



1 Uso previsto

RealCycler CORO v.5.2 es un kit de reactivos para diagnóstico *in vitro* que permite la detección del ARN de Coronavirus SARS-CoV-2 y Sarbecovirus en muestras clínicas, utilizando un equipo SmartCycler® (Cepheid®). Es recomendable realizar la interpretación de los resultados con la aplicación informática BioVisor RC que incluye los criterios de validación de muestras y controles.

2 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del ADN/ARN usando oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas Taqman® marcadas con fluoróforos que emiten fluorescencia en caso de amplificación. El ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento significativo en la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra. Este valor se denomina *Ciclo umbral* (Ct -*Cycle Threshold*).

El sistema incluye un control interno CHIC (*Competitive Heterologous Internal Control*) para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

La amplificación del Coronavirus SARS-CoV-2 se detecta con el fluoróforo FAM, la de CHIC con HEX y la del gen N de Sarbecovirus con TxR.

3 Especificaciones

Sensibilidad

Coronavirus SARS-CoV-2: 10 copias/μL.
Sarbecovirus: 10 copias/μL.

La sensibilidad analítica ha sido determinada por el método de dilución límite. La sensibilidad ha sido obtenida en ensayos repetitivos con una reproducibilidad superior al 95% utilizando un equipo SmartCycler® (Cepheid®).

Especificidad

Coronavirus SARS-CoV-2: región ORF8.
Sarbecovirus: gen N.

La validación de la especificidad ha sido realizada mediante ensayos experimentales y análisis bioinformáticos.

4 Composición

RealCycler CORO v.5.2 incluye la mezcla de reacción **AmpliMix CORO v.5.2** dispensada en tubos de amplificación y un **Control Positivo CORO**, que consiste en una construcción artificial de ADN de Coronavirus.

Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

| Componente | Viales | Volumen |
|--|--------|----------|
| AmpliMix CORO v.5.2 (Retrotranscriptasa incluida) | 24 | 18,67 μL |
| Control Positivo CORO | 1 | 120 μL |

5 Estabilidad y almacenamiento

- Los ensayos de estabilidad han demostrado que este producto es estable durante 6 meses entre -18 °C y -25 °C. Ver fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa del kit.
- Los kits RealCycler deben almacenarse congelados entre -18 °C y -25 °C

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real SmartCycler® (Cepheid®).
- Microcentrífuga para tubos SmartCycler®.
- Gradillas para tubos SmartCycler®.
- Kit de purificación de ARN.
- Guantes desechables.
- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Congelador (entre -18 °C y -25 °C).
- Control negativo (ARN de muestras negativas, agua o tampón de elución).
- BioVisor RC (proporcionado gratuitamente a petición del usuario).

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.

- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- Se recomienda utilizar controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
- Se recomienda atemperar los tubos durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de abrirlos. En caso contrario puede producirse la rotura del tapón.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- La presencia de polimorfismos en las secuencias de unión de las sondas u oligonucleótidos al ADN/ARN del patógeno puede generar resultados erróneos. En el caso de discordancia entre las observaciones clínicas y los resultados obtenidos se aconseja comprobar los resultados mediante métodos alternativos.
- Los resultados negativos no excluyen la infección causada por el patógeno. Los resultados obtenidos con este kit de diagnóstico deben utilizarse e interpretarse en el contexto de un cuadro clínico general y no deben ser el único criterio para la toma de decisiones clínicas.
- Cuando se utilizan muestras con una concentración de patógeno inferior al límite de detección, los resultados obtenidos tienen una reproducibilidad inferior al 95%.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.
- Es recomendable realizar la interpretación de los resultados con la aplicación informática BioVisor RC que incluye los criterios de validación de muestras y controles.

8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20 °C hasta su uso.
- Las muestras pueden mantenerse refrigeradas durante el transporte hasta un máximo de 48 h.
- El kit es potencialmente compatible con cualquier muestra de la que pueda extraerse ARN del patógeno con la suficiente cantidad y calidad, si bien el usuario debe valorar mediante ensayos de laboratorio la idoneidad de las muestras no validadas.

Muestras clínicas validadas:

- Coronavirus SARS-CoV-2: exudado nasal, exudado nasofaríngeo, exudado orofaríngeo y exudado rectal.
- Sarbecovirus: exudado nasal, exudado nasofaríngeo y exudado orofaríngeo.

9 Procedimiento

a) Purificación de los ácidos nucleicos

El ARN debe purificarse a partir de las muestras clínicas utilizando un procedimiento adecuado. En el mercado se encuentran disponibles gran cantidad de sistemas de purificación de ácidos nucleicos. Realizar el procedimiento de purificación siguiendo las instrucciones del fabricante y partir del volumen de muestra recomendado.

Sistemas de purificación validados:

- QIAamp Viral RNA Mini kit (referencias 52904, 52906). Qiagen.
- MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor (referencias MVN400-03, MVN400-04). RBCBioscience.
- Maxwell® 16 Viral Total Purification kit (referencia AS1150). Promega Corporation.

Los kits *RealCycler* son compatibles con la mayoría de los sistemas de purificación, entre ellos:

- Arrow/LIAISON® IXT. DiaSorin.
- BioRobot EZ1. Qiagen.
- QIAcube. Qiagen.
- NucliSENS® easyMAG®. bioMérieux.

b) Perfil térmico

Programar el protocolo de amplificación "CORO" de acuerdo con las siguientes especificaciones:

| Stage 1 | | | Stage 2 | | | Stage 3 | | | |
|---------|------|--------|---------|------|--------|---------------------|------|------|--|
| Hold | | | Hold | | | Repeat 45 times. | | | |
| Temp | Secs | Optics | Temp | Secs | Optics | 3-Temperature Cycle | | | |
| 45.0 | 600 | Off | 95.0 | 120 | Off | Deg/Sec | Temp | Secs | Optics |
| | | | | | | NA | 95.0 | 15 | Off |
| | | | | | | NA | 55.0 | 30 | On |
| | | | | | | NA | 72.0 | 30 | Off |
| | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> Advance to Next Stage |

c) Preparación de la reacción

- Descongelar los tubos **AmpliMix CORO v.5.2** necesarios para amplificar las muestras y el **Control Positivo CORO**. Utilizar como control negativo ARN de muestras negativas, agua o tampón de elución de ARN (no proporcionados).
- Añadir **8 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.

- Centrifugar los tubos para que la reacción pase a la zona óptica del tubo. Verificar que no se forman burbujas en la zona óptica.
- Colocar los tubos en el equipo.
- *Create Run > Dye Set > FATA25.*
- *Add/Remove Sites:* asignar el protocolo "CORO" a las posiciones correspondientes a las muestras y los controles.
- *Start Run:* iniciar el programa de amplificación.

d) Ajustar el umbral de fluorescencia

Una vez finalizada la carrera es necesario fijar los umbrales de fluorescencia para cada canal según los valores indicados a continuación. Este ajuste es indispensable para la correcta interpretación de los resultados.

- *Analysis settings > Manual Thresh Fluor Units >* fijar el valor a 30.0.

Con el uso de la aplicación informática *BioVisor RC* no es necesario el ajuste de estos valores ya que están incluidos en su base de datos.

e) Interpretación del resultado de los controles

- Resultados válidos de los controles

| Control | Canales | | | | |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------|--|
| | Ch1 | Ch2 | Ch3 | Ch4 | |
| | FAM | HEX | TxR | ATTO647N | |
| Región ORF8 | CHIC | Gen N | - | | |
| POS | POS (Ct dentro del rango) | Indiferente | POS (Ct dentro del rango) | - | |
| NEG | NEG | POS (Ct dentro del rango) | NEG | - | |

- Resultados inválidos de los controles

En el caso de obtener un resultado negativo en algún canal del **Control Positivo** (excepto en CHIC) el resultado es inválido. Los resultados obtenidos en las muestras incluidas en la serie de trabajo deben ser descartados (no valorables).

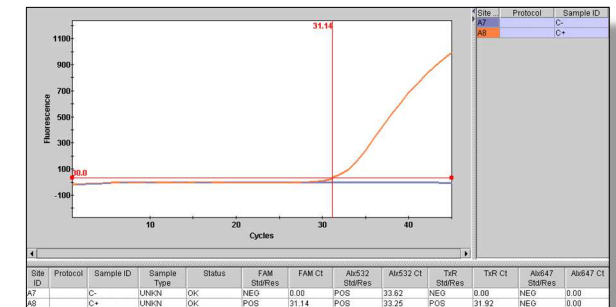
En el caso de obtener un resultado positivo (Ct > 0) en algún canal del control negativo (excepto en CHIC) el resultado es inválido. Los resultados obtenidos en las muestras incluidas en la serie de trabajo deben ser descartados (no valorables).

f) Interpretación de los resultados de las muestras

Interpretar el resultado obtenido en cada muestra según la combinación de señales indicada en la siguiente tabla:

| Canales | | | | Interpretación |
|-------------|---------------------|-------|----------|-----------------------------------|
| Ch1 | Ch2 | Ch3 | Ch4 | |
| FAM | HEX | TxR | ATTO647N | |
| Región ORF8 | CHIC | Gen N | - | |
| POS | Indiferente | NEG | - | POSIBLE POSITIVO (No concluyente) |
| NEG | Indiferente | POS | - | POSIBLE POSITIVO (No concluyente) |
| POS | Indiferente | POS | - | POSITIVO Coronavirus SARS-CoV-2 |
| NEG | Ct dentro del rango | NEG | - | NO SE DETECTA |
| NEG | Ct fuera del rango | NEG | - | NO VALORABLE |
| NEG | 0,00 | NEG | - | NO VALORABLE |

g) Ejemplo de resultado



Resultado obtenido al procesar una muestra positiva (A8 en naranja) y una muestra negativa (A7 en gris). Muestra positiva: se observa una curva exponencial. Muestra negativa: señal por debajo del umbral.

10 Interpretación de los resultados utilizando la aplicación informática *BioVisor RC*

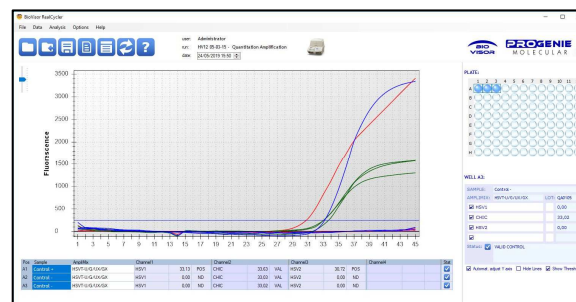
Para la correcta interpretación de los resultados obtenidos con los productos *RealCycler* en el equipo *SmartCycler*® es recomendable el uso del *BioVisor RC*.



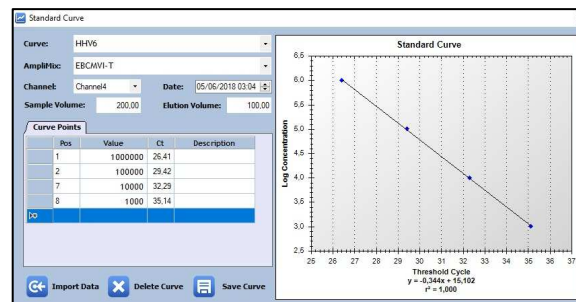
Especificaciones *BioVisor RC*:

- Marcado CE.
- Gestión de usuarios y permisos.
- Importación de los datos desde el equipo de PCR.
- Umbrales de fluorescencia predeterminados.
- Normalización de los valores de fluorescencia.
- Visualización de todos los canales simultáneamente.
- Interpretación del resultado de cada muestra según su resultado de CHIC.
- Interpretación de la serie según el resultado de los controles.
- Monitorización de las posibles inhibiciones.
- Permite la cuantificación simultánea de varios patógenos.
- Cálculo automático de la carga del patógeno en la muestra.
- Generación de informe con los resultados.
- Conservación de las rectas de calibración.
- Archivo de las series de trabajo.
- Gestión de todas las carreras de los diferentes equipos en una única base de datos.
- Almacenamiento de carreras obtenidas con los siguientes equipos validados:
 - *SmartCycler*® (Cepheid®)
 - ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific)
 - CFX96™ (Bio-Rad)
 - Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems)
 - T-COR 8® (Cirrus Dx®)
- Conectividad con varios equipos T-COR 8® en red local.

Ejemplo de detección (todos los canales):



Ejemplo de cuantificación:



El *BioVisor RC* es gratuito para los usuarios de los productos *RealCycler*. Para obtenerlo puede contactar con Progenie molecular (soporte@progenie-molecular.com) o con su distribuidor.

11 Control de calidad

Para validar los resultados, los valores de Ct obtenidos en el control positivo y en los controles internos de cada muestra deben encontrarse dentro de los rangos especificados en la etiqueta interna del kit.

Cada lote del kit *RealCycler* CORO v.5.2 ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (Cepheid®) y los parámetros de validación incluidos en el *BioVisor RC*.

Fecha de publicación: Mayo, 2020.


Hola, soy CalaSmart ¿Puedo ayudarte?
soporte@progenie-molecular.com



Historial de revisiones:

- Versión 5.2 - Abril 2020: Mejora de la sensibilidad para la detección del ARN de Coronavirus SARS-CoV-2.
- Versión 4.2 - Abril 2020: Diana para la detección del gen N de Sarbecovirus.
- Versión 3 - Marzo 2020: Marcado CE.
- Versión 2 - Febrero 2020: Modificación del perfil térmico.

Marcas registradas propiedad de otras compañías: Cepheid® y *SmartCycler*® (Cepheid Corporation); Arrow/LIAISON® iXT (DiaSorin); BioRobot EZ1, QIAamp y QIAcube (Qiagen); MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor (RBCBioscience); Maxwell® (Promega Corporation); NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux).



Progenie Molecular
Edificio Progenie, Valle de la Ballestera 56 46015, España
T: +34 902 91 05 05 F: +34 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com