

KAIRA 2019-NCoV Kit de Detección Diagnóstica

Guía de usuario

Favor de leer toda la información en el folleto antes de usar esta unidad.

Advertencias y precauciones de seguridad

Consulte al Centro de Atención al Cliente de OPTOLANE para obtener una copia de la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS por sus siglas en inglés) para este producto.

Lea la Guía del usuario y verifique la integridad de todos los tubos de ensayo , puntas y otros materiales suministrados con este kit antes de su uso.

Antes, durante y después del uso de este kit como se describe en esta Guía del usuario, todos los materiales potencialmente peligrosos (es decir, materiales que pueden haber entrado en contacto con muestras clínicas), incluidos los tubos, puntas y materiales, deben procesarse y eliminarse de acuerdo con lo que corresponda y sea apropiado a regulaciones de la municipalidad / gobierno en el que se utiliza este producto.

Adherirse a los procedimientos generales de seguridad de laboratorio clínico durante el proceso.

Garantía y responsabilidad

Todos los productos de OPTOLANE se fabrican y prueban bajo estrictos protocolos de control de calidad. OPTOLANE garantiza la calidad de todos los productos fabricados directamente hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta.

Si se descubre algún problema relacionado con un compromiso en la calidad del producto, comuníquese de inmediato con el Centro de Atención al Cliente de OPTOLANE.

OPTOLANE no asume responsabilidad por el mal uso del producto, es decir, el uso del producto para cualquier otro propósito que no sea el previsto, como se describe en la Guía del usuario correspondiente y aplicable.

OPTOLANE asume responsabilidad bajo la condición de que el usuario reporte toda la información relacionada con el problema a OPTOLANE por escrito dentro de los 30 días posteriores a la ocurrencia.

Aviso Legal

Algunas aplicaciones que se pueden realizar con este kit pueden infringir las patentes existentes en ciertos países. La compra de este kit no incluye ni proporciona una licencia para realizar aplicaciones patentadas.

Se puede requerir que los usuarios obtengan una licencia dependiendo del país y la aplicación.

OPTOLANE no aprueba ni recomienda el uso sin licencia de una aplicación patentada.

El uso del kit es solo para usuarios calificados y bien entrenados en el manejo de muestras clínicas y experimentos de biología molecular.

Después de la prueba, todos los desechos deben procesarse con el cumplimiento de la regulación del país.

1. USO PREVISTO

El kit de detección Kaira 2019-nCoV está diseñado para la detección cualitativa del ARN del virus COVID-19 (SARS-CoV-2) en las muestras de pacientes con sospecha de enfermedad respiratoria (esputo, torunda oral, torunda nasal) en entornos in vitro, por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), ayudando al diagnóstico de COVID-19. Solo para uso profesional.

2. INTRODUCCIÓN

El coronavirus (CoV) es una gran familia de virus que causan enfermedades que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves, como el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). 2019-nCoV (o COVID-19) es una nueva cepa que se descubrió en 2019 y no se había identificado previamente en humanos.

Los coronavirus son zoonóticos, lo que significa que se transmiten entre animales y personas.

Investigaciones detalladas encontraron que el SARS-CoV se transmitió de gatos siberianos a humanos.

Varios coronavirus conocidos circulan en animales que aún no han infectado a los humanos.

Hasta la fecha, no hay vacuna ni medicamento antiviral específico para prevenir o tratar 2019-nCoV. El único tratamiento para las personas afectadas es aliviar los síntomas. Por lo tanto, las personas con enfermedad deben ser hospitalizadas. Actualmente, no hay vacunas posibles y se están investigando algunos tratamientos farmacológicos específicos que se están probando mediante ensayos clínicos.

La prueba molecular es una de las formas más efectivas de diagnosticar la presencia de 2019-nCoV en personas que se cree que están infectadas. En particular, los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (rt RT-PCR) son pruebas moleculares que pueden usarse para detectar ARN viral en muestras clínicas.

La recomendación actual de la OMS para la confirmación de laboratorio de la infección 2019-nCoV requiere un resultado positivo de RT-PCR rt para al menos dos objetivos genómicos específicos (gen RdRp y E) y un único objetivo positivo. OPTOLANE Technologies Inc. presenta el kit de detección Kaira 2019-nCoV para diagnosticar 2019-nCoV en muestras humanas a través de la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt RT-PCR).

3. CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La PCR en tiempo real implica la amplificación selectiva de una secuencia objetivo mientras se monitorea el progreso de la amplificación en tiempo real a través de un agente de visualización como un tinte fluorescente. La especificidad es proporcionada por un par de cebadores específicos, junto con una sonda de hidrólisis que también es específica de secuencia. La monitorización del producto amplificado se lleva a cabo marcando la sonda de hidrólisis con un par de tintes fluorescentes (indicador fluorescente 5'-Quencher 3'). Sin embargo, tras la escisión por la actividad exonucleasa 5' - 3' de la ADN polimerasa durante la PCR, la molécula informadora fluorescente emitirá una longitud de onda de luz específica dentro del espectro visible cuando se escinde después de unirse al amplicón.

4. CONTENIDO E INSTRUMENTOS RELACIONADOS

4.1. Contenido del kit



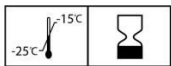
Tabla 1 Contenidos del Kit de detección diagnóstica 2019-nCoV

Reactivo		Unidad	Cantidad
①	Covid 19 mezcla de cebador y sonda	125ul/frasco	2 tubos
②	Mezcla qPCR RT de un paso 2x	625ul/frasco	2 tubos
③	Control Positivo COVID 19	100ul/frasco	1 tubo
④	DEPC DW	200ul/frasco	1 tubo

4.2 Instrumentos relacionados

Este kit está optimizado para su uso con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystem co) o el sistema CFX DX (Bio-Rad Laboratories). Para obtener instrucciones detalladas de funcionamiento de Thermo-Fisher Scientific QuantStudio 5 PCR en tiempo real, sistemas de PCR en tiempo real ABI 7500 o sistema Bio Rad CFX 96 DX, consulte la guía del usuario de los instrumentos.

5. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE VENCIMIENTO



La detección Kaira 2019 nCoV debe almacenarse a -25 C - -15C lejos de los rayos UV / luz solar. El kit está garantizado estable hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta. Se debe evitar la descongelación y la congelación repetidas (más de cuatro veces) de los componentes, ya que esto puede reducir el rendimiento del ensayo.

6. MATERIALES Y EQUIPO REQUERIDOS (NO SUMINISTRADOS EN EL KIT)

- Guantes desechables sin talco
- Juego de pipetas de volumen apropiado
- Puntas de pipeta esterilizadas con filtros
- Microtubos de 1.5 ml o tubos de PCR de 0.2 ml
- Protocolo equivalente y materiales necesarios para extraer ácido nucleico
- Sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Thermo-Fisher Scientific), sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems co.) o sistema CFX96 Dx (Laboratorios Bio-Rad)

7. PRECAUCIONES GENERALES



- PCR en tiempo real a través de este kit debe realizarse utilizando el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5, el sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 o el sistema CFX96 Dx.

- Siempre use guantes y una máscara al manipular muestras y reactivos del kit.
- NO mezcle reactivos de diferentes lotes de producción.
- NO use un kit después de su fecha de vencimiento.
- Este kit es para usar solo con muestras de intercambio nasofaríngeo humano, intercambio orofaríngeo o esputo. Este kit no está diseñado para usarse con otros tipos de muestras. - Evite la contaminación microbiana de los componentes del kit al preparar las muestras.
- Lea esta Guía del usuario antes de usar.
- NO cambie el protocolo como se describe en esta Guía del usuario.
- Utilice siempre puntas de pipeta estériles y filtradas.
- Las muestras clínicas y sus derivados deben almacenarse en un lugar / congelador separado de donde se almacenan el resto de los componentes del kit.
- Agite brevemente y agite todos los componentes del kit después de descongelarlos para garantizar resultados óptimos

8. PROTOCOLO

8.1. Preparación

Recomendamos que se tomen varias medidas de precaución para la seguridad del usuario y el laboratorio y para la prevención de la contaminación ambiental del laboratorio.

8.1.1 Uso adecuado de un gabinete de bioseguridad

Al manipular muestras clínicas, todos los trabajos relacionados (es decir, decapitación, pipeteo, tapado de muestras clínicas y recipientes) deben realizarse dentro de un gabinete de bioseguridad de presión negativa (Clase III). El gabinete de bioseguridad de presión negativa envía aire desde el espacio del laboratorio exterior. En otras palabras, el aire fluye hacia adentro. Este flujo de aire evita que sustancias peligrosas contaminen el entorno del laboratorio. El gabinete de bioseguridad de presión positiva es un espacio de trabajo donde el aire filtrado fluye hacia afuera, manteniendo así un ambiente limpio dentro del espacio de trabajo.

8.2. Muestra



Todas las muestras deben tratarse como posibles riesgos biológicos. Para obtener los mejores resultados, recomendamos el ARN extraído del intercambio nasofaríngeo, el intercambio orofaríngeo o el esputo (sin embargo, no se recomienda la inducción de esputo).

8.2.1 Colección de muestras

El kit de detección Kaira 2019-nCoV está optimizado para el ARN extraído del intercambio nasofaríngeo u orofaríngeo muestras de intercambio o esputo. Todas las muestras deben mantenerse en contenedores sin conservantes

8.2.2 Transporte de muestras

Todas las muestras deben transportarse en un contenedor de transporte inastillable para evitar posibles infecciones por fugas de muestras. Las muestras deben transportarse de acuerdo con las pautas locales / nacionales con respecto al transporte de riesgo biológico.

8.2.3 Almacenamiento de muestras

El intercambio nasofaríngeo, el intercambio orofaríngeo o el esputo aislados se pueden almacenar hasta 7 días a 2 ~ 8 °C. Para un largo período de almacenamiento, las muestras deben almacenarse a -20 °C ~ -80 °C en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación / descongelación.

8.2.4 Sustancias interferentes

La heparina ($\geq 10 \text{ UI} / \text{mL}$) es un inhibidor conocido de PCR. Muestras que han sido recolectadas en

tubos que contienen heparina no debe usarse. Además, no se deben usar muestras de pacientes tratados con heparina. Las muestras clínicas pueden contener sustancias que interfieren con la PCR. Para una PCR eficiente, dichos inhibidores deben eliminarse durante el proceso de extracción y purificación de ARN. Los productos de descomposición del hemo, como la bilirrubina, así como las sales biliares también pueden inhibir la PCR en muestras clínicas (Kreader, 1996). El EDTA se encuentra en varios tampones de elución de los kits de purificación para la preservación del ADN, pero a ciertas concentraciones, puede agotar los iones de magnesio y, por lo tanto, inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Schrader et al., 2012) La hemoglobina es uno de los principales inhibidores de PCR donde afecta la amplificación a través de un efecto directo sobre la actividad de la ADN polimerasa y apaga la fluorescencia de las moléculas de colorante libre, y esta última se une al ADN genómico monocatenario, lo que dificulta la polimerización del ADN en los primeros ciclos de PCR (Sidstedt et al.2018). Según la recomendación en pruebas de interferencia en química clínica; en la directriz EP7-A2 aprobada, las sustancias de interferencia potencial se probaron con concentraciones indicadas (tabla 2).

Tabla 2 Posibles sustancias interferentes y concentraciones utilizadas para la prueba.

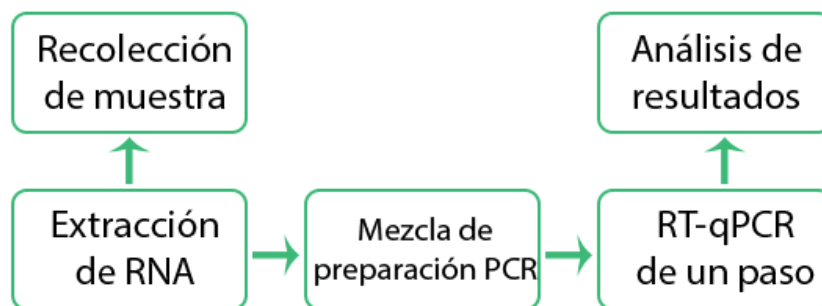
Número	Sustancia con potencial de interferencia	Concentración usada
1	Albúmina	5g/dl
2	Bilirrubina	342 mmol
3	EDTA	3.4mol/l
4	Hemoglobina	2g/L
5	Heparina	3,000U/L

8.3. Procedimiento

El kit de detección Kaira 2019-nCoV está diseñado para usarse con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5, el sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 o el sistema CFX96 DX.

8.3 Diagrama de flujo

Figura 2. Ejemplo de diagrama de flujo para detección de nCoV 2019



El kit de detección Kaira 2019-nCoV está diseñado para usarse con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5, el sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 o el sistema CFX96 Dx. El flujo de trabajo esquemático se muestra en la figura 2.

8.3.2 Extracción de ácido nucleico

Este kit de detección Kaira 2019-nCoV se utiliza en kits comerciales de preparación de ARN, se recomienda que el kit de preparación de ARN sea indicado en la tabla 3. Prepare el ARN total de las muestras de pacientes consultando el manual de instrucciones del kit que desea usar.

Tabla 3. Lista de kits de extracción de ARN en el mercado.

Espécimen	Nombre del Kit	Fabricante	Número de catálogo
Intercambio nasofaríngeo, orofaríngeo o muestra de esputo	QIAamp Viral RNA mini kit	Qiagen	52904/52906
	MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit	Applied biosystems	AM1939

8.3.3 Preparación de PCR

- 1) El número apropiado de controles y ácidos nucleicos extraídos debe descongelarse durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente si se congela. La mezcla maestra de PCR 2x y la mezcla de cebador y sonda deben prepararse antes de la prueba. Se necesitan 2 reacciones adicionales para los controles experimentales (NTC y PC). El kit de detección Kaira 2019 nCoV utiliza kits comerciales de preparación de ARN. En la tabla 4 se indican ejemplos de kits comercialmente disponibles utilizados para el kit de detección Kaira 2019 nCoV. Prepare el ARN

total a partir de muestras de pacientes de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes de los kits.

- 2) Agite durante más de 10 segundos y baje todos los reactivos, controles y muestras antes de usar.

- 3) Haga una premezcla de PCR. Para conocer los componentes detallados de la premezcla, consulte la tabla 4. Haga la mezcla durante al menos dos reacciones más para compensar alguna pérdida. Agite y agite la mezcla durante más de 10 segundos antes de usarla.

Tabla 4. Componentes y volúmenes de mezcla de reacción

Componente	Volumen (µl)
Mezcla qPCR RT de un paso 2x	12.5
Covid 19 mezcla de cebador y sonda	2.5
Espécimen RNA	10
Agua libre de nucleasa	0
Volumen de reacción total	25

- 4) Agregue 12.5 mcl de una mezcla rt qPCR de un paso a cada tubo de PCR
- 5) Agregue 10 mcl de DEPC DW en el tubo asignado para NTC. Selle el tubo con tapas para evitar la contaminación.
- 6) Mueva los tubos a una ubicación separada antes de proceder para evitar la contaminación. Agregue 10 mcl de pc al tubo asignado para pc
- 7) Agregue 10 mcl de ácido nucleico extraído de muestras clínicas a los tubos asignados
- 8) Sellar los tubos completamente
Nota: Selle los tubos de manera correcta para evitar resultados inválidos o contaminación de la muestra
- 9) Agitar por 5 segundos y centrifugar a 1500 rpm por 2 minutos.
- 10) Coloque los tubos en el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5, ABI 7500 de CFX 96 DX y ejecute PCR inmediatamente

8.3.4 RT-qPCR de un paso configuración

Tabla 5. Condiciones de PCR para el kit de detección 2019-nCoV.

PASO	Temperatura	Tiempo de ejecución	Número de ciclos
Transcripción reversa	50°C	10 minutos	1 ciclo
Pre Desnaturalización	95°C	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	10 segundos	45 ciclos
Recocido y extensión	60°C	30 segundos	
FIN			

* Este paso escaneó la señal fluorescente.

8.4. Análisis de datos

8.4.1 Valor de corte de Ct para positivo

La prueba utiliza 2 pocillos de cada CI y PC para determinar la validez del experimento, y cada reacción incluye PCRC en pocillos de muestras, así como CI y PC para verificar la validez de PCR. Los criterios de interpretación de los resultados de la PCR están en la tabla.

Tabla 6. Interpretación de resultados

Tipo	Resultado de Objetivos		Resultado PCRC (Cy5)[1]	Resultados
	2019-nCoV			
	RdRP(FAM)	E (HEX)		
Control Positivo (PC)	+	+	+	Válido
Control Interno de Amplificación (CI)	-	-	+	Válido
Caso de Muestra 1	+	+	+/- [2]	2019-nCoV Positivo
Caso de Muestra 2	+	-	+/- [2]	2019-nCoV Positivo
Caso de Muestra 2	-	+	+/- [2]	2019-nCoV Negativo
Caso de muestra 3	-	-	+	
Caso de muestra 4	-	-	-	Inválido

CI: para determinar si la muestra está contaminada en el proceso de pretratamiento de la muestra, extracción de ácido nucleico y preparación de PCR (prevenir errores falsos positivos)

PC: para determinar si el ADN plasmídico objetivo se amplifica adecuadamente (evitar errores falsos negativos)

PCRC: para verificar si la muestra inhibe la PCR y determinar la amplificación de los ácidos nucleicos en cada pocillo. Las altas concentraciones de ARN objetivo pueden conducir a una señal de fluorescencia de PCRC reducida o ausente debido a la competencia de PCR.

La validez de PCRC está determinada por el valor de Ct de la señal PCRC. Si su valor de Ct está dentro del rango especificado, es válido. Si el valor de Ct está fuera del rango especificado, no es válido. La validez de PC y CI está determinada por el valor de Ct de la señal objetivo. Si el ensayo es válido, el Ct objetivo estará "indeterminado" en el pozo CI y el valor de Ct del PC estará dentro de su rango especificado. Si los resultados del control no son válidos, tome medidas de acuerdo con la Guía del usuario 9. Solución de problemas.

El resultado de PCRC determina la validez de la prueba, y el valor Ct de la señal objetivo determina si el objetivo está "Detectado" o "No detectado".

Valor de corte: para clasificar los resultados como positivos o negativos. El valor de corte se determina utilizando técnicas estadísticas, análisis de probabilidad. El bajo valor del intervalo de confianza (IC) del límite de detección (LoD) se convierte en el valor de Ct derivado de la

prueba de LoD. El valor de corte de Ct determina los resultados de detección de ARN objetivo como positivos con un 97,5% de probabilidad

[1] Los resultados de detección de PCRC no son necesarios para determinar 2019-nCoV positivo o negativo. En caso de una gran carga viral de muestra positiva, la señal de fluorescencia de PCRC podría ser menor por la competencia de reacción de PCR. [2] Cuando los números de copias del gen RdRP o E en las muestras clínicas son extremadamente altos, a veces la curva amplificada de PCRC puede ser muy baja o no aparecer. En este caso, el resultado se considera positivo para 2019-nCoV. [3] La validez de PCRC está determinada por el Ct (umbral de ciclo) de la señal de PCRC (colorante Cy5) definido por el fabricante. Cuando PCRC es válido, la validez de NTC o PC está determinada por el Ct de la señal objetivo definida por el fabricante.

Los criterios para el corte del kit de detección Kira 2019-nCoV se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Tabla de corte del kit de detección Kaira 2019-nCoV

Analito	Fluoróforo	Valor Ct de corte para positivo
2019-nCoV RdRP	FAM	Ct ≤ 37.5
2019-nCoV E gene	HEX(VIC)	Ct ≤ 36.0
PCRC	Cy5	25 < Ct < 35

9. Solución de problemas

Comentarios y sugerencias

Resultados inválidos del control de PCR (PCRC)	
Si la señal de fluorescencia Cy 5 (PCRC) no se detectó en todos los pocillos (incluidos los controles).	<ul style="list-style-type: none">● Error de extracción y / o configuración de PCR<ul style="list-style-type: none">☞ Extracción de ARN del protocolo de fabricación. Repita el ensayo, si es necesario. Consulte la Guía de usuario 8. PROTOCOLO● Extracción incorrecta o uso del kit de PCR<ul style="list-style-type: none">☞ Asegúrese de utilizar los kits adecuados para las pruebas previstas.● El kit puede haberse estropeado debido a un mal almacenamiento o vencimiento.<ul style="list-style-type: none">☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. <p>Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario. Consulte la Guía del usuario 5. FECHA DE ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO</p>
Si la señal de fluorescencia Cy 5 (PCRC) no se detectó en pozos particulares.	<ul style="list-style-type: none">● Inhibición de PCR<ul style="list-style-type: none">☞ Las muestras clínicas pueden contener una variedad de inhibidores de PCR. Repita el ensayo del proceso de pretratamiento de la muestra que puede reducir la inhibición de la PCR.☞ Asegúrese de utilizar el método de pretratamiento de muestra validado de acuerdo con el tipo de muestra.● Bajo volumen de elución debido al material insoluble de las muestras.<ul style="list-style-type: none">☞ El rendimiento del ácido nucleico puede verse afectado por las condiciones de la muestra (viscosidad, etc.). Repita el ensayo desde el pretratamiento de la muestra lo cual pudiera hacer la muestra más soluble
Si la pendiente de PCRC es baja o no aparece cuando el número de copias positivas es relativamente alto (por	<ul style="list-style-type: none">● Este es un fenómeno común para todos los ensayos cuando la concentración de la plantilla objetivo es demasiado alta. En este caso, los recursos para PCR se agotan y, por lo tanto, la reacción del control de PCR puede ser débil.<ul style="list-style-type: none">☞ Independientemente de la presencia de PCRC, cuando el valor de Ct del objetivo es inferior a 25 ($Ct < 25$), el resultado es positivo.

ejemplo, Ct <25)	
Resultados inválidos del control de positivo (PC)	
<p>Si la señal de fluorescencia FAM / HEX (PC) era indeterminada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● El kit puede haberse estropeado debido a un mal almacenamiento o vencimiento. ☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario. Consulte la Guía del usuario 5. FECHA DE ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO ● Reutilización de reactivos. ☞ Asegúrese de no reutilizar los reactivos. La reutilización o los ciclos repetidos de congelación / descongelación de reactivos pueden afectar la calidad del kit y los resultados del ensayo de manera concluyente. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario. Consulte la Guía del usuario 5. FECHA DE ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO, 7. Precauciones generales <ul style="list-style-type: none"> ● Error de protocolo de PCR ☞ Revise su procedimiento de preparación de reacción. Confirme la cantidad de PC utilizada en un solo pozo. Consulte la Guía del usuario 8.3.3 Preparación de PCR <ul style="list-style-type: none"> ● Puede haber habido un error de pipeteo. ☞ Revise la técnica de pipeteo y la calibración.
Resultados Inválidos del Control Interno de Ampliación	
<p>Si se detectó la señal de fluorescencia FAM / HEX (PC) en el pozo CI.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Puede haber ocurrido contaminación. ☞ Asegúrese de que el espacio de trabajo y los instrumentos estén descontaminados y repita el ensayo. ● El kit puede haberse estropeado debido a un mal almacenamiento o vencimiento. ☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario. Consulte la Guía del usuario 5. FECHA DE ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO <ul style="list-style-type: none"> ● Error de protocolo de PCR ☞ Revise su procedimiento de preparación de reacción. Confirme si los controles y las muestras se cargan en los pozos adecuados que se asignan mediante el protocolo S / W (especialmente los pozos CI). Consulte la Guía del usuario 8.3.3 Preparación de PCR . <ul style="list-style-type: none"> ● Puede haber habido un error de pipeteo. ☞ Revise la técnica de pipeteo y la calibración.

10. Análisis de rendimiento

10.1. Sensibilidad analítica (Límite de detección (LoD))

10.1.1 Protocolo

Para generar la transcripción de ARN de ARN 2019-nCoV, se realizó un plásmido de transcripción (pBIC-A con secuencia nCoV 2019) que tiene un promotor T7 con secuencias COVID-19. Mediante el uso de ARN polimerasa T7, se generaron plantillas de ARN específicas de COVID-19. Después de transcribir la plantilla de ARN, se midió la concentración de ARN con Bioanalizador (Agilent Technologies). El cálculo del número de copias de ARN se realizó utilizando NeBioCalculator (New England Biolabs, MA, EE. UU.).

Iniciar la concentración de ARN utilizada

- gen E = 1.12×10^9 copias / ul
- RdRP = 1.08×10^9 copias / ul

Prueba de rango de detección

- gen E = $1.12 \times 10^5 \sim 1.12 \times 10^{-1}$ copias / ul
- RdRP = $1.08 \times 10^5 \sim 1.08 \times 10^{-1}$ copias / ul

Marcador		Criterio
Decisión del resultado	Objetivo: Valor de Ct	1 ~ 45 Ct
		No detectado (ND)
	PCR: Debe ser detectada en todas las muestras tomadas.	25 ~ 35 Ct
Validez de la prueba	Linealidad (Coeficiente de determinación, R ²)	≥ 0.90

10.1.2 Resultados de sensibilidad (rango de medidas)

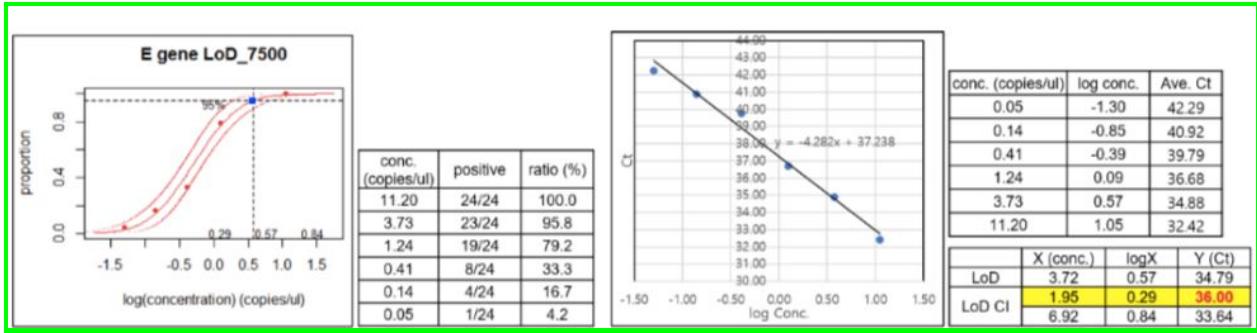
Tabla 8. Rangos de medición por instrumentos.

E gene				RdRp			
Conc. (copy/ul)	7500	QS5	CFX96	Conc. (copy/ul)	7500	QS5	CFX96
1.12x10 ⁵	18.85	18.54	18.12	1.08x10 ⁵	20.40	20.83	20.57
	18.84	18.50	18.11		20.32	20.88	20.64
	18.87	18.60	18.10		20.45	20.78	20.68
1.12x10 ⁴	22.25	22.36	21.72	1.08x10 ⁴	24.30	25.02	24.51
	22.17	22.20	21.73		24.24	24.99	24.50
	22.17	22.35	21.70		24.00	24.95	24.52
1.12x10 ³	25.77	25.68	25.19	1.08x10 ³	27.91	28.29	27.90
	25.72	25.66	25.25		27.89	28.24	27.94

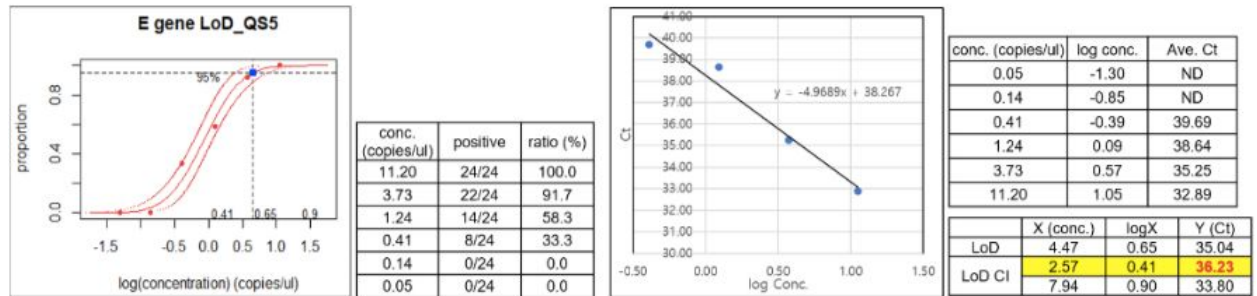
	25.72	25.59	25.18		27.80	28.15	27.88
1.12x10 ²	29.17	29.08	28.84	1.08x10 ²	31.52	31.90	31.60
	29.10	29.05	28.94		31.38	31.90	31.54
	29.11	29.08	28.84		31.10	31.87	31.61
1.12x10 ¹	31.80	32.59	32.19	1.08x10 ¹	34.97	35.33	35.44
	31.98	32.60	32.24		34.88	35.31	35.61
	31.70	32.62	32.08		34.44	35.15	35.34
1.12x10 ⁰	35.06	36.89	36.01	1.08x10 ⁰	38.28	38.94	38.56
	ND	37.04	36.38		ND	40.06	ND
	35.34	ND	ND		ND	ND	39.07
1.12x10 ⁻¹	ND	ND	ND	1.08x10 ⁻¹	ND	ND	ND
	ND	ND	ND		ND	ND	ND
	ND	ND	ND		ND	ND	ND
Linearity (R²)	0.9987	0.9923	0.9995	Linearity (R²)	0.9977	0.9997	0.9986

Los rangos de medición para los tres instrumentos estuvieron dentro de 1.12x10⁵ ~ 1.12x10⁰ copias / ul para el gen E y 1.08x10⁵ ~ 1.08x10⁰ copias / ul para RdRp (R²: 0.9923 ~ 0.9997). La concentración más baja se seleccionó como 1,12x10¹ copias / ul (gen E) y 1,08x10¹ copias / ul (RdRp). Con la concentración más baja como punto de partida, se determinó el límite de detección (LoD) para el kit de detección 2019-nCoV.

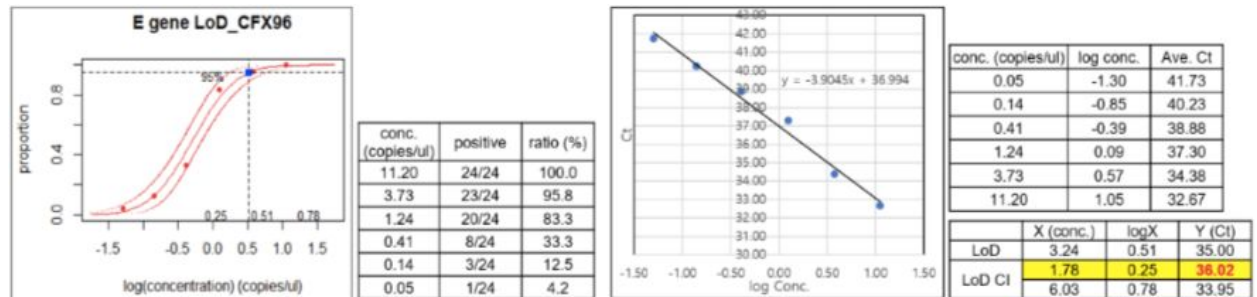
Para verificar la LOD, se seleccionaron 6 puntos de concentración diferentes cerca de la concentración más baja y se prepararon por dilución 1/3 de la concentración inicial seleccionada. Se realizaron 24 réplicas de prueba por cada punto. Los resultados se analizaron mediante análisis probit utilizando el software RStudio (versión 1.2.5033). Según el resultado, se seleccionó el valor de corte



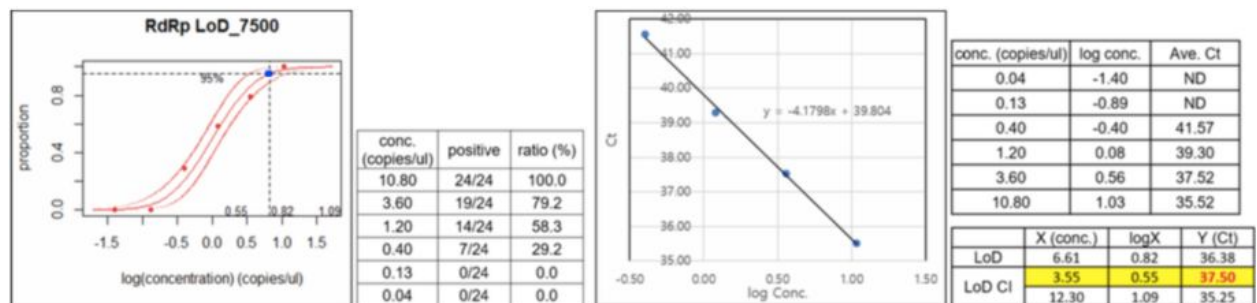
Para ABI 7500, LOD (IC 95%) del gen E es 100.57 (100.29 ~ 100.84) copias / ul (= 3.72 (1.95 ~ 6.92) copias / ul). El valor de corte de Ct basado en el resultado LOD es 36.00.



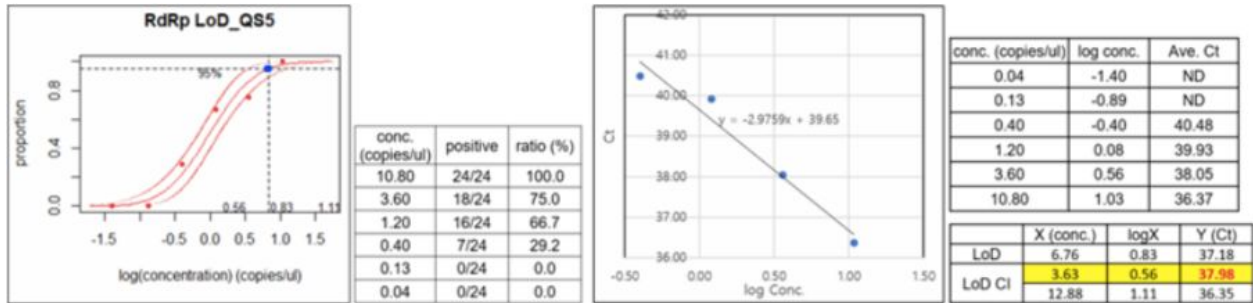
Para ABI QS5, LOD (IC 95%) del gen E es 100.65 (100.41 ~ 100.90) copias / ul (= 4.47 (2.57 ~ 7.94) copias / ul). El valor de corte de Ct basado en el resultado LOD es 36.23



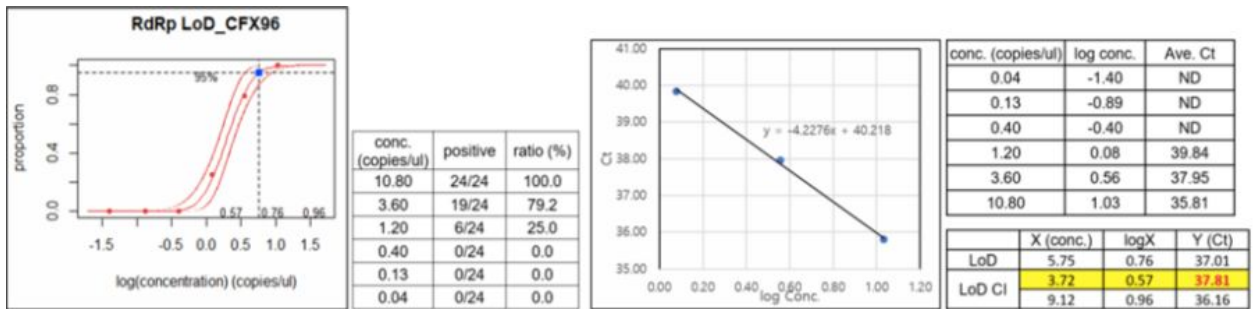
Para Bio-Rad CFX96, LOD (IC 95%) del gen E es 100.51 (100.25 ~ 100.78) copias / ul (= 3.24 (1.78 ~ 6.03). El valor de corte de Ct basado en el resultado LOD es 36.02.



Para ABI 7500, LOD (IC 95%) de RdRP es 100.82 (100.55 ~ 101.09) copias / ul (= 6.61 (3.55 ~ 12.30) copias / ul). El valor de corte de Ct basado en el resultado LOD es 37.50.



Para ABI QS5, LOD (IC 95%) de RdRP es 100.83 (100.56 ~ 101.11) copias / ul (= 6.76 (3.63 ~ 12.88) copias / ul). El valor de corte de Ct basado en el resultado LOD es 37.98.



Para Bio-Rad CFX96, LOD (IC 95%) de RdRP es 100.76 (100.57 ~ 100.96) copias / ul (= 5.75 (3.72 ~ 9.12) copias / ul). El valor de corte de Ct basado en el resultado de LOD es 37.81.

10.1.3 Conclusión

Para determinar la sensibilidad del kit de detección Kaira 2019-nCoV, se probaron tres instrumentos diferentes (Applied Biosystems 7500, QS5 y BIO-RAD CFX96). La LOD de cada instrumento se mostró en la tabla 10. Tomados en conjunto, los valores de corte se seleccionaron como 36.00Ct para el gen E y 37.65 Ct para RdRP.

Tabla 10. LoD y Valor de Corte para los 3 instrumentos

Instrumento	ABI 7500		ABI QS5		BIO-RAD CFX 96	
Objetivo	LoD (95% IC)	Valor de corte	LoD (95% IC)	Valor de Corte	LoD (95% IC)	Valor de Corte

E Gen	3.72 copias/ul (1.95 – 6.92)	36.00	4.47 copias/ul (2.57 – 7.94)	36.23	3.24 copias/ul (1.78 – 6.03)	36.02
RdRP	6.61 copias/ul (3.55 – 12.30)	37.50	6.75 copias/ul (3.63 – 12.88)	37.98	5.75 copias/ul (3.72 – 9.12)	37.81

10.2 Prueba de especificidad (reactividad cruzada)

Para la reactividad cruzada, se analizó un total de 11 especies de bacterias y virus ARN total para determinar la reactividad cruzada potencial en el uso del kit de detección Kaira 2019-nCoV. Se ejecutaron tres réplicas de cada ARN para la evaluación. No se observó interferencia para los microorganismos enumerados en la Tabla 11.

Número	Patógenos	Conc. (cp/ul)	Kaira COVID-19 Kit de detección		
			RdRP	E-Gen	Valor de Corte
1	Corona 229E	4.44x10 ⁵			
2	Inf A H1N1	1-54x10 ⁵	ND	ND	ND
3	Inf A H3N2	4.4x10 ⁵	ND	ND	ND
4	Inf B	1.03x10 ⁵	ND	ND	ND
5	EAEC	10,000	ND	ND	ND
6	EEE	12,500	ND	ND	ND
7	KPN	10,000	ND	ND	ND
8	OTS	10,000	ND	ND	ND
9	STLEV	12,500	ND	ND	ND
10	TRA	10,000	ND	ND	ND
11	WEEV	12,500	ND	ND	ND

* Corona 229E: CoronaVirus humano 229E, Inf A H1N1: Virus de la Influenza subtipo A subtipo H1N1, Inf A H3N2: Virus de la influenza A subtipo H3N2, Inf B: Virus de la Influenza B, EAEC: E. Coli entero-agregativa, EEE: Encefalitis equina oriental; KPN: Klebsiela pneumoniae; OTS: Orientia tsutsugamushi; STLEV: ST virus encefalitis Louis; TRA: trypanosoma rangeli; WEEV: Virus de encefalitis equina occidental.

10.3 Especificidad (Sustancias Interferentes)

Se realizó una prueba de interferencia para determinar si las posibles sustancias interferentes afectarían los resultados del ensayo de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV. Las sustancias que potencialmente interfieren con 2019-nCoV se incrementaron con niveles altos, medios, bajos y negativos y se midieron los cambios de Ct. Se probaron tres réplicas para cada sustancia. No se observó interferencia para las sustancias enumeradas en la Tabla 2

10.4 Precisión (Reproducibilidad)

La precisión se evaluó mediante el uso de 3 lotes de reactivos Kaira 2019-nCoV. Las pruebas se realizaron con 3 concentraciones diferentes de COVID-19, 9 repeticiones por corrida, 2 corridas al día durante 3 días consecutivos para 2 genes (E-gen y RdRP) con 3 instrumentos diferentes. Cada ejecución fue realizada por un operador independiente. Se realizaron un total de 1458 pruebas.

Los resultados indicaron que la SD era inferior a 1 con un valor de% CV inferior al 5%, que es la reproducibilidad del kit de detección Kaira 2019-nCoV era alta.

10.5 Precisión (Repetibilidad)

Para acceder a la precisión (repetibilidad) del kit de detección Kaira 2019-nCoV, un operador probó la repetibilidad durante el período indicado utilizando tres instrumentos. Se pudo acceder a la repetibilidad utilizando 4 concentraciones diferentes (negativo, bajo, medio, alto positivo) de transcripciones de ARN de 2019-nCoV. La prueba fue realizada por un operador utilizando 3 lotes con 9 repeticiones por corrida, 2 corridas al día durante 3 días para 3 instrumentos. Los resultados mostraron que el kit de detección Kaira 2019-nCoV era altamente repetible con un valor SD de menos de 1 y un CV% de menos del 5%.

10.6 Pruebas de estabilidad (Acelerado)

Se evaluó la estabilidad periódica para garantizar la calidad del kit de detección Kaira 2019-nCoV (acelerado / periodo prolongado). La prueba acelerada se realizó por duplicado utilizando 3 lotes diferentes durante 1, 2 y 4 días con el producto almacenado a 25 ° C. Según los resultados de la prueba de aceleración, asignamos 12 meses para la expiración del Kit de detección Kaira 2019-nCoV cuando se almacena a -20 ± 5 °C.

10.7 Evaluación clínica

De la muestra clínica, el total de 63 muestras clínicas se analizaron con el kit de detección Kaira 2019-nCoV. Se incluyeron 28 muestras de casos COVID-19 y 30 muestras negativas de individuos sintomáticos en el conjunto de muestras. Los resultados de las pruebas individuales de imprimación y mezcla de sondas se comparan con este producto de referencia en la tabla a continuación.

Categoría de espécimen	Probados	Kaira 2019-nCov Kit de detección	
		RdRp Positivo	E-Gen Positivo
2019-nCoV Positivo	28	28/28	28/28
2019-nCoV Negativo	30	0/30	0/30
Acuerdo de porcentaje positivo	100% (28/28) 95% IC: 87.94%-100%		
Acuerdo de porcentaje negativo	100% (0/30) 95% IC: 88.65%-100%		
100% (58/58) 95% IC: 100%			

11. Referencias

Munster,, VJ et al.. A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment.. N Engl J Med 2020;; 382::6692 - 694.

Mackay IM.. (22004) Real - time PCR in the microbiology laboratory.. Clin.. Microbiol.. Infect.. 10::1190 - 212

CLSI.. Interference Testing in Clinical Chemistry;; Approved Guideline - Second Edition.. CLSI document EP7 - A2.

CLSI.. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods;; Approved Guideline – Second Edition.. CLSI document EP5 - A2.

NCCLS.. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures:: A Statistical Approach;; Approved Gui deline.. NCCLS document EP6 - A.

NCCLS.. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases;; Approved Guideline.. NCCLS document MM6 - A.

NCCLS.. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation;; Approved Guideline.. NCCLS document EP17 - A.

