

### 1 | USO PREVISTO

BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 es una prueba de diagnóstico molecular *in vitro* para la detección cualitativa del SARS-CoV-2 (virus responsable del COVID-19) a partir de un extracto de ARN obtenido de un único hisopo nasofaríngeo u orofaríngeo. Esta prueba permite la detección de 2 dianas moleculares específicas del SARS-CoV-2 localizadas en los genes RdRp y E.

### 2 | INTRODUCCIÓN

El COVID-19 es una enfermedad respiratoria aguda causada por el SARS-CoV-2, que pertenece a la familia de virus responsables del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). Los síntomas más comunes de la COVID-19 son fiebre, fatiga, tos seca y secreción o congestión nasal.

Esta enfermedad se transmite de persona a persona a través de las gotitas que salen de la nariz o la boca cuando una persona infectada tose o exhala. Estas gotitas se depositan en objetos y superficies. Otras personas se infectan por COVID-19 cuando entran en contacto con estos objetos o superficies y luego se tocan los ojos, la nariz o la boca, o cuando respiran las gotitas de una persona infectada. El periodo de incubación estimado para el COVID-19 varía de 1 a 14 días.

Durante la pandemia mundial de COVID-19, es esencial identificar rápidamente el agente patógeno responsable de los síntomas para adoptar las medidas terapéuticas adecuadas o incluso de aislamiento necesarias para controlar la pandemia. Las pruebas basadas en la búsqueda del ARN del SARS-CoV-2 permiten identificar a las personas infectadas. El kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 puede utilizarse para identificar tanto infecciones asintomáticas como agudas en pacientes.

### 3 | PRINCIPIO

El kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 es una prueba de diagnóstico *in vitro* basada en la tecnología RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) en tiempo real. La prueba se basa en dos pasos sucesivos:

- a) una retrotranscripción del ARN viral, y de un ARN humano endógeno, en ADN complementario específico del ARN objetivo (ADNc),
- b) una amplificación del ADNc viral a partir de dos regiones específicas del SARS-CoV-2: los genes RdRp y E, y un control interno a través de la RNasa P (una región que codifica un ARN humano altamente conservado).

Este método utiliza sondas marcadas con fluoróforos FAM para la amplificación específica del gen E del SARS-CoV-2, y una sonda marcada con fluoróforos HEX para el gen RdRp del SARS-CoV-2.

Una tercera sonda marcada con fluoróforo Cy5 se utiliza para la amplificación de un control de amplificación interno (RNasa P). Este control de procedimiento permite evaluar la calidad de la toma de muestras y valida los pasos de extracción y purificación del ARN. Este control también garantiza que los pasos de retrotranscripción y amplificación han funcionado, excluyendo así los resultados falsos negativos.

Este método permite por tanto la detección simultánea de 2 genes específicos del SARS-CoV-2, y de un control interno según los canales de detección correspondientes. El aumento de la señal de fluorescencia sólo se detecta si la secuencia diana correspondiente a la sonda amplificada está presente en la muestra. Por tanto, la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación de la diana durante la fase de amplificación. El valor Qc (ciclo de cuantificación) corresponde al ciclo en el que la fluorescencia comienza a aumentar exponencialmente y de forma diferencial respecto al ruido de fondo. El kit puede utilizarse en dos tipos de muestras:

- hisopo nasofaríngeo
- hisopo orofaríngeo

Este kit de amplificación puede utilizarse a partir de un extracto de ARN purificado o en muestras recogidas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® Viral Sample Collection (ref 3150060), y procesadas con el kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® Viral Lysis (ref 3150059).

### 4 | CONTENIDO DEL KIT

Material incluido

Microplaca de 96 pocillos precargada con la mezcla maestra  
Control positivo (CTRL +)  
Control negativo (CTRL -)  
Película transparente o tapones transparentes para el sellado de la microplaca  
Instrucciones de uso

Material necesario pero no incluido

Kit de extracción de ARN	Guantes desechables
Pipetas y puntas filtradas	Hisopos de recogida de muestras
Termociclador PCR con FAM, HEX, Cy5	
Centrífuga de microplacas PCR	

El instrumento de PCR utilizado para la prueba debe ser un "sistema abierto" con al menos las siguientes características principales:

- Ensayos de PCR cuantitativos en tiempo real.
- Bloque de termociclador programable.
- Fuente de excitación : Leds, lámpara o láser
- Juegos de filtros (longitudes de onda de excitación/emisión) adecuados para la detección de fluoróforos "reporteros" de las sondas FAM, HEX y Cy5.
- Conexión con un ordenador mediante un software de análisis específico que permita la recuperación de los datos de fluorescencia, los ensayos de cuantificación absoluta y la interpretación de los resultados.

El kit ha sido desarrollado y validado para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real: CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), LightCycler®480 Instrument II (Roche), DT lite 48/96 (DNA Technology / Amplix), QuantGene 9600 (BIOER).

### 5 | PRECAUCIONES

- Para el diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar la prueba antes de la fecha de caducidad.
- Para obtener resultados óptimos, siga cuidadosamente el procedimiento y las condiciones de almacenamiento.
- No comer, fumar o beber mientras se realiza la prueba.
- Utilice guantes de laboratorio desechables y sin polvo durante todo el procedimiento de la prueba
- Considere las muestras como potencialmente infecciosas y manipúlelas con cuidado, según las recomendaciones del laboratorio.
- Retirar con cuidado las láminas de aluminio para evitar proyecciones de la mezcla maestra.
- Centrifugar los tubos antes de abrirlos, abriéndolos uno tras otro cerrándolos bien entre cada uno para evitar cualquier contaminación.
- La gama estándar y CTRL+ contienen cantidades importantes de secuencias de ADN. Por lo tanto, pueden contaminar potencialmente los otros componentes del kit si no se siguen las buenas prácticas de biología molecular. Para limitar este riesgo de contaminación, se recomienda almacenar estos dos componentes fuera del kit en la primera apertura del mismo.
- La gestión diaria de un gran número de muestras y la alta sensibilidad de la técnica de PCR pueden, en ausencia de precaución, generar falsos resultados positivos por contaminación, por lo que la pre-manipulación de la PCR, la post-PCR y la extracción de ADN deben realizarse en salas separadas.
- Utilizar guantes desechables en cada zona y cambiarlos antes de pasar de una zona a otra.
- Limpiar las salpicaduras de la muestra con un desinfectante adecuado..
- Cuando se utilicen controles negativos y positivos con una serie de pacientes, se recomienda depositar primero el control negativo en el tubo de mezcla maestra y cerrarlo inmediatamente. A continuación, depositar las muestras de los pacientes y cerrarlas inmediatamente, y finalmente depositar el control positivo.
- No abrir los tubos de PCR al final de la prueba y desecharlos en un cubo de basura adecuado para residuos biológicos
- Deseche las piezas sucias o los componentes vacíos del kit en un cubo de basura apto para residuos biológicos.

### 6 | ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

No utilizar más allá de la fecha de caducidad indicada en el kit. Almacenar el kit a una temperatura de -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Los controles positivo y negativo pueden someterse a hasta 30 ciclos de congelación/descongelación.

El kit se envía congelado. Los componentes del kit deben llegar congelados. En estas condiciones, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad.

Retire y descongele sólo el número necesario de microplacas o tiras de pocillos rompibles. Como las placas o tiras están listas para su uso, no hay razón para someterlas a repetidos ciclos de congelación y descongelación.

Se recomienda colocar la placa de mezcla maestra en un estante refrigerado o en hielo mientras se añaden las muestras.

Una vez retirado el papel de aluminio, utilice la placa inmediatamente.

### 7 | RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Recoger las muestras nasofaríngeas u orofaríngeas con hisopos estériles que luego se descargan en tubos estériles. Para descargar los hisopos pueden utilizarse tubos estériles que contengan medio de transporte, o los disponibles a través del kit de recogida de muestras virales BIOSYNEX AMPLIQUICK® (ref 3150060).

Las muestras pueden extraerse inmediatamente, o almacenarse a 2-8°C durante 24 horas, o congelarse a -70°C para su almacenamiento a largo plazo.

El transporte de las muestras clínicas debe cumplir con la normativa local para el transporte de agentes infecciosos.

### 8 | EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS

Existen varios kits comerciales de extracción de ARN. Puede utilizar sus propios sistemas de extracción o los kits comerciales. Para la extracción de ARN, siga las instrucciones del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- BIOSYNEX AMPLIQUICK® Viral Lysis (REF. 3150059)
- Liferiver Viral Extraction Kit (REF: ME- 0044)
- QIAamp Mini RNA Viral Extraction Kit (QIAGEN)

No es necesario extraer los controles positivos y negativos con el kit de extracción de ácidos nucleicos. Si se retrasa el uso de los ARN purificados, antes de añadirlos a la mezcla maestra, guárdelos a 4°C o en hielo el día del ensayo; de lo contrario, guárdelos a -70°C para su almacenamiento a largo plazo.

### 9 | PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN

Preparación de la microplaca REF 3150058

1. Retire la placa de 96 pocillos completa.
2. Centrifúguese la placa durante 10 segundos para recuperar las gotas de los bordes de los pocillos o de la tapa.
3. Retire y deseche con cuidado el papel de aluminio. Aplique 10 µl de muestra o control.
4. Sellar la microplaca con el film transparente suministrado. No utilice el papel de aluminio.
5. Centrifugar los tubos durante 10 segundos.



**Preparación de la microplaca seccional REF 3150058\_SEC**

1. Extraer la placa rompible en tiras de 8 pocillos, tomar el número de tiras necesarias (ejemplo: 1 tira corresponde a 6 muestras ,1 CTRL+ y 1 CTRL-).
2. Centrifugar las tiras durante 10 segundos para recoger las gotas en los bordes de los pocillos o en el tapón.
3. Retire con cuidado el papel de aluminio y deséchelo. Colocar 10 µL de muestra o control.
4. Cierre los tubos con los tapones transparentes suministrados. No utilice el papel de aluminio.
5. Centrifugar los tubos durante 10 segundos.
6. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:  
PCR Program :

Paso	Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Adquisición
Retrotranscripción	1x	50°C	10 min	-
Activación	1x	95°C	2 min	-
Desnaturalización	50x	95°C	05 seg	-
Hibridación/ alargamiento /		58°C	20 seg	si

Introduzca **20 µL** de volumen de reacción en el programa del termociclador. Consulte el manual de instrucciones del termociclador utilizado para obtener información sobre la programación.  
Para el termociclador Quantstudio 5 (Applied Biosystems) y el QuantGene 9600 (BIOER), el **modo FAST** es compatible y está validado.  
Para el termociclador Quantstudio 5 (Applied Biosystems), seleccione "None" para

Ajuste de los canales de detección:

Objetivo	Fluorocromo
Gen E del SARS-CoV-2	FAM
Gen RdRp del SARS-CoV-2	HEX
Gen de control del procedimiento RNasa P	Cy5

**10 | ANÁLISIS DE LOS DATOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

**A. Criterios de validación de los ensayos**

**Control negativo :**

La fluorescencia emitida debe estar por debajo del umbral. Este es un indicador de amplificación no específica. Si la fluorescencia supera el umbral, compruebe si hay una curva atípica. En el caso de una curva de amplificación, hay que considerar la contaminación o el error de distribución en los microtubos. Sólo debe amplificarse la señal del control interno.

**Control positivo:**

El valor del control positivo debe detectarse preferentemente antes de 30 ciclos (Cq ≤ 30). En ausencia de amplificación del control positivo, debe considerarse la existencia de un problema de amplificación o de detección de fluorescencia (termociclador defectuoso). Algunas muestras pueden mostrar curvas atípicas que no son características de las curvas de amplificación. En este caso, el resultado no debe considerarse interpretable y debe repetirse el análisis de la muestra con los controles.

**Control de amplificación interna: :**

El control interno garantiza que las enzimas de la mezcla maestra son funcionales. En efecto, debe observarse una curva de amplificación del control interno en el canal Cy5. Sin embargo, se pueden observar dos situaciones de falta de amplificación del control interno:

- Si los genes objetivo están presentes inicialmente en la muestra con un número elevado de copias, el control interno proporcionado puede no ser amplificado. Este resultado es consistente y no invalida la prueba. Debe interpretarse como un resultado positivo a pesar de la falta de señal del control interno. Este fenómeno es el resultado de la competencia de amplificación entre el Control Interno y las dianas presentes en un alto número de copias.
- Si los genes diana en los canales FAM y HEX, así como en el canal Cy5, no se amplifican, no se puede obtener ningún resultado. Esta situación pone de manifiesto la presencia de inhibidores de la PCR. La PCR debe repetirse a partir de la muestra primaria y preferiblemente en un extracto de ARN.

**B. Interpretación cualitativa (positiva o negativa)**

Las señales por encima del umbral, y que se ajustan visualmente a una **curva clásica de amplificación por PCR**, se consideran resultados positivos.

Canales de detección			Interpretación
FAM (gen E)	HEX (gen RdRp)	Cy5 Ctrl interno	
+	+	+	Paciente con ARN específico del SARS-CoV-2
+	+	-	
-	+	+	Paciente con ARN específico del SARS-CoV-2
+	-	+	Resultados dudosos o muestra no suficientemente concentrada - repetir la prueba
-	-	+	Paciente sin ARN específico del SARS-CoV-2 detectable
-	-	-	Mala calidad de la muestra, inhibición de la reacción o problemas durante la prueba - Realizar una nueva prueba o un nuevo muestreo

NB: En caso de señales positivas en los canales (FAM y HEX) para la detección de objetivos patógenos, la señal del control interno no es necesaria para validar el resultado. Una alta carga de patógenos puede dar lugar a una señal reducida o ausente para el control interno.

**11 | LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

1. Para obtener resultados fiables, siga cuidadosamente las instrucciones de uso y siga el procedimiento de uso. Consulte la interpretación de los resultados en el prospecto.
2. El kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 es una ayuda para el diagnóstico. El resultado de la prueba PCR debe asociarse al diagnóstico clínico.
3. Los resultados de la prueba deben interpretarse en el contexto epidemiológico, clínico y terapéutico.
4. Dependiendo de la carga del patógeno, los rastros de ARN pueden persistir durante varios días, semanas o meses en pacientes sintomáticos o asintomáticos.

**12 | RENDIMIENTO**

- **Sensibilidad analítica**

**Límites de detección de las secuencias RdRp y E en el ARN extraído:**

El límite de detección del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 se define como la concentración, en número de copias del gen /µl, que puede detectarse al 100% en una muestra de ARN específico del SARS-CoV-2. Se determinó realizando una serie de diluciones en una muestra de referencia con un número conocido de copias del gen.

GEN E			
Número de copias de genes /µl	Número de repeticiones	Número de positivos	% de detección
200	12	12	100
20	12	12	100
2	12	12	100
1	12	12	100
0,5	12	8	67
GEN RdRp			
Número de copias de genes /µl	Número de repeticiones	Número de positivos	% de detección
100	12	12	100
10	12	12	100
1	12	12	100
0,5	12	11	92

El límite de detección es de 1 copia /µl.

**Límites de detección de las secuencias RdRp y E en muestras no extraídas:**

Se determinó realizando una serie de diluciones de una muestra de referencia con número de copias conocido en hisopos nasofaríngeos calificados como negativos para el SARS-CoV-2.

GEN E			
Número de copias de genes /µl	Número de repeticiones	Número de positivos	% de detección
200	12	12	100
20	12	12	100
10	12	12	100
2	12	12	100
1	12	6	50
0,5	12	0	0
0,1	12	2	17





GEN RdRp			
Número de copias por genes /µl	Número de repeticiones	Número de positivos	% de detección
200	12	12	100
20	12	12	100
10	12	12	100
2	12	12	100
1	12	6	50
0.5	12	2	17
0.1	12	4	33

El límite de detección es de 2 copias /µl.

• **Especificidad analítica**

El diseño de los oligonucleótidos (cebadores y sondas) se validó in silico mediante alineación BLAST. La comparación de las secuencias obtenidas muestra una detección específica del SARS-CoV-2. Ningún cebador o sonda detecta ARN viral distinto del SARS-CoV-2.

Un panel de muestras biológicas positivas para el ARN viral fue probado para la especificidad de la detección del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2.

**Reactividad cruzada**

Se analizó un panel de muestras negativas y positivas para otros virus. No se detectaron señales en los canales FAM y HEX. El control interno fue válido en todas las pruebas:

**412 muestras en total**

	GEN RdRp	GEN E
Muestras positivas a la gripe	0/220	0/220
Muestras positivas de VRS	0/96	0/96
Muestras de gripe negativas (2018-2019)	0/96	0/96

**ADN sintético (prueba por triplicado)**

Secuencia MERS 200 000 copias/µl	0/3	0/3
Secuencia SARS 200 000 copias/µl	0/3	0/3

• **Actuaciones clínicas**

Los resultados clínicos se determinaron en 195 muestras que se calificaron como positivas o negativas mediante las pruebas de RT-PCR del SARS-CoV-2 con marca CE de referencia por el Ministerio de Sanidad francés.

A continuación se resumen los resultados obtenidos en los 3 centros de recogida:

	GEN RdRp	GEN E
Positivos SARS-CoV-2 Laboratorio 1	24/24	24/24
Positivos SARS-CoV-2 Laboratorio 2	85/85	85/85
Positivos SARS-CoV-2 Laboratorio 3	6/6	6/6
Negativos SARS-CoV-2 Laboratorio 1	0/80	0/80

El siguiente cuadro muestra los resultados globales:

		RT-PCR de referencia	
		Positivos	Negativos
BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2	Positivos	115	0
	Negativos	0	80

Sensibilidad 100%

Especificidad : 100%

• **Precisión**

Los datos de precisión en el contexto del kit BIOSYNEX AMPLIQUICK® SARS-CoV-2 se determinaron basándose en 3 condiciones:

- Variabilidad intraensayo (dentro de un experimento)
- Variabilidad entre ensayos (entre diferentes experimentos)
- Variabilidad entre manipuladores

Los datos de variabilidad se expresan en términos de valor medio, desviación estándar y coeficiente de variación, basados en los valores del ciclo de cuantificación (Cq) del ARN del SARS-CoV-2. Para ello, se probaron dos diluciones de la muestra: 1 alta y 1 baja.

GEN RdRp	CTRL+	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Valor Cq medio de la muestra +++	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Valor Cq medio de la muestra +++	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
Variabilidad intraensayo	26,1	0,1	0,2	23,42	0,08	0,4	31,17	0,12	0,4
Variabilidad entre ensayos	27,76	0,49	1,76	23,21	0,17	0,75	31,16	0,18	0,57
Variabilidad entre manipuladores	26,99	0,1	0,39	22,94	0,05	0,22	30,91	0,115	0,37

GEN E	CTRL+	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Valor Cq medio de la muestra +++	Desviación estándar	Coefficiente de variación %	Valor Cq medio de la muestra +++	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
Variabilidad intraensayo	25,6	0,1	0,3	23,83	0,11	0,46	31,49	0,14	0,45
Variabilidad entre ensayos	26,25	0,47	1,78	23,91	0,1	0,44	32,15	0,33	1,04
Variabilidad entre manipuladores	25,97	0,16	0,63	23,59	0,03	0,11	31,92	0,34	1,06

**SÍMBOLOS**



Atención, consulte las instrucciones de uso



Número de lote



Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*



Fabricante



Almacenar a -20°C



No reutilizar



Pruebas por kits



Número de referencia



Control negativo



Control positivo



AMPLIQUICK®



Master MIX



Caducidad

IFU\_3150058\_ES\_V02202009R01  
Fecha de revisión : 09/2020

