 verfügbar, darunter China CDC (Genziele: ORF1ab und N), Charité – Deutschland (Zielregionen: RdRP und E) oder US CDC (drei Zielregionen im N-Gen).



Die WHO empfiehlt zur Identifikation von SARS-CoV-2 Proben aus den oberen Atemwegen (nasopharyngeale und oropharyngeale Abstriche) und/oder Proben aus den unteren Atemwegen (Sputum, endotracheales Aspirat oder bronchoalveolare Lavage bei Patienten mit schwererer Atemwegserkrankung). Darüber hinaus können weitere klinische Proben wie Blut, Urin und Stuhl gesammelt werden, um das Vorliegen des Virus zu überwachen.

3. Verfahrensprinzip

Der VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit wurde für die Identifizierung von SARS-CoV-2 in Atemwegsproben entwickelt. Der Nachweis erfolgt im Ein-Schritt-Echtzeit-RT-Verfahren, in dem die umgekehrte Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Das isolierte RNA-Target wird durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA transkribiert, woraufhin die Amplifikation und der Nachweis einer konservierten Region des ORF1ab- und des N-Gens mithilfe spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden erfolgen.

Das VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz lässt sich auf Echtzeit-PCR-Plattformen messen.

Das VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Well bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase und Retrotranskriptase) in stabilisierter Form sowie eine interne PCR-Inhibitionskontrolle. Das ORF1ab-Gen wird im FAM-Kanal amplifiziert und nachgewiesen, das N-Gen im ROX-Kanal und die interne Kontrolle (IC) im HEX-, VIC- oder JOE-Kanal. (Der richtige Detektionskanal wird abhängig von der verwendeten Ausrüstung ausgewählt, siehe Anhang 2.)

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Im VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit sind die in Tabelle 1, 2 und 3 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten. Je nach der kommerziellen Präsentation und der verwendeten Real-Time-PCR-Plattform kann der stabilisierte PCR-Reaktionsmix in verschiedene Wells platziert und in verschiedenen Formaten angeboten werden. In Tabelle 1 sind Materialien und Reagenzien zur Verwendung mit Produkten aufgeführt, die mit 8-Well-Streifen kompatibel sind (siehe Anhang 1). In Tabelle 2 sind Materialien und Reagenzien zur Verwendung mit Produkten aufgeführt, die mit 96-Well-Platten kompatibel sind (siehe Anhang 1). In Tabelle 3 sind Materialien und Reagenzien aufgeführt, die zusammen mit Qiagen/Corbett Rotor-Gene®-Geräten für 4-Well-Streifen verwendet werden.



Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
SARS-CoV-2 8-well strips	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Weiß	6/12 x 8-Well-Streifen
Rehydration Buffer	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Blau	1 Fläschchen x 1,8 ml
SARS-CoV-2 Positive Control	Nicht-infektiöse synthetische lyophilisierte cDNA	Red	1 Fläschchen
Negative control	Kontrolle ohne Template	Violett	1 Fläschchen x 1 ml
Water RNase/DNAse free	RNAse-/DNAse-freies Wasser	Weiß	1 Fläschchen x 1 ml
Tear-off 8-cap strips	Optische Kappen zum Verschluss der Probengefäße während des Thermocycling	Transparent	6/12 x 8-Deckel-Streifen

Tabelle 1. Im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit mit Ref.-Nr. VS-NCO206L, VS-NCO206H, VS-NCO212L und VS-NCO212H enthaltene Reagenzen und Materialien.

Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
SARS-CoV-2 96-well plate	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Weiß	1 Platte
Rehydration Buffer	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Blau	1 Fläschchen x 1,8 ml
SARS-CoV-2 Positive Control	Nicht-infektiöse synthetische lyophilisierte cDNA	Red	1 Fläschchen
Negative control	Kontrolle ohne Template	Violett	1 Fläschchen x 1 ml
Water RNase/DNAse free	RNAse-/DNAse-freies Wasser	Weiß	1 Fläschchen x 1 ml
Tear-off 8-cap strips	Optische Kappen zum Verschluss der Platte während des Thermocycling	Transparent	12 x 8-Deckel-Streifen

Tabelle 2. Im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit mit Ref.-Nr. VS-NCO213L und VS-NCO213H enthaltene Reagenzen und Materialien.

Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
SARS-CoV-2 4-well strips	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Transparent	9/18 x 4-Well-Streifen
Rehydration Buffer	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Blau	1 Fläschchen x 1,8 ml
SARS-CoV-2 Positive Control	Nicht-infektiöse synthetische lyophilisierte cDNA	Red	1 Fläschchen
Negative control	Kontrolle ohne Template	Violett	1 Fläschchen x 1 ml
Water RNase/DNAse free	RNAse-/DNAse-freies Wasser	Weiß	1 Fläschchen x 1 ml
4-cap strips	Optische Kappen zum Verschluss der Probengefäße während des Thermocycling	Transparent	9/18 x 4-Deckel-Streifen

Tabelle 3. Im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit mit Ref.-Nr. VS-NCO236 und VS-NCO272 enthaltene Reagenzien und Materialien. Zur Verwendung mit Qiagen/Corbett Rotor-Gene®-Geräten und kompatiblem Zubehör mit Streifen von 4 Röhrchen zu 0,1 ml (72-Well-Rotor und Sicherungsring 72-Well-Rotor).

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

Nachfolgend sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät (Thermocycler)
- RNA-Extraktionskit
- Zentrifuge für 1,5-ml-Röhrchen und PCR-Streifen oder 96-Well-Platte (sofern vorhanden)
- Vortexmischer
- Mikropipetten (0,5–20 µl, 20–200 µl)
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Ladeblock (zur Verwendung mit Qiagen/Corbett Rotor-Gene®-Geräten).

Das VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit ist für folgende Geräte validiert: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System und VIASURE 96 Real Time PCR System. Bei Verwendung des Applied Biosystems 7500 Fast mit Röhrchenstreifen empfiehlt sich der Einsatz eines Plattenhalters, um das Risiko eingedrückter Röhrchen zu verringern (Ref.-Nr. 4388506).

Informationen zur Kompatibilität mit Thermocyclern finden Sie in Anhang 1, zu den meist verwendeten Detektionskanälen in Anhang 2 und zu den Expositionseinstellungen für die optische Messung in Anhang 3.



6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Sobald die Positivkontrolle resuspendiert wurde, diese bei -20 °C lagern. Wir empfehlen eine Aufteilung in Aliquote, um die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen zu minimieren. Es konnte validiert werden, dass die Positivkontrollen auch nach 6 Einfrier-/Auftauzyklen noch stabil sind.
- Die Komponenten vor Sonnenlicht schützen.

7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für die Verwendung durch Fachpersonal, wie Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und -techniker vorgesehen, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Einmal geöffnet, Trockenmittel nicht aus dem Reagenzbeutel entfernen.
- Schutzbeutel mit Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss verschließen (falls verfügbar, Ref.-Nr. VS-NCO213L, VS-NCO213H, VS-NCO236 und VS-NCO272). Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Beuteln und/oder Kits und/oder Chargen und/oder anderer Anbieter nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Verwenden Sie für VS-NCO236 und VS-NCO272 (kompatibel mit Qiagen/Corbett Rotor-Gene®-Geräten) den Ladeblock, um Reagenzien und Proben in die einzelnen Röhrchen zu pipettieren, das richtige Aufsetzen der Deckel zu erleichtern und Kreuzkontamination zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken oder rauchen. Nach Beendigung des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, Lagerung, Verarbeitung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Bei Bedarf die Sicherheitsdatenblätter zu Rate ziehen.



- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Referenzhandbuch des jeweiligen Real-Time-PCR-Geräts.

8. Testverfahren

8.1. RNA-Extraktion

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits aufgeführten Empfehlungen durchführen.

Für die RNA-Extraktion aus Atemwegsproben können Sie Ihr für die Routineanwendung optimiertes manuelles oder automatisches System verwenden. Alternativ können Sie jedes handelsübliche RNA-Extraktionskit entsprechend den Herstelleranweisungen einsetzen. Folgende Extraktionskits sind von uns validiert:

- Viasure RNA-DNA Extraction Kit (VIASURE), empfohlen.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, in Kombination mit dem Maxwell® 16 instrument (Promega).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAl) Kit, in Kombination mit dem COBAS® AmpliPrep (ROCHE).
- MagDEA Dx SV Kit, in Kombination mit dem magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit, in Kombination mit dem MagCore® HF16 automatischen Nukleinsäure-Extraktions-System.
- EZ1 Virus Mini Kit, in Kombination mit dem EZ1 instrument (Qiagen).
- mSample Preparation Systems RNA, in Kombination mit dem Abbott m2000 RealTime System (Abbott Molecular).

8.2. Lyophilisierte Positivkontrolle

Da die SARS-CoV-2 Positive Control eine hohe Anzahl an Template-Kopien enthält, wird empfohlen, diese in einem separaten Laborbereich von anderen Komponenten entfernt zu öffnen und zu verarbeiten. Rekonstituieren Sie die lyophilisierte SARS-CoV-2- Positive Control (rotes Fläschchen), indem Sie 100 µl RNase/DNAse-freies Wasser (weißes Fläschchen, mitgeliefert) hinzugeben und sie gründlich auf dem Vortex mischen.

Sobald die Positivkontrolle resuspendiert wurde, diese bei -20 °C lagern. Wir empfehlen eine Aufteilung in Aliquote, um die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen zu minimieren.

8.3. PCR-Protokoll

Bestimmen und separieren Sie die Anzahl der benötigten Reaktionen einschließlich Proben und Kontrollen. Jeder Durchlauf eines Tests muss jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle enthalten. Ziehen Sie die Aluminiumfolie von den Platten bzw. Streifen ab.

- 1) Rekonstituieren Sie die erforderliche Anzahl an Probengefäßen.

Geben Sie 15 µl Rehydration Buffer (blaues Fläschchen) in jedes Probengefäß.



2) Proben und Kontrollen hinzufügen.

Geben Sie 5 µl RNA-Probe und die rekonstituierte SARS-CoV-2- Positive Control (rotes Fläschchen) oder Negative Control (violettes Fläschchen) in unterschiedliche Probengefäße und verschließen Sie diese mit den mitgelieferten Kappen. Es wird empfohlen, die 8-Well-Streifen bzw. die 96-Well-Platte kurz zu zentrifugieren oder die Streifen auf eine harte Oberfläche aufzuklopfen, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden (im Fall des Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Die Platte bzw. Streifen in den Thermocycler laden.

3) Den Thermocycler einrichten (zur Überprüfung der Kompatibilität siehe Anhang 1).

Programmieren Sie dazu den Thermocycler anhand nachfolgender Einstellungen und starten Sie den Durchlauf.

Zyklen	Schritt	Dauer	Temperatur
1	Umgekehrte Transkription	15 Min.	45 °C
1	Initiale Denaturierung	2 Min.	95 °C
45	Denaturierung	10 Sek.	95 °C
	Hybridisierung/Extension (Datenerfassung*)	50 Sek.	60 °C

Tabelle 4. PCR-Protokoll

Während des Extensionsschrittes (*) werden die Fluoreszenzdaten im FAM- (ORF1ab-Gen), ROX- (N-Gen) und HEX-, JOE- oder VIC-Kanal (interne Kontrolle (IC)) erfasst. Wählen Sie je nach verwendetem Gerät den entsprechenden Detektionskanal aus (siehe Anhang 2). Vergewissern Sie sich im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System und Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System, dass die passive Referenzoption für ROX auf „None“ eingestellt ist. Wählen Sie im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System unter „Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties“ die Option „Ramp Speed Standard“ aus.

9. Ergebnisinterpretation

Verwenden Sie eine Positiv- und eine Negativkontrolle in jedem Durchlauf. Beurteilen Sie die Reaktion, indem Sie das Fehlen eines Signals im Probengefäß der Negativkontrolle sowie das Vorhandensein eines Signals im Probengefäß mit der SARS-CoV-2- Positive Control überprüfen. Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Die Probenanalyse wird durch die Software des verwendeten Echtzeit-PCR-Geräts selbst gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Anhand folgender Tabelle die Ergebnisse ablesen und analysieren:



ORF1ab-Gen (FAM)	N-Gen (ROX)	Interne Kontrolle (HEX)	Negativkontrolle	Positivkontrolle	Interpretation
+	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2-positiv
-	-	+	-	+	SARS-CoV-2-negativ
+	-	+/-	-	+	SARS-CoV-2-positiv*
-	+	+/-	-	+	Vermutlich SARS-CoV-2-positiv#
+	+	+	+	+	Versuch fehlgeschlagen
-	-	-	-	-	Versuch fehlgeschlagen

Tabelle 5. Probenauswertung

+: Amplifikationskurve

-: Keine Amplifikationskurve

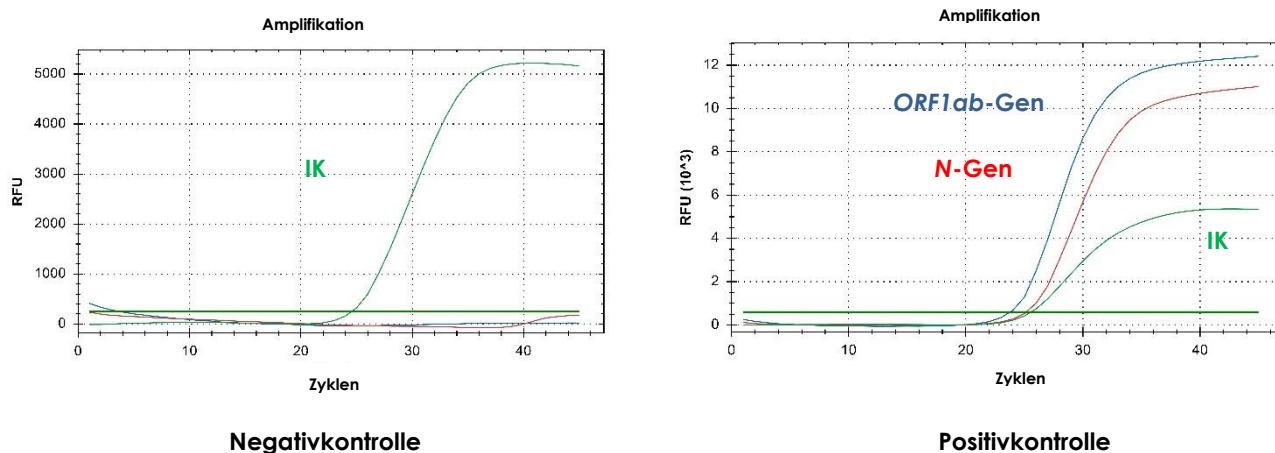
* Die Amplifikation nur eines Gens oder sogar zufällige positive Ergebnisse weisen auf a) eine geringe Menge des RNA-Templates in der Probe, die in der Nähe oder unter der Nachweissgrenze liegt, b) Mutationen in den Ziel-Nukleinsäuresequenzen, c) leicht unterschiedliche Amplifikationsausbeuten von den Zielregionen oder d) andere Faktoren hin.

Wenn nur die N-Zielsequenz positiv ist, sollte die Interpretation „Vermutlich SARS-CoV-2-positiv“ lauten und vom Referenzlabor sollten, wenn dies klinisch angezeigt ist, zusätzliche Tests durchgeführt werden, um zwischen SARS-CoV-2 und anderen Coronaviren tierischen Ursprungs zu unterscheiden, von denen bisher noch nicht bekannt ist, ob sie Menschen infizieren.

Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 38 liegt und die interne Kontrolle ein Amplifikationssignal zeigt oder nicht zeigt. Gelegentlich ist der Nachweis der internen Kontrolle nicht notwendig, da das Vorliegen einer hohen Kopienzahl der Ziel-Nukleinsäure zu deren präferenzieller Amplifikation führen kann.

Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist. Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden.

Abbildung 1. Korrekter Durchlauf der Negativ- und Positivkontrolle am Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



Das Ergebnis gilt als ungültig, wenn ein Amplifikationssignal in der Negativkontrolle vorliegt oder ein Signal im positiven Probengefäß ausbleibt. In diesem Fall wird die Wiederholung des Tests empfohlen.

Falls das Signal der internen Kontrolle in den Probengefäßen ausbleibt, empfehlen wir die Wiederholung des Tests. Verdünnen Sie hierzu die Probe im Verhältnis 1:10 oder wiederholen Sie die Extraktion, um zu prüfen, ob mögliche Inhibitionsprobleme vorliegen.

Im Fall eines weiterhin unklaren Ergebnisses wird empfohlen, die korrekte Durchführung jedes einzelnen Schrittes zu verifizieren und die Parameter sowie die sigmoide Form der Kurve zu überprüfen. Es wird außerdem empfohlen, den Test zu wiederholen, vorzugsweise in Duplikaten. Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für aus Atemwegsproben (nasopharyngeale und oropharyngeale Abstriche) extrahierte RNA validiert.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den klinischen Proben extrahiert werden.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweigrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei sich die Ergebnisse eventuell nicht wiederholen lassen.
- Es besteht die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination mit SARS-CoV-2-Sequenzen, entweder durch Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-RNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die spezifischen Primer-Sonden-Kombinationen zum Nachweis des ORF1ab- und des N-Gens, die im VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, der für den Nachweis von SARS-CoV-2 entwickelt wurde, eingesetzt werden, zeigen keine signifikanten kombinierten Homologien mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora, SARS-CoV oder anderen Coronaviren (mit Ausnahme einiger N-Gen-Sequenzen von in Fledermäusen oder Schuppentieren identifizierten Coronaviren), die zu vorhersagbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch mehrere Faktoren und deren Kombinationen ergeben, darunter:
 - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion);
 - Abbau der viralen RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-Varianten beeinträchtigen können;
 - eine Viruslast in der Probe, die unter der Nachweigrenze des Tests liegt;
 - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen. Der Einfluss von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, die zur



- Prävention von COVID-19 oder zur Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurde nicht untersucht;
- Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
 - In Proben mit niedriger Viruslast kann es zu einer N-Einzelgen-Amplifikation kommen. Es wurde berichtet, dass ein N-Gen-Assay beim Nachweis positiver klinischer Proben empfindlicher sein könnte als der ORF1ab-Gen-Assay. Im Zweifelsfall wird empfohlen, sich wegen zusätzlicher Tests an ein Referenzlabor zu wenden.
 - Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Viren vorliegen oder dass die Viren infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit viraler Zielsequenzen hin (das ORF1ab- und/oder das N-Gen).
 - Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Die optimalen Probenarten sowie der Zeitpunkt während der durch SARS-CoV-2 verursachten Infektion, zu dem virale Spitzenwerte auftreten, wurden nicht bestimmt. Zum Nachweis des Virus kann die Entnahme mehrerer Proben (unterschiedlich nach Art und Zeitpunkt) desselben Patienten erforderlich sein.
 - Wenn diagnostische Tests auf andere Atemwegserkrankungen negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.

11. Qualitätskontrolle

Das VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit enthält jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle, die jedem Durchlauf hinzugefügt werden müssen, um eine korrekte Ergebnisauswertung zu ermöglichen. Zudem dient die interne Kontrolle (IK) in jedem Probengefäß zum Nachweis der korrekten Funktionsweise des Tests.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kits wurde unter Verwendung von 100 Atemwegsproben (nasopharyngeale Abstriche) von symptomatischen Patienten mit Verdacht auf COVID-19 getestet. Diese Ergebnisse wurden verglichen mit Resultaten, die mithilfe einer molekularen Nachweismethode des nationalen Referenzzentrums Spaniens (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)) (Protokoll „2019-nCoV by real-time RT-PCR“, vorgeschlagen von der Charité (Berlin), mit Modifikationen) erhalten wurden. Die Ergebnisse waren wie folgt:



	Molekulare Referenz-Nachweismethode (von der Charité – Universitätsmedizin Berlin vorgeschlagenes Protokoll)			
		+	-	Gesamt
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	+	2	0	2
	-	0	98	98
Gesamt		2	98	100

Tabelle 6. Vergleich der Ergebnisse für SARS-CoV-2.

Die Sensitivität, die Spezifität, der positive Vorhersagewert (PPV) und der negative Vorhersagewert (NPV) des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit betrugen bei Vergleich mit dem Charité-Protokoll > 99,9 %.

Darüber hinaus wurde die klinische Leistung des SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit unter Verwendung von 80 anonymisierten Atemwegsproben der Biobank des National Center for Microbiology (NCM) (Spain) überprüft. Diese Ergebnisse wurden verglichen mit Resultaten, die mithilfe einer molekularen Nachweismethode des nationalen Referenzzentrums Spaniens (ISCIII) (Protokoll „2019-nCoV by real-time RT-PCR“, vorgeschlagen von der Charité (Berlin), mit Modifikationen) erhalten wurden (Corman et al., 2020). Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Molekulare Referenz-Nachweismethode (von der Charité – Universitätsmedizin Berlin vorgeschlagenes Protokoll)			
		+	-	Gesamt
VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	+	41	1*	42
	-	0	38	38
Gesamt		41	39	80

Tabelle 7. Vergleich der Ergebnisse für SARS-CoV-2. *Eine Probe zeigte nur für das N-Gen ein positives Ergebnis.

Die Sensitivität und Spezifität des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit betrugen im Vergleich zum Charité-Protokoll 97,5 % bzw. > 99,9 %.

Beide Ergebnisse zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von SARS-CoV-2 mithilfe des VIASURE SARS-CoV-2 Gen Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenze des VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kits liegt bei ≥ 10 RNA-Kopien je Reaktion für das ORF1ab- und das N-Gen (Abbildungen 2 und 3).



Abbildung 2. Verdünnungsreihe des ORF1ab-Gens (10^7 - 10^1 Kopien/Reaktion), getestet auf dem Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (FAM-Kanal).

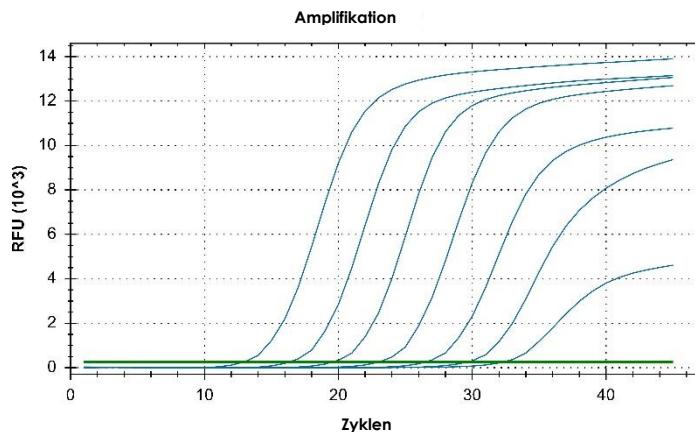
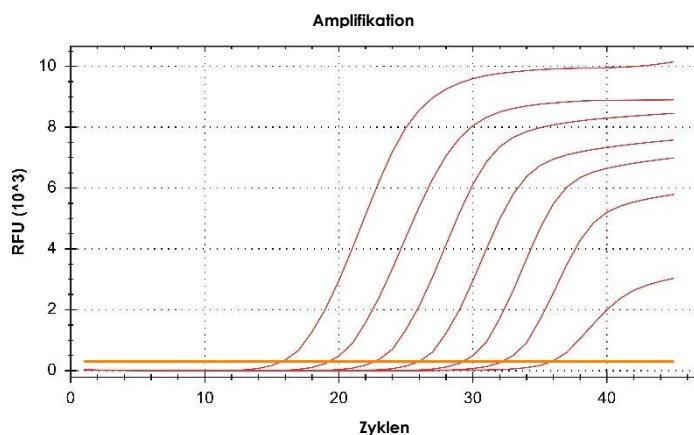


Abbildung 3. Verdünnungsreihe des N-Gens (10^7 - 10^1 Kopien/Reaktion), getestet auf dem Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (ROX-Kanal).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des SARS-CoV-2-Assays wurde durch Testen eines Panels mit verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen, bestätigt. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen wurde Kreuzreakтивität festgestellt.



Test auf Kreuzreaktionen					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-Virus	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , nicht rifampinresistent	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-Virus	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-Virus	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Influenza B/Florida/04/06-Virus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013-Virus	-
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotyp A und C	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus	-	Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)-Virus	-	Humanes Bocavirus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-Virus	-	Humanes Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09-Virus	-	MERS-Coronavirus	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)-Virus	-	SARS-Coronavirus Stamm Frankfurt 1	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-Virus	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-Virus	-	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-Virus	-	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV) A und B	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)-Virus	-	Humanes Rhinovirus Typ C	-

Tabelle 8. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen

12.4. Analytische Reaktivität

Beim Test der Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2 Gen Real Time PCR Detection Kit unter Verwendung von RNA des humanen 2019-nCoV-Stammes BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 wurde ein positives Ergebnis erhalten.



ANHANG 1

KOMPATIBILITÄT MIT DEN GÄNGISTEN ECHTZEIT-PCR-GERÄTEN

Niedrigprofil-Streifen können in sämtlichen PCR-Thermocyclern, die mit einem Block mit niedrigem Profil ausgestattet sind, wie beispielsweise das System in Tabelle A.1, verwendet werden. Hochprofil-Streifen können in sämtlichen PCR-Thermocyclern, die mit einem Block mit hohem oder normalen Profil ausgestattet sind, wie beispielsweise das System in Tabelle A.2, verwendet werden. Wenn Ihr Thermocycler nicht in der Liste aufgeführt ist, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Anbieter in Verbindung.

Tabelle A.1 THERMOCYCLER MIT NIEDRIGPROFIL-BLOCK	
Hersteller	Modell
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabelle A2 THERMOCYCLER MIT HOCHPROFIL-BLOCK	
Hersteller	Modell
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene/Agilent Technologies	7300 Real-Time PCR System
Stratagene/Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

Tabelle A1/A2. Kompatible Echtzeit-PCR-Systeme mit niedrigem und hohem Profil.



ANHANG 2

DETEKTSKANÄLE FÜR DIE GÄNGISTEN ECHTZEIT-PCR-GERÄTE

Die Fluoreszenz-Detektionskanäle für einige der gängigsten Echtzeit-PCR-Thermocycler sind in Tabelle A3 aufgeführt.

THERMOCYCLER FÜR ECHTZEIT- PCR	VIASURE- KANAL	DETEKTSKANÄL	HINWEISE
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Einige Wells können während der anfänglichen Zyklen eines Laufs anormal driftende RFU-Werte mit einer nicht-sigmoiden ansteigenden Kurve aufweisen. Wenn Sie diesen Effekt beobachten, wählen Sie zur Korrektur im Menü Einstellungen die Option „Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings“.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Der passive Referenzfarbstoff ROX muss auf „None“ gesetzt werden. Einige Wells können während der anfänglichen Zyklen eines Laufs anormal driftende RFU-Werte mit einer nicht-sigmoiden ansteigenden Kurve aufweisen. Wenn Sie diesen Effekt beobachten, modifizieren Sie die Basislinie: Wählen Sie den Wert für den Startzyklus und den Endzyklus so, dass die Basislinie endet, bevor deutliche Fluoreszenz gemessen wird.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Farbkompensation erforderlich
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Der passive Referenzfarbstoff ROX muss auf „None“ gesetzt werden.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Klicken Sie unter „Channel Setup“ auf die Schaltfläche „Gain Optimisation“ und gehen Sie anschließend zu „Optimise Acquiring“. Die „Target Sample Range“ für die Fluoreszenz muss zwischen 5 und 10 FI für jeden Kanal liegen. Wählen Sie zudem die Option „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ aus.
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cyler bms	FAM	Green	Geben Sie im Menü „Run Profile“ die korrekten Parameter für „Temperature Control“ (Standard TAQ (v3)), Volumen (20 µl) und das passende Temperaturprofil ein. Wählen Sie im Fenster „Cycling“ die Option „Acquire on“ für alle Kanäle, indem Sie diese anwählen. Verwenden Sie die für alle Kanäle die Standardwerte für „Gain“ (Grün = 3, Gelb = 10, Orange = 10, Rot = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabelle A3: Fluoreszenz-Detektionskanäle verschiedener Echtzeit-PCR-Systeme



ANHANG 3

EXPOSITIONSEINSTELLUNGEN ZUR OPTISCHEN MESSUNG

Für den Einsatz mit den „VIASURE Real Time PCR Detection Kits“ müssen die optischen Messparameter einiger Thermocycler entsprechend angepasst werden. Dieser Assay wurde mit den folgenden eingestellten Expositionswerten validiert:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) und VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM-Kanal – 500*, HEX-Kanal – 1000, ROX-Kanal – 1000 und Cy5-Kanal – 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) und VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM-Kanal – 500, HEX-Kanal – 500, ROX-Kanal – 500 und Cy5-Kanal – 500.

*Wenn das Ergebnis im FAM-Kanal nicht den Erwartungen entspricht, keine Amplifikation erfolgt oder hoher Hintergrund beobachtet wird, reduzieren Sie die Expositionswerte wie oben angegeben auf 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica del 2019 Nuevo Coronavirus (SARS-CoV-2) en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de COVID-19. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por SARS-CoV-2 en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de los especímenes respiratorios, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar SARS-CoV-2.

2. Introducción y explicación

Los coronavirus son virus envueltos de RNA de cadena positiva no segmentados que pertenecen a la familia Coronaviridae. Se conocen seis especies de coronavirus que causan enfermedades humanas: cuatro virus (229E, OC43, NL63 y HKU1) que causan síntomas de resfriado común, y otros dos (coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo grave- severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV-, y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio - Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV-) que son zoonóticos y producen complicaciones más severas. SARS-CoV y MERS-CoV han causado más de 10.000 casos acumulados en las últimas dos décadas, con unas tasas de mortalidad del 34% para MERS-CoV y 10% para SARS-CoV.

En diciembre de 2019, algunas personas que trabajaban o vivían alrededor del mercado de mariscos de Huanan en Wuhan, provincia de Hubei, China, presentaron neumonía de causa desconocida. El análisis de secuenciación masiva de las muestras respiratorias mostró un nuevo coronavirus, que fue llamado inicialmente como 2019 nuevo coronavirus (2019-nCoV) y posteriormente como SARS-CoV-2.

Se ha confirmado la transmisión de persona a persona del SARS-CoV-2, incluso en el período de incubación en asintomáticos, y el virus causa enfermedad respiratoria severa como la producida por el SARS-CoV. Aunque la neumonía es la principal enfermedad asociada, algunos pacientes han desarrollado neumonía severa, edema pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda o fallo multiorgánico y muerte. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) cree que los síntomas del SARS-CoV-2 pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 tras la exposición, siendo los más comunes fiebre, tos, mialgia y disnea. Aquellos síntomas menos comunes son dolor de garganta, dolor de cabeza, diarrea y vómitos. Parece que personas mayores de 60 años, hombres y personas con comorbilidades tienen una enfermedad grave con mayor frecuencia.

El diagnóstico del SARS-CoV-2 se realiza detectando las causas convencionales de la neumonía temprana y por secuenciación masiva o métodos de RT-PCR a tiempo real. Actualmente se encuentran disponibles varios ensayos que detectan el SARS-CoV-2, como China CDC (genes objetivos, ORF1ab and N), Charité – Alemania (genes objetivos, RdRP y E) o Estados Unidos CDC (tres objetivos en el gen N).



WHO recomienda muestras de las vías respiratorias superiores (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos) y/o muestras del tracto respiratorio inferior (esputos, aspirados endotraqueales o lavados broncoalveolares en pacientes con enfermedad respiratoria aguda) para la identificación del SARS-CoV-2. Además, se pueden recolectar otras muestras clínicas como sangre, orina y heces para controlar la presencia del virus.

3. Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias. La detección se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de SARS-CoV-2 se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes *ORF1ab* y *N*.

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, el gen *ORF1ab* se detecta en el canal FAM, el gen *N* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-NCO206L, VS-NCO206H, VS-NCO212L y VS-NCO212H.

Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-NCO213L y VS-NCO213H.

Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-NCO236 y VS-NCO272. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.



- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-NCO213L, VS-NCO213H, VS-NCO236 y VS-NCO272). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-NCO236 y VS-NCO272 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de RNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de RNA a partir de muestras respiratorias puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Vasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.



- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado COBAS® AmpliPrep (ROCHE).
- MagDEA Dx SV kit, empleando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit, empleando el instrumento MagCore® HF16 automated Nucleic Acid Extractor System.
- EZ1 Virus Mini Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado EZ1 instrument (Qiagen).
- mSample Preparation Systems RNA, utilizando el sistema de extracción automatizado Abbott m2000 RealTime System (Abbott Molecular).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de SARS-CoV-2 Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir SARS-CoV-2 Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de SARS-CoV-2 Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:



Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (gen ORF1ab), ROX (gen N) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termocicador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo para el SARS-CoV-2. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Gen ORF1ab (FAM)	Gen N (ROX)	Control interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo
-	-	+	-	+	SARS-CoV-2 Negativo
+	-	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo*
-	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Presuntamente Positivo**#
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

* La amplificación de un solo gen o incluso resultados positivos aleatorios sugieren a) la baja cantidad de RNA molde presente en la muestra está cerca o por debajo del límite de detección de las reacciones b) mutaciones en las secuencias de ácido nucleico de las regiones diana c) rendimiento de la amplificación de las regiones diana ligeramente diferente, o d) otros factores.

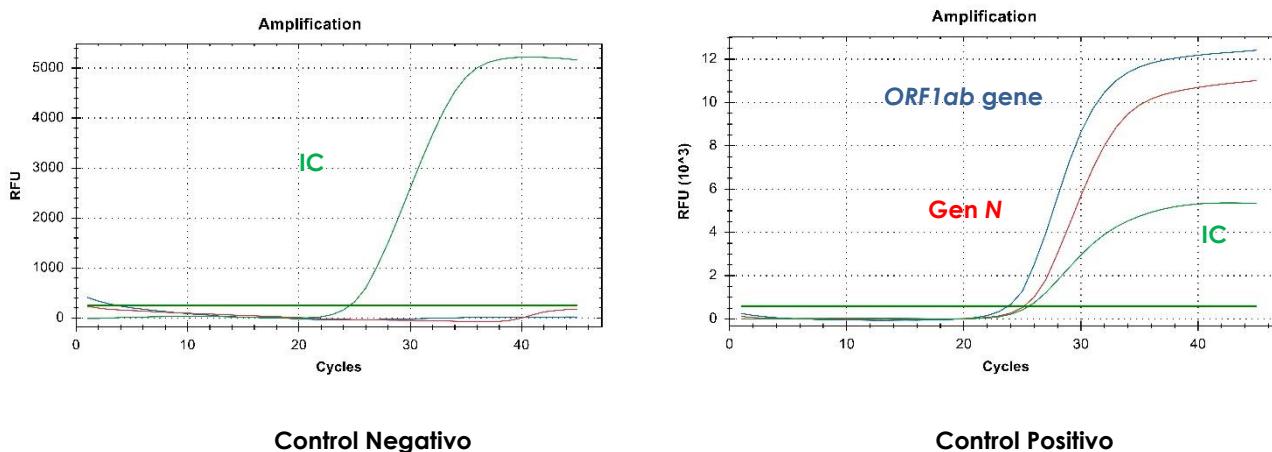
Si únicamente el gen diana N resulta positivo, la interpretación debería ser SARS-CoV-2 Presuntamente Positivo y el laboratorio de referencia debería realizar pruebas confirmatorias adicionales si está clínicamente indicado, para diferenciar entre SARS-CoV-2 y otros coronavirus de animales que actualmente se desconoce que puedan infectar a los seres humanos.



Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 38 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo y orofaríngeo).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.



- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con el SARS-CoV-2 ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de los genes ORF1ab y N empleadas en el test VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit diseñado para la detección de SARS-CoV-2, no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana, SARS-CoV u otros coronavirus (con la excepción de algunas secuencias del gen N de coronavirus identificados en murciélagos y pangolín), que pudiera originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de RNA).
 - Degradación del RNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de SARS-CoV-2.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir COVID-19 o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Las muestras con baja carga viral pueden dar a la amplificación únicamente de un sólo gen, el gen N. Se ha descrito que el ensayo del gen N podría ser más sensible que el del gen ORF1ab en la detección de muestras clínicas positivas. En caso de duda, se recomienda consultar un laboratorio de referencia para realizar más pruebas.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias virales diana (genes ORF1ab y/o N).
- Resultados negativos no excluyen padecer la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por el SARS-CoV-2. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el virus.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por SARS-CoV-2, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.

11. Control de calidad

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 100 muestras respiratorias (frotis nasofaríngeos) de pacientes sintomáticos con sospecha de COVID-19 utilizando VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular empleado en el centro nacional de referencia (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)) (el protocolo “2019-nCoV by real-time RT-PCR” sugerido por Charité (Berlin), con modificaciones). Los resultados fueron los siguientes:

	Método de detección molecular de Referencia (Protocolo sugerido por Charité Universitätsmedizin Berlin)			
		+	-	Total
+ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	2	0	2	
-	0	98	98	
Total	2	98	100	

Tabla 6. Comparativa de resultados para SARS-CoV-2.

Los valores de sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) para VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR detection kit en comparación con el protocolo Charité son >99.9%.

Además, se realizó otra evaluación clínica del test VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit con 80 muestras respiratorias anonimizadas del biobanco del Centro Nacional de Microbiología (CNM) (España). Los resultados se compararon con los obtenidos con el método de detección molecular establecido en el Centro Nacional de Referencia de España (ISCIII), (el protocolo “2019-nCoV by real-time RT-PCR” sugerido por Charité (Berlin), con modificaciones) (Corman et al., 2020). Los resultados fueron los siguientes:

	Método de detección molecular de Referencia (Protocolo sugerido por Charité Universitätsmedizin Berlin)			
		+	-	Total
+ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	41	1*	41	
-	0	38	39	
Total	41	39	80	

Tabla 7. Comparativa de resultados para SARS-CoV-2. *Una muestra resultó positiva solo para el gen N.

Los valores de sensibilidad y especificidad, para VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit en comparación con el protocolo Charité son 97.5% y >99.9%, respectivamente.

Ambos resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar SARS-CoV-2 utilizando VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit.



12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción para los genes ORF1ab y N (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar del gen ORF1ab (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

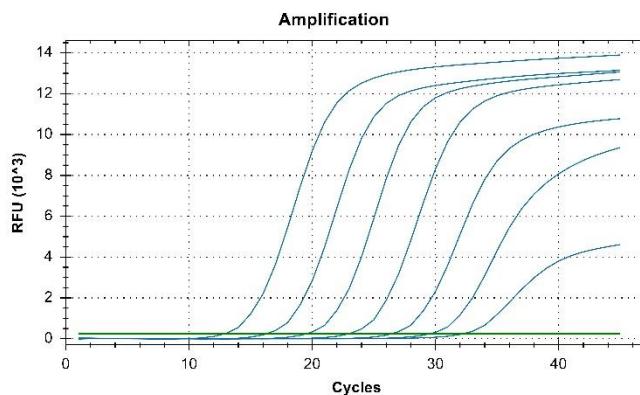
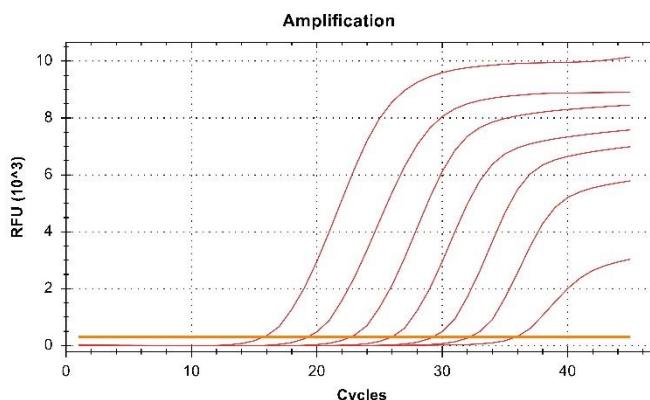


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar del gen N (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del SARS-CoV-2 fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reactividad cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A and C	-	Viurs Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Adenovirus Tipo 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Bocavirus humano	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 and HKU1	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Coronavirus MERS	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
<i>Legionella longbeache</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	Virus metapneumovirus humano A y B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Virus Parainfluenza humanos 1, 2, 3 y 4	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	Virus rhinovirus humano tipo C	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a RNA extraído a partir del virus Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 mostrando un resultado positivo.

13. Literaturverzeichnis / Bibliografía

1. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Verfügbar unter <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Zugriff März 2020.
2. Chen N. et al.. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
3. Europäisches Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Zugriff März 2020.
4. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
5. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
6. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.



7. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
8. Weltgesundheitsorganisation. Global surveillance for COVID-19 disease caused by human infection with the 2019 novel coronavirus. Interim guidance. 27 February 2020. Verfügbar unter [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)) Zugriff März 2020.
9. Weltgesundheitsorganisation. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance. 2 March 2020. Verfügbar unter <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Zugriff März 2020.
10. Weltgesundheitsorganisation. MERS situation update. December 2019. Verfügbar unter <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1> Zugriff März 2020.
11. Weltgesundheitsorganisation. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Verfügbar unter <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> Zugriff März 2020.
12. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
13. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-CoV-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.

14. Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien / Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

IVD	<i>In-vitro-Diagnostikum</i> Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Trocken aufbewahren Almacenar en lugar seco		Verfallsdatum Fecha de caducidad		Hersteller Fabricante	Chargennummer Número de lote
	Siehe Gebrauchsanweisung Consultar las instrucciones de uso		Temperaturbegrenzung Limitación de temperatura		Ausreichend für <n> Test(s) Contiene <n> test	DIL	Probenverdünner Diluyente de muestra	LOT REF Katalognummer Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERfil	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERfil ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000PTM Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005PTM Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	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 ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	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, por favor modifique 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	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

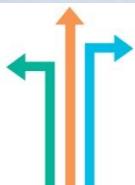
*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ und IQ5™ sind eingetragene Marken von Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ und ViiA™ sind eingetragene Marken von Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® ist eine eingetragene Marke von Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ und AriaMx sind eingetragene Marken von Agilent Technologies.
- Mastercycler™ ist eine eingetragene Marke von Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q ist eine eingetragene Marke von Qiagen.
- SmartCycler® ist eine eingetragene Marke von Cepheid.

Stand: Juli 2020







CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC