

E S	REF 1N042	Mezcla liofilizada para la detección cualitativa de los nuevos Coronavirus SARS-CoV-2, FLU A&B y RSV en RT-PCR en tiempo real	IVD
	STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU- RSV		
		REACTIVO: 12 x (8 x 0,025) mL BUFFER : 1 x 1,5 mL + 2 x 1,0 mL CONTROL: 1 x (1 x 0,1) mL	
NOTA: Este prospecto debe leerse detenidamente antes de utilizar el producto. Deben seguirse las instrucciones del prospecto. No se puede garantizar la fiabilidad de los resultados del ensayo si hay alguna desviación de las instrucciones de este prospecto.			

USO PREVISTO

El kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV es un ensayo manual liofilizado de RT-PCR en tiempo real, destinado a la detección cualitativa simultánea y a la diferenciación del ARN del SARS-CoV-2, de los virus de la gripe A&B (gripe A&B) y del virus respiratorio sincitial humano A&B (RSV) en hisopos nasofaríngeos humanos recogidos en medios de transporte viral 1,2,3.

Este ensayo es una ayuda en el diagnóstico de los virus SARS-CoV-2, de la gripe A y B (Flu A&B) y del virus respiratorio sincitial humano A y B (RSV), ya sean infecciones únicas o coinfecciones. La prueba es sólo para uso profesional. Para uso de diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO

El kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV es un dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* y ha sido diseñado para el uso profesional en laboratorios clínicos y de investigación especializados.

El kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV se basa en la prueba RT-PCR en tiempo real y en la tecnología Sentinel STAT-NAT® (Tecnología de Amplificación Estabilizada - Prueba de Ácidos Nucleicos). El kit consiste en una mezcla de reacción liofilizada optimizada (96 reacciones en total) dirigida simultáneamente a las regiones específicas de SARS-CoV-2 (gen N, marcado con fluoróforo FAM), Influenza A/B (genes M2-M1 y NEP-NS1, marcados con fluoróforo HEX/VIC) y RSV (gen L, marcado con fluoróforo Texas Red/ROX), lo que permite una evaluación rápida y sencilla de los resultados.

En cada mezcla de reacción hay cebadores y sondas específicos para un gen de mantenimiento (RNasa P humana), marcados con fluoróforo Cy5, que se utilizan como control interno (CI) endógeno. Esto proporciona indicaciones sobre la funcionalidad del sistema y sobre la ausencia de inhibidores de la actividad de la polimerasa, que podrían causar falsos negativos.

La mezcla maestra liofilizada se presenta en una tira de PCR de 8 tubos, lo que minimiza cualquier riesgo potencial derivado de errores de pipeteo y contaminación. Las mezclas de reacción STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV, que incluyen cebadores y sondas específicas, garantizan la sensibilidad y la especificidad de la reacción sin pasos manuales intermedios para la configuración de las mezclas de reacción.

El control positivo (PC), en forma seca, se incluye en el kit. El kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV es estable a +15/+30 °C.

REACTIVOS

Figura 1. Configuración del kit

REACTIVO	CONTROL	BUFFER
12 tiras x 8 tubos de mezcla maestra	1 X 1 Pluri CoV-2-FLU-RSV Control positivo	2 X 1 mL Tampón de reconstitución 1 X 1,5 mL Tampón de reconstitución de control

STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV se compone de

- REACTIVOS: 12 tiras x 8 tubos de mezcla maestra

El kit incluye 12 bolsas de aluminio etiquetadas como "8 x Master Mix Tubes", que contienen una única tira de 8 tubos (tubo de PCR de 0,2 mL) con Master Mix liofilizado y una pequeña bolsita desecante de color naranja.

Cada tubo de PCR contiene:

- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP);
- Transcriptasa inversa;
- Polimerasa Hot Start (Taq);
- Cebadores y sonda específicos para el gen N;
- Cebadores y sonda específicos para los genes M2-M1/genes NEP-NS1;
- Cebadores y sonda específicos para el gen L;
- Cebadores y sonda específicos para el gen de la RNasa P humana;
- Tampón de reacción;

La Master Mix liofilizada debe almacenarse a +15/+30 °C. Utilice únicamente envases no dañados.

- CONTROL: 1 x 1 control positivo

El kit contiene 1 bolsa de aluminio etiquetada como "CoV-2-FLU-RSV Control" que contiene 1 tubo (tapa verde) de Control Positivo (PC) constituido por un pellet seco de ADN sintético y una pequeña bolsita de desecante naranja.

El control debe almacenarse a +15/+30 °C. Utilizar sólo envases no dañados.

Una vez abierto, vuelva a tapar el STAT-NAT® Control y consérvelo a -20 °C.

- BUFFER: 2 x 1.0 mL + 1 x 1.5 mL

El kit incluye:

- 2 tubos de tampón de reconstitución STAT-NAT® (1,0 mL, etiqueta roja) en forma líquida;
- 1 Tampón de Reconstitución STAT-NAT® Control (1,5 mL, etiqueta azul) en forma líquida.

Los tampones deben almacenarse a +15/+30 °C. Utilizar sólo envases no dañados.

Después de abrirlos, vuelva a tapar el tampón de reconstitución STAT-NAT® y el tampón de reconstitución de control STAT-NAT® y guárdelos a +15/+30 °C.

Estabilidad del vial en uso: estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase si se conserva a +15/+30 °C.

El tampón de reconstitución de control STAT-NAT® debe utilizarse como control sin plantilla (NTC).

CONTROL DE CALIDAD

Utilice únicamente el control positivo suministrado con el kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV.

El control STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV proporciona indicaciones sobre la funcionalidad del sistema. El tubo PC contiene un pellet seco de ADN sintético.

Reconstituya el PC antes de utilizarlo siguiendo las instrucciones siguientes.

Reconstitución del control positivo:

1. Centrifugue el tubo STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV Positive Control antes de abrirlo para asegurarse de que el ADN está en el fondo del tubo;
2. Reconstituya el control positivo STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV con 100 µL de tampón de reconstitución STAT-NAT® Control;
3. Tapar el tubo y agitar durante 30 segundos hasta que el ADN seco se resuspenda;
4. Centrifugar durante unos segundos a velocidad media para eliminar cualquier residuo del tapón y eliminar las burbujas/espuma;
5. Esperar al menos 15 minutos antes de utilizarlo;
6. Agitar el Control Positivo durante unos segundos a velocidad media y centrifugarlo durante unos segundos a velocidad media;
7. Consulte la sección de configuración de Reacción para conocer los siguientes pasos.

Después de su uso, vuelva a tapar el residuo del Control Positivo STAT-NAT® reconstituido y almacénelo a -20 °C.

Es necesario validar cada ejecución utilizando:

- NTC : Tampón de reconstitución de control STAT-NAT
- STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV Control positivo.

Si las directrices del laboratorio lo exigen, incluya un control negativo (NC) en cada serie. Una muestra negativa verificada puede utilizarse como NC.

MUESTRA

Para las pruebas iniciales de diagnóstico de COVID-19, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la recogida y el análisis de hisopos nasofaríngeos. Recoja las muestras con un dispositivo adecuado.

Almacenar los especímenes a 2-8 °C. Las muestras deben procesarse en las 48 horas siguientes a su recogida⁴.

INSTRUMENTOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Equipo general de laboratorio molecular: cabina de bioseguridad (campana de flujo laminar) para las extracciones, centrifuga/microcentrifuga, mezclador vortex, pipetas de volumen variable, plásticos estériles desechables.

Kit de extracción: Recomendamos el uso del kit de extracción de ADN/ARN total Sentinel Diagnostics STAT-NAT® (REF. 1N1000) o el kit de extracción Pathomag Sentinel Diagnostics STAT-NAT® (REF. 1N1001).

Equipo de protección personal (EPP) como guantes, batas de laboratorio, gafas de seguridad, mascarillas.

Ciclador térmico de PCR en tiempo real validado Sentinel Diagnostics SENTiNAT® MICRO, Bio-Rad CFX96TM DX y QuantStudio™ 5 DX.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este ensayo es exclusivamente para uso IVD;
- Lea todas las instrucciones contenidas en el prospecto del kit antes de realizar la prueba;
- Cumplir con la fecha de caducidad del kit;
- No mezcle los reactivos para la amplificación (es decir, el tampón) de otros kits comerciales;
- No mezclar reactivos de kits con diferente número de lote;
- Las hojas de datos de seguridad están disponibles en www.sentinel diagnostics.com o en su proveedor local;
- Mantenga todos los tubos de mezcla maestra (REAGENT) del kit protegidos de la luz y la humedad en sus sobres de aluminio;
- Mantenga el control positivo (CONTROL) del kit protegido de la humedad en su envoltura de aluminio con una bolsita de desecante naranja dedicada.
- Utilice siempre el equipo de protección personal para la protección individual;

- El producto debe ser manipulado por personal formado en técnicas de biología molecular, como la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos; Es necesario mantener separadas la zona de extracción de muestras, la zona de preparación de reactivos y la zona de amplificación/detección;

- Los resultados obtenidos con el ensayo STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV deben interpretarse junto con otros resultados clínicos y de laboratorio;

- Al igual que con otras pruebas, los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2/Influenza/RSV;

- Las mutaciones dentro de las regiones objetivo del ARN del SARS-CoV-2 cubiertas por el kit STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV pueden afectar a los cebadores y/o al emparejamiento de las sondas, lo que da lugar a una subestimación de la detección de los ácidos nucleicos virales.

- Pueden producirse resultados falsos negativos o no válidos debido a las interferencias. El control interno se incluye en STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV para ayudar a identificar las muestras que contienen sustancias que pueden interferir con el aislamiento del ácido nucleico y la amplificación de la PCR.

- **PRECAUCIÓN**  Este producto requiere la manipulación de especímenes humanos. Se recomienda que todos los materiales de origen humano se consideren potencialmente infecciosos y se manipulen de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos transmitidos por la sangre⁵, se debe utilizar el nivel de bioseguridad ²⁶ u otras prácticas de bioseguridad adecuadas^{7,8} para los materiales que contienen o se sospecha que contienen agentes infecciosos.

- Se recomienda encarecidamente utilizar toda la tira de 8 tubos en una sola sesión.

- Examine la Master Mix liofilizada antes de utilizarla. Deseche el producto que aparezca con signos de contaminación por humedad (es decir, cambio de color, colapso del producto, etc...).

INSTRUCCIONES DE USO

- Corte las bolsas de aluminio en el punto indicado por las muescas laterales.

- Saque las tiras y los tubos de las bolsas inmediatamente antes de su uso.

- Asegúrese de que las bolsas estén siempre bien cerradas y de que las bolsitas de desecante sigan dentro. Utilice sólo los paquetes que no estén dañados.

- Deseche las bolsas de aluminio y su contenido si las bolsas de desecante pasan de color naranja a verde.

- Todos los reactivos, almacenados correctamente a +15/+30 °C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

PROCEDIMIENTO**Ajuste de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real**

1. Encienda el termociclador PCR en tiempo real y el ordenador y abra el programa de software dedicado;

2. Configure el detector para la sonda diana SARS-CoV-2 **N Gene** con el reportero "**FAM**" y el quencher "none". Para SENTiNAT® MICRO ajuste "verde";

3. Configure el detector para los genes **M2-M1** de la gripe y las sondas objetivo **NEP- NS1** con reportero "**HEX/VIC**" y quencher "none". Para SENTiNAT® MICRO ajuste "amarillo";

4. Ajuste el detector para la sonda objetivo del gen **RSV L** con el reportero "**Texas Red/ROX**" y el quencher "none". Para SENTiNAT® MICRO ajuste "naranja";

5. Ajustar el detector para el **CI** de la reacción con el reportero "**Cy5**" y el quencher "none". Para SENTiNAT® MICRO ajuste "rojo";

6. En el campo Referencia pasiva, si se solicita,

"ninguna";

- Para obtener información básica sobre la configuración y programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento respectivo;
- Realice la PCR en tiempo real utilizando el perfil térmico mostrado en

Tabla A y B.

Tabla A. Perfil térmico de la PCR en tiempo real

Segmento	Número de ciclo	Temperatura	Tiempo	
1	1	42°C	30 minutos	Detección de fluorescencia OFF
2	1	95°C	2 minutos	
3	10	95°C 58°C	15 segundos 30 segundos	
4	35	95°C 58°C	15 segundos 30 segundos	Detección de fluorescencia ON

Tabla B. Ajustes de la PCR en tiempo real

Volumen de la muestra	Velocidad de rampa
25 µL	Instrumento por defecto

Configuración de la reacción

- Extraer el ARN de las muestras respiratorias humanas (el sistema de extracción no está incluido en el kit);
- Prepare el Control Positivo STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV como se indica en la sección de CONTROL DE CALIDAD;
- Utilice el tampón de reconstitución de control STAT-NAT® como control sin plantilla (NTC);
- Realice el primer paso del Protocolo sacando el número necesario de **Tubos de Mezcla Maestra** de las bolsas;
- Reconstituya las mezclas maestras liofilizadas como se indica en **Tabla C**;

Tabla C. Volúmenes de reacción

Componentes	Volumen por tubo de ensayo/reacción
Tampón de reconstitución STAT-NAT®	15 µL
ARN extraído o PC o NTC o NC	10 µL
Volumen de reacción final	25 µL

- La mezcla liofilizada se disolverá en pocos segundos;
- Incluya un control negativo (NC) si es necesario;

Instrumento	FAM (SARS-CoV-2)	HEX (Gripe A/B)	TEXAS RED / ROX (RSV A&B)	Cy5 (IC)
Bio-Rad CFX96™DX	Umbral automático	Umbral automático	Umbral automático	Umbral automático
SENTINAT® MICRO	Umbral automático	2,5% Control positivo de fluorescencia	5% de fluorescencia de control positivo	
QuantStudio™ DX	Umbral automático	2,5% Control positivo de fluorescencia	5% de fluorescencia de control positivo	

- Asegúrese de que no hay burbujas de aire; si es así, elimínelas por aspiración con la punta de una pipeta;
- Cierre cada tubo de Master Mix con un tapón específico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Análisis de datos

- El análisis de los resultados se realiza directamente con el software de gestión específico.
- Establezca los valores de los umbrales como se indica en la **Tabla D. Tabla D.** Valores de los umbrales
- La señal **FAM** indica la amplificación exitosa de la secuencia diana del gen CoV-2 N del SARS;
- La señal **HEX/VIC** indica que la amplificación de las secuencias diana FluA&B ha sido exitosa;
- La señal de **Texas Red/ROX** indica la amplificación exitosa de la secuencia objetivo del VRS A&B;
- La señal **Cy5** indica la amplificación exitosa de la **especifica** para el CI.
- En SENTINAT® MICRO se utiliza el método "Dinámico" y el usuario puede "ignorar los cicladores antes de 3" para normalizar las formas de la curva de amplificación.

Validación de la sesión:

Es necesario validar cada ejecución de diagnóstico utilizando:

- a NTC: Tampón de Reconstitución de Control STAT-NAT®;
- STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV Control positivo.

Compruebe las curvas de amplificación de los controles positivos, de los controles negativos y del NTC como se indica en la **Tabla E.**

Tabla E. Interpretación de los resultados de PC, NTC y NC

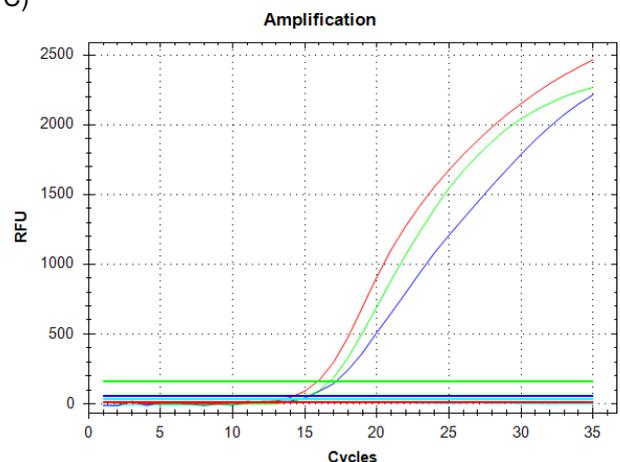
Controlar	Interpretaciones	
	FAM/HEX/VIC/Texas Red/ROX	Resultado
Control positivo	Señal	VÁLIDO
Control positivo	No hay señal	INVÁLIDO
NTC / Controles negativos	No hay señal	VÁLIDO
NTC / Controles negativos	Señal	INVALIDO

La sesión se considerará INVÁLIDA y se repetirá en caso de que el Control Negativo / NTC proporcione un resultado positivo. El ciclo umbral esperado (Ct) del PC es:

- 14 ± 3 para la señal FAM;
- 14 ± 3 para la señal HEX/VIC;
- 14 ± 3 para la señal Texas Red/ROX;

En caso de que el valor de Ct esté fuera del rango, compruebe la sección "solución de problemas".

Figura 2. Ejemplo de parcela de amplificación del control positivo (PC)



Análisis de muestras

- La señal **FAM** indica la amplificación exitosa de la secuencia diana específica del CoV-2 del SARS;
- La señal **HEX/VIC** indica la amplificación exitosa de las secuencias específicas de la gripe A/B;
- La señal de **Texas Red/ROX** indica la amplificación exitosa de las secuencias específicas del VRS;
- La señal **Cy5** indica la amplificación exitosa del Control Interno (CI) endógeno (**ARNasa P humana**). El valor Ct del Control Interno (CI) > 30 ciclos podría indicar un error en la

la dispensación de la muestra o una mala calidad del ARN. Aconsejamos repetir la amplificación y/o la extracción de la muestra.

- Al igual que con otras pruebas, los **resultados negativos** no descartan la infección por SARS- CoV-2 y/o gripe A/B y/o VRS.

Las **tablas F** muestran la validez y la interpretación de las pruebas realizadas.

Cuadro F. Interpretación de los resultados

Canal FAM (SARS-CoV-2)	HEX/VIC Canal (FLU A&B)	Canal Texas Red /ROX (RSV)	Canal Cy5 (IC)	Validez de la prueba	Detección de ARN del SARS-CoV- 2/FluA&B/RSV
+	-	-	+	VÁLIDO	POSITIVO para el SARS-CoV-2
-	+	-	+	VÁLIDO	POSITIVO para la gripe A y B
-	-	+	+	VÁLIDO	POSITIVO para el VRS
-	-	-	+	VÁLIDO	NEGATIVO §
+/-	+/-	+/-	+	VÁLIDO	POSITIVO CON COINFECCIÓN
+/-	+/-	+/-	-	INVÁLIDO	#

§ En las muestras que resulten negativas no se excluye que haya una concentración de ARN de SARS-CoV-2 y/o FLU A&B y/o RSV inferior al límite de sensibilidad del sistema.

Muestras muy concentradas pueden inhibir la amplificación del Control Interno, en este caso se recomienda repetir el paso de extracción utilizando la misma muestra primaria o recoger una nueva muestra primaria y repetir la prueba.

PRESTACIONES⁹Sensibilidad analítica¹⁰

El límite de detección (LoD) se evaluó utilizando un panel de dilución de SARS-CoV-2, Flu A&B y RSV A&B de 5 a 1000 copias/reacción. El LoD se calculó en varias réplicas de muestras, los resultados que muestran un 95% de probabilidad de tener un resultado positivo se resumen en la **Tabla G**.

Tabla G. Límite de detección

Resultados de LoD			
Objetivo	Bio-Rad CFX96TM Dx	QuantStudio™ DX	SENTINAT® MICRO
SARS-CoV-2 (Fam)	5 copias/reacción	10 copias/reacción	10 copias/reacción
Gripe A (Hex)	50 copias/reacción	100 copias/reacción	100 copias/reacción
Gripe B (Hex)	10 copias/reacción	50 copias/reacción	10 copias/reacción
SVA ^R (Texas Red/ROX)	50 copias/reacción	100 copias/reacción	100 copias/reacción
SVB ^R (Texas Red/ROX)	100 copias/reacción	200 copias/reacción	100 copias/reacción

Precisión¹¹

En este estudio, se evaluó la concordancia entre las cantidades medidas obtenidas mediante mediciones repetidas del mismo analito en condiciones específicas (**Tabla H**).

Cuadro H. Estudios de medición de precisión

Criterios de aceptación	Aprobado (sí/no)
CV% < 10%	Sí

Reacciones cruzadas^{9,12}

Para evaluar la reactividad cruzada a varios patógenos, se utilizó un enfoque *in vitro* e *in silico*.

Análisis de reactividad cruzada *in silico*

El análisis de reactividad cruzada *in silico* se realizó utilizando bases de datos en línea para las secuencias genómicas. Se utilizó Nucleotide (ncbi.nih.gov) como fuente de datos genómicos. Se utilizó BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinear las secuencias de los cebadores y las sondas con las secuencias genómicas.

Los resultados se recogen en el **Cuadro I**

Tabla I. Evaluación de la reactividad cruzada *in silico*

Patógeno	Homología ≥ 80%
Coronavirus humano OC43	NO
Coronavirus humano HKU1	NO
Coronavirus humano NL63	NO
SARS-coronavirus	SI ¹
MERS-coronavirus	NO
Metapneumovirus humano	NO
Virus de la Parainfluenza 1-4	NO
Enterovirus	NO
Rinovirus	NO
Chlamydia pneumoniae	NO
Haemophilus influenzae	NO
Legionella pneumophila	NO

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NO
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SI ²
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NO
<i>Bordetella pertussis</i>	NO
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NO
<i>Candida albicans</i>	NO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SI ³
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NO
<i>Streptococcus salivarius</i>	SI ⁴

¹: El coronavirus del SARS Tor2 (NC_004718.3) tiene homología para el cebador inverso (91,67%) y para la sonda (95,65%) de la diana SARS-CoV-2.

² *Streptococcus pneumoniae* (NZ_JAAAQP01000023.1) tienen homología para el cebador forward (95%) de SARS-CoV-2, el cebador reverse y la sonda rev (100%) del objetivo Flu A.

³ *Pseudomonas aeruginosa* (NZ_ATAH01000061.1) tiene homología para el primer forward (86%) de la diana de la gripe B.

⁴ *Streptococcus salivarius* (NZ_PKHZ01000007.1) tiene homología para el cebador inverso (81%) de la diana de la gripe B.

El análisis *in-silico* no mostró ninguna homología significativa en todos los genomas seleccionados, excluyendo los indicados; en estos casos la probabilidad de amplificación de la diana no específica es insignificante, ya que ningún genoma analizado tiene homología para los cebadores y la sonda al mismo tiempo.

Análisis de reactividad cruzada *in vitro*

Laboratorio "húmedo" *in vitro* Se realizan estudios de reactividad cruzada para demostrar que la prueba no reacciona con patógenos relacionados, agentes de enfermedades de alta prevalencia y flora normal o patógena que probablemente se encuentre en la muestra clínica. Los resultados se presentan en la **Tabla J**.

Tabla J. Evaluación de la reactividad cruzada *in vitro*

Organismo	Referencia
Control de ADN de <i>adenovirus</i>	Ref. MBC001 (Vircell S.A.)
Control del ADN de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ref. MBC070 (Vircell S.A.)
<i>Streptococcus pyogenes</i> ADN genómico	Ref. 700294D-5 (ATCC)
Control del ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	Ref. MBC031 (Vircell S.A.)
Control del ARN del Coronavirus MERS	Ref. MBC132 (Vircell S.A.)
Control del ARN del Enterovirus 68	Ref. MBC125 (Vircell S.A.)
Control de ADN de <i>Bordetella Pertussis</i>	Ref. MBC008 (Vircell S.A.)
Control del ADN de <i>Candida Albicans</i>	Ref. MBC010 (Vircell S.A.)
Control del ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Ref. MBC035 (Vircell S.A.)
Control del ADN de <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Ref. MBC011 (Vircell S.A.)
Control del ARN de <i>Parainfluenzae humana</i>	Ref. MBC105 (Vircell S.A.)
Control del ADN de <i>Hemophilus Influenzae</i>	Ref. MBC020 (Vircell S.A.)
Control del ARN del Coronavirus SARS	Ref. MBC136-R (Vircell S.A.)
Control del ARN del Coronavirus OC43	Ref. MBC135-R (Vircell S.A.)

No se ha detectado ninguna señal en estas dianas, lo que asegura la especificidad del ensayo.

Interferencias^{9,12}

Para evaluar las interferencias causadas por sustancias endógenas y exógenas, se han incluido en el estudio soluciones de los siguientes materiales Acetaminofén, 0,2 mg/mL, Cafeína, 0,2 mg/mL, Albúmina, 20 mg/mL, Ácido acetilsalicílico,

0,2 mg/mL, ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), 0,2 mg/mL, etanol, 1%, ácido ascórbico, 20 mg/mL, sangre entera, 1%, ibuprofeno, 10 mg/mL, creatina, 2 mg/mL, ácido úrico, 20 mg/mL, gotas de aerosol nasal, 20%, cloruro de cetilpiridinio, 20 mg/mL.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un efecto de interferencia irrelevante de las moléculas endógenas o exógenas en la sensibilidad analítica del Kit.

EVALUACIÓN CLÍNICA

El rendimiento de STAT-NAT® Pluri CoV-2-FLU-RSV con muestras clínicas de hisopos nasofaríngeos se evaluó en un centro de referencia externo utilizando muestras clínicas individuales remanentes recogidas de pacientes con signos y síntomas de una infección de las vías respiratorias superiores como sigue:

Cuadro K: Acuerdo porcentual positivo y acuerdo porcentual negativo

Analito	Número de muestras	Resultados de las pruebas				Estadísticas de los acuerdos		
		Concordancia positiva (N)	Positivo discordante (N)	Concordante Negativo (N)	Negativo discordante (N)	Parámetro de acuerdo	Porcentaje de acuerdo (%)	95% CI (LCL, UCL)*
Gripe	155	67 ^a	0	88	0	PPA	100	94.6-100
						NPA	100	95.8-100
RSV	155	41 ^b	0	114	0	PPA	100	91.4-100
						NPA	100	96.7-100
SARS-CoV-2	155	49	1	105	0	PPA	98.0	89.5-99.6
						NPA	100	96.5-100

a: incluye tres muestras con coinfección FLU+RSV. Todo se detectó como se esperaba. b: incluye tres muestras con coinfección FLU+RSV. Todo se detectó como se esperaba.

PPA = Acuerdo porcentual positivo, NPA = Acuerdo porcentual negativo IC = intervalo de confianza; LCL = Límite inferior de confianza; UCL = Límite superior de confianza

*El intervalo de confianza se calcula con el método de la puntuación de Wilson

- 32 muestras positivas a la gripe A confirmadas por ensayos moleculares autorizados²
- 35 muestras positivas a la gripe B confirmadas por ensayos moleculares autorizados²
- 41 muestras positivas al VRS confirmadas por ensayos moleculares autorizados³
- 50 muestras positivas al SARS-CoV-2 confirmadas por ensayos moleculares autorizados¹
- 3 muestras también mostraron una infección múltiple (2 muestras positivas para la gripe A y el VRS y 1 para la gripe B y el VRS)²

Las muestras fueron recogidas por personal cualificado según el prospecto del dispositivo de recogida y se almacenaron congeladas a -80°C. Las muestras positivas representan un amplio rango de carga viral e incluyen muestras poco positivas.

El porcentaje de acuerdo positivo y el porcentaje de acuerdo negativo figuran en el **cuadro K**.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS**Problema 1: Señal débil o nula en el Control Positivo:**

1. Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:

- El Control Positivo no se añadió a la reacción. Repita la prueba;
- Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit;
- Compruebe el funcionamiento del termociclador y realizar la calibración del instrumento.

2. Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:

- Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit;
- Compruebe la fecha de caducidad del kit.

3. Selección incorrecta del canal/filtro. Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del inserto del kit:

- Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit.

Problema 2: Señal débil o nula en el Control Interno.

1. Efecto inhibidor de la muestra: ARN con una extracción de baja calidad. El resultado es INVÁLIDO:

- Asegúrese de utilizar un método de extracción de ARN validado y siga cuidadosamente las instrucciones indicadas en el prospecto del kit;
- Repita la prueba utilizando la misma muestra de ARN extraído. Si el resultado sigue siendo negativo, repita el paso de extracción utilizando la misma muestra primaria. De lo contrario, recoja una nueva muestra primaria y repita la prueba.

2. Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:

- Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit;
- Compruebe el funcionamiento del termociclador y realizar la calibración del instrumento.

3. Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:

- Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit;
- Compruebe la fecha de caducidad del kit.

4. Selección incorrecta del canal/filtro. Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del inserto del kit:

- Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit.

Problema 3: Señal FAM, HEX/VIC, Texas Red/ROX en NTC o en Control Negativo.

1. Contaminación durante el procedimiento de preparación de la PCR en tiempo real: todos los resultados son INVÁLIDOS:

- Limpia el banco de trabajo y todo el instrumental;
- Manipule el control positivo con cuidado para evitar la contaminación;
- Repita la PCR en tiempo real utilizando un nuevo conjunto de reactivos.

Problema 4: Variabilidad de la intensidad de la fluorescencia o ausencia de señal FAM, HEX/VIC, Texas Red/ROX, Cy5.

1. Burbujas de aire atrapadas en los tubos de PCR:

- Elimine las burbujas de aire antes de iniciar la ejecución de la PCR en tiempo real.

2. Daño por humedad para la mezcla liofilizada: las condiciones de almacenamiento del reactivo no cumplen con las instrucciones del inserto del kit:

- Compruebe la fecha de caducidad del kit;
- Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit; asegúrese de que la bolsa esté siempre bien cerrada y de que la bolsita desecante siga dentro;

- Compruebe si la bolsa de desecante pasa de color naranja a verde.

3. Efecto inhibidor de la muestra: ARN con una extracción de baja calidad. El resultado podría ser un falso negativo. El resultado es INVÁLIDO:

4. Asegúrese de utilizar un método de extracción de ARN validado y siga cuidadosamente las instrucciones indicadas en el prospecto del kit. La mezcla liofilizada no está bien reconstituida:

- Repita cuidadosamente el procedimiento de PCR en tiempo real.

Problema 5: No hay señal en absoluto.

1. Compruebe el rendimiento del termociclador:

- Realice la calibración del instrumento.

2. Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:

- Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit;
- Compruebe la fecha de caducidad del kit.

Problema 6: Mensaje de error dado por el instrumento de PCR en tiempo real.

Consulte el manual de usuario del instrumento o póngase en contacto con el servicio técnico local.

Problema 7: las muestras duplicadas no reproducen resultados idénticos.

Los valores Ct de muestras idénticas pueden diferir en reacciones individuales. Las variaciones de Ct > ± 2 valores sugieren errores de pipeteo u otras diferencias entre muestras duplicadas.

Problema 8: Ct > 30 en el Control Interno.

Muestra con ARN extraído de baja calidad o errores en la dispensación de la muestra en el montaje de la reacción.

- Repita la prueba utilizando la misma muestra de ARN extraído. Si el resultado del IC Ct sigue siendo > 30, repita el paso de extracción utilizando la misma muestra primaria. De lo contrario, recoja una nueva muestra primaria y repita la prueba.

GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos del kit no están clasificados como peligrosos según el Reglamento CE 1272/2008 (CLP). Adoptar buenas prácticas de trabajo, para que el producto no se libere al medio ambiente. Recuperar si es posible. Al hacerlo, cumplir con la normativa local y nacional vigente.

Gestionar y desechar todas las muestras biológicas como potencialmente infecciosas. Todo el material que entre en contacto con la muestra biológica debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 0,5% durante al menos 30 minutos o esterilizado en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y luego desechado.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). "Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes". Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>.
- 2) Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Centro Nacional de Inmunización y Enfermedades Respiratorias (NCIRD). Subdivisión de Virología, Vigilancia y Diagnóstico. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncird/flu.html>.
- 3) Organización Mundial de la Salud (OMS). Red mundial de vigilancia de la gripe. "Manual para el diagnóstico de laboratorio y la vigilancia virológica de la gripe". Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>; "Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020", WHO, 2020
- 5) Departamento de Trabajo de los Estados Unidos, Administración de Seguridad y Salud Ocupacional 29CFRPart1910.1030. Bloodborne Pathogens. <https://www.osha.gov/lawsregs/regulations/standardnumber/1910/1910.1030>

6) Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Ed. Washington, DC: US Government Printing Office, diciembre de 2009.

7) Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio, 3ª ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2004.

8) CLSI. Protección de los trabajadores de laboratorio contra las infecciones adquiridas en el trabajo; Directriz aprobada - Cuarta edición (M29-A4). Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, 2014.

9) CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. Guía aprobada - Tercera edición. Documento MM03 del CLSI. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, 2015.

10) CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. Documento EP17-A2 del CLSI. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio: 2012.

11) CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition. Documento EP05-A3 del CLSI. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio: 2014.

12) CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline- Second edition. MM06-A2. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio: 2010.

Explicación de los símbolos EN

REACTIVO / CONTROL
Los términos se refieren al: reactivo / control

 Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Número de catálogo	 Código de lote
 Contenido del kit	 Contiene suficiente para <n> pruebas	 Fabricante
 Precaución, consulte los documentos adjuntos Consulte las instrucciones de uso		 Limitación de la temperatura
 No exponer el reactivo a la luz	 No reutilizar	 Uso por

STAT-NAT® es una marca registrada en varias jurisdicciones cuya licencia es exclusiva de SENTINEL CH. SpA. La tecnología STAT-NAT está cubierta por la patente n° WO2010133628 A1.

Nota: los cambios respecto a la versión anterior se indican con una barra vertical en el margen del texto