

EURORealTime SARS-CoV-2

Manual de instrucciones

Diagnóstico in vitro IVD

REFERENCIA	PARÁMETRO	FORMATO
MP 2606-0125	SARS-CoV-2	25 reacciones
MP 2606-0225		50 reacciones
MP 2606-0425		100 reacciones
MP 2606-0100		100 reacciones
MP 2606-0200		200 reacciones
MP 2606-1000		1000 reacciones



Índice de contenido

Uso previsto.....	2
Significación clínica	2
Principios del ensayo.....	3
Materiales incluidos en este equipo	3
Materiales <u>del equipo de ensayo</u> que pueden pedirse por separado.....	3
Otros materiales y equipos necesarios (que no contiene el equipo de ensayo)	3
Almacenamiento y duración	5
Conservación una vez abierto	5
Advertencias y medidas de precaución.....	5
Indicaciones sobre la realización del ensayo y la seguridad	6
Preparación y estabilidad de las muestras.....	6
Preparación de los reactivos	7
Eliminación	7
Control de calidad.....	7
Realización del ensayo.....	8
Instrucciones de trabajo detalladas	9
Controles.....	9
Preparación de la serie	9
Creación de una serie en el software EURORealTime Analysis	11
Realización de la RCP en tiempo real	11
Preparaciones para la evaluación utilizando el software EURORealTime Analysis	14
Evaluación del ensayo.....	15
Características de rendimiento clínicas.....	20
Limitaciones del procedimiento	21
Literatura	22
Ayuda técnica.....	23
Explicación de los símbolos	23



Uso previsto

El presente ensayo sirve para la detección in vitro diagnóstica molecular cualitativa de ARN de coronavirus SARS-CoV-2 de frotis faríngeos y saliva para apoyar el diagnóstico de una infección por SARS-CoV-2. El producto está concebido para ser utilizado como **IVD** y para la aplicación exclusiva por parte de personal de laboratorio cualificado. El procesamiento se realiza manualmente.

Significación clínica

El *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2* (SARS-CoV-2, anteriormente 2019-nCoV) pertenece a la familia de los coronavirus y se clasifica como SARS-CoV en el género *Betacoronavirus* [1]. A finales de 2019 se identificó al SARS-CoV-2 como el patógeno causante de la frecuente neumonía de causa incierta. El virus desencadenó una oleada de infecciones que se propagó por todo el mundo rápidamente y, a principios de 2020, la OMS declaró la pandemia [2-5].

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente por gotitas infectadas al toser y estornudar y a través del contacto directo con personas infectadas [3-4, 6]. El personal sanitario y los miembros de la familia están especialmente expuestos al riesgo de infección [6]. El reservorio zoonótico del virus parecen ser los murciélagos [3, 4, 6].

El tiempo de incubación del SARS-CoV-2 es de 3 a 7, máximo 14 días [2]. Los síntomas de una neumonía por SARS-CoV-2 son fiebre, tos, dificultades para respirar, agotamiento y pérdida del sentido del gusto y del olfato [2-4, 6, 7]. En la mayoría de pacientes, la infección se manifiesta con síntomas de enfermedad con fiebre leve e infiltraciones pulmonares irregulares; sin embargo, una parte de los pacientes, sobre todo personas mayores y enfermos crónicos, desarrollan un síndrome de dificultad respiratoria aguda (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) [2, 3, 5, 6]. La enfermedad, causada por el SARS-CoV-2, fue denominada «COVID-19» en febrero de 2020 por la OMS.

Para diagnosticar una infección por SARS-CoV-2, los procedimientos más adecuados son la detección de ARN viral mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, RCP-TI (RT-PCR) o de proteína del virus en el ELISA o un test rápido, principalmente de materiales de muestra de las vías respiratorias superiores (frotis nasofaríngeo y orofaríngeo) y de las vías respiratorias inferiores (lavado broncoalveolar, secreciones traqueales, esputo, etc.) [4, 5]. La detección de los antígenos víricos es menos sensible que el ensayo RCP-TI (RT-PCR).

La determinación de anticuerpos permite la confirmación de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas típicos y en casos sospechosos y contribuye a la supervisión y al control del brote [4, 5]. La proteína S (spike protein) y la proteína nucleocápside(N) del SARS-CoV-2 son altamente inmunogénicas. Más del 90% de los anticuerpos neutralizantes en los pacientes de COVID-19 están dirigidos contra dominios de unión de los receptores (RBD) de la proteína S. La proteína S es la proteína diana de casi todas las vacunas contra el COVID-19 [8].

Aproximadamente el 90% de los infectados por SARS-CoV-2 desarrollan anticuerpos específicos hasta el día 10 tras el inicio de los síntomas. Los IgG, IgA y IgM contra la proteína S aparecen con frecuencia de forma simultánea [8]. Para obtener resultados serológicos significativos, deben analizarse 2 muestras de paciente, una de la fase aguda (semana 1 de la enfermedad) y otra de la fase de convalecencia (de 3 a 4 semanas más tarde) [4, 6, 9]. Las células T específicas del SARS-CoV-2 aparecen algunos días después del comienzo de los síntomas. Se asocia una respuesta de células T específicas a una evolución leve de la COVID-19 [8].

Se han relacionado los anticuerpos neutralizantes con una inmunidad protectora contra una reinfección con SARS-CoV-2 o SARS-CoV; se han detectado anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV 17 años después de la infección. Las células T reactivas de SARS-CoV-2 forman parte del repertorio de células T de las personas que, en 2003, experimentaron una infección por SARS-CoV. Estas células proliferan tras el contacto con el SARS-CoV-2. Se encontraron células T con reacción cruzada en aproximadamente la mitad de las personas analizadas sin historial de SARS-CoV-2, presumiblemente debido a infecciones pasadas con coronavirus de resfriado. Esto indica una inmunidad duradera tras una infección por betacoronavirus [8; 10].



En la COVID-19, la memoria inmunológica es heterogénea: los anticuerpos específicos del virus, células B de memoria y células T presentan distinta intensidad y sus niveles se diferencian con una dinámica distinta. Los conocimientos hasta la fecha indican que la memoria de las células T y B y los anticuerpos tras una infección por SARS-CoV-2 persisten durante años en la mayoría de los casos [8].

Principios del ensayo

El ensayo se basa en una reacción de un tubo, sobre la base de la transcripción inversa (RT) para la conversión del ARN viral en ADN complementario (ADNc, inglés: complementary DNA), seguida de una amplificación de RCP y detección Real-Time (en tiempo real) basada en fluorescencia de dos secciones definidas dentro del gen ORF1ab y del N del genoma SARS-CoV-2. La transcripción inversa, la amplificación y la detección del ADNc de SARS-CoV-2 se realizan con iniciadores y sondas específicos. El ensayo contiene un control de amplificación interno que sirve de control de inhibición y, además, puede utilizarse como control de extracción. Se realiza un control positivo de SARS-CoV-2 incluido en el equipo de ensayo como control externo en cada ensayo.

El software EURORealTime Analysis en combinación con un real-time PCR cyler compatible (véase más abajo) permiten una evaluación y documentación totalmente automatizada y estandarizada de los resultados, incluidos todos los resultados de control. Además, el software guía totalmente al usuario a través de los pasos de trabajo individuales, por lo que garantiza un procedimiento de ensayo sencillo y sin errores. De forma alternativa, el software del real-time-PCR cyler puede utilizarse para la evaluación.

Materiales incluidos en este equipo

(MP 2606-####)

Descripción	0125	0225	0425	0100	0200	1000	Símbolo
1. Mezcla de RCP SARS-CoV-2 (tapa verde), lista para usar	1 x 150 µl	2 x 150 µl	4 x 150 µl	1 x 600 µl	1 x 1,2 ml	5 x 1,2 ml	PCR MIX A
2. Mezcla de RCP SARS-CoV-2 (tapa amarilla), lista para usar	1 x 150 µl	2 x 150 µl	4 x 150 µl	1 x 600 µl	1 x 1,2 ml	5 x 1,2 ml	PCR MIX B
3. Control positivo SARS-CoV-2 (tapa lila), listo para usar	1 x 400 µl	1 x 400 µl	1 x 400 µl	1 x 400 µl	1 x 400 µl	2 x 400 µl	POS CONTROL
4. Control interno de ARN (tapa blanca), listo para usar	1 x 1,2 ml	1 x 1,2 ml	1 x 1,2 ml	1 x 1,2 ml	1 x 1,8 ml	6 x 1,8 ml	INT CONTROL
5. Manual de instrucciones	1 unidad	1 unidad	1 unidad	1 unidad	1 unidad	1 unidad	-

Materiales del equipo de ensayo que pueden pedirse por separado

Los siguientes materiales pueden pedirse por separado. Deben utilizarse conforme al manual de instrucciones.

Material	Referencia	Formato
Control positivo SARS-CoV-2	MK 2606-0108	1 x 400 µl
Control interno de ARN	MK 0003-0112	1 x 1,2 ml

Otros materiales y equipos necesarios (que no contiene el equipo de ensayo)

Software (opcional)

- Software de análisis EURORealTime (mín. versión 1.2.0; para apoyar qTOWER³ mín. versión 1.3.0), ref. EUROIMMUN YG 0661-0101 (uso para evaluación solo posible en combinación con LightCycler 480 II [Roche], 7500 Fast Real-Time PCR Instrument [Applied Biosystems], CFX 96 Touch [Bio-Rad] y qTOWER³ [Analytik Jena])

Zona pre RCP y de preparación de muestras:

- Minicentrífuga para pocillos de reacción de 0,2 ml y 1,5 ml, ref. EUROIMMUN YG 0612-0101 o equivalente
- Centrífuga para placas de RCP, p. ej., VWR, ref. 521-1648, o equivalente
- Agitador de laboratorio para pocillos de reacción («vórtex»), ref. EUROIMMUN YG 0641-0101 o equivalente
- Gradilla de enfriamiento de RCP para pocillos de reacción de 0,2 ml («IsoFreeze Tube-Rack») ref. EUROIMMUN ZG 0617-0101 o equivalente
- Gradilla de pre RCP para pocillos de reacción de 1,5 ml
- Gradilla de enfriamiento de RCP para pocillos de reacción de 1,5 ml («IsoFreeze Tube-Rack») ref. EUROIMMUN ZG 0618-0101 o equivalente
- Pipetas (volumen ajustable) y puntas de pipeta con filtro de 10, 20, 200 y 1000 µl, sin DNA ni desoxirribonucleasa
- Pocillos de reacción de 1,5 ml sin DNA ni desoxirribonucleasa (recomendado: Micro Tube, 1,5 ml SafeSeal, Sarstedt, ref. 72.706.400)
- Guantes desechables
- Pocillos de reacción de RCP:

Para LightCycler® 480 II (Roche):

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, blanco, Roche, ref. 04729692001

Para 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems)

MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), Fisher Scientific (Applied Biosystems), ref. 4346906

MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml), Fisher Scientific (Applied Biosystems), ref. 4346907

MicroAmp® Optical Adhesive Film, Fisher Scientific (Applied Biosystems), ref. 4311971

Para CFX 96 Touch (Bio-Rad):

Multiplate™ 96-Well PCR Plates, low profile, unskirted, clear, Bio-Rad, ref. MLL9601

Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical, Bio-Rad, ref. MSB1001

Para qTOWER³ (Analytik Jena):

Placa de RCP de 96 pocillos (0,2 ml; LP), con faldón completo, blanca, Analytik Jena, ref. 844-70038-0

Lámina de sellado óptico (77 x 140 mm), adhesiva, transparente, pelable, Analytik Jena, ref. 844-70045-0

Para Rotor-Gene Q (Qiagen):

Para utilizar con un rotor de 72 pocillos: Tubos y tapones para tiras, 0,1 ml (250), Qiagen, ref. 981103

Para utilizar con un rotor de 36 pocillos: Tubos de RCP, 0,2 ml (1000), Qiagen, ref.

Zona de amplificación:

- Se recomienda uno de los siguientes Real-Time-PCR-Cycler:
 - LightCycler® 480 II (Roche)
 - 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems)
 - CFX 96 Touch (Bio-Rad)
 - qTOWER³ (Analytik Jena)
 - Rotor-Gene Q (Qiagen)



Almacenamiento y duración

- **Mezcla A de RCP (tapa verde) y B (tapa amarilla) SARS-CoV-2:** Listo para usar. Almacenamiento protegido de la luz a una temperatura de entre -18 °C y -25 °C en la **zona pre RCP**. Para su utilización, descongelar solo brevemente (máximo 60 minutos) y cinco veces como máximo a entre +2 °C y +8 °C, mezclar invirtiéndola varias veces (**¡no con vórtex!**) y, a continuación, centrifugar para recoger las soluciones en la base.
- **Control positivo SARS-CoV-2 (tapa lila):** Listo para usar. Almacenamiento a entre -18 °C y -25 °C en la zona de preparación de muestras. Para su utilización, descongelar solo brevemente (máximo 60 minutos) y cinco veces como máximo a entre +2 °C y +8 °C, mezclar recoger las soluciones en la base mediante la centrifugación.
- **Control interno de ARN (tapa blanca):** Listo para usar. Almacenamiento a entre -18 °C y -25 °C en la **zona pre RCP**. Para su utilización, descongelar solo brevemente (máximo 60 minutos) y cinco veces como máximo a entre +2 °C y +8 °C, mezclar recoger las soluciones en la base mediante la centrifugación.

Conservación una vez abierto

Si no se indica otra cosa en el texto, una vez abiertos, los reactivos pueden conservarse hasta la fecha de caducidad indicada, siempre que se almacenen bajo las condiciones especificadas y se protejan de las contaminaciones. **EUROIMMUN recomienda descongelar los reactivos cinco veces como máximo y, en caso necesario, alicuotar.**

Advertencias y medidas de precaución

- Únicamente el personal cualificado debe procesar el ensayo. Generalmente, se supone un conocimiento de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory practice, GLP) como describe, por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) o la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). En particular, deben tenerse en cuenta las normas para la realización del ensayo de amplificación molecular [11].
- Al manipular muestras y reactivos, deberían llevarse siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y, en caso necesario, otros equipos de protección personal, así como cumplir las actuales recomendaciones relacionadas con los análisis de SARS-CoV-2 como, p. ej., del Comité de Agentes Biológicos (Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe, ABAS) o de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- La tapa calefactada y el bloque de incubación del Real-Time-PCR-Cycler pueden alcanzar temperaturas de hasta +110 °C. Existe el peligro de quemaduras en la piel. Tenga en cuenta las instrucciones de uso del aparato.
- En caso de daños visibles en los reactivos envasados, no utilizar el equipo de ensayo.
- Antes del uso del producto, deben leerse atentamente las instrucciones del ensayo. Solo debe utilizarse la versión válida suministrada.
- No mezclar ni intercambiar los reactivos de EUROIMMUN con reactivos de otros fabricantes.
- Debido a la alta sensibilidad clínica del RCP, debería extremarse el cuidado para que se conserve la pureza de los componentes del equipo de ensayo y de las muestras. Mediante la RCP, secciones del ácido nucleico presente en la muestra se multiplican millones hasta miles de millones de veces. Mínimas cantidades (p. ej., también aerosol) de estos productos de RCP pueden dar un resultado falso en la transmisión en el material de muestra, en los reactivos para la extracción de ARN o los reactivos de RCP de este equipo de ensayo. Para detectar posibles contaminaciones, es importante acompañarse generalmente de controles negativos, tanto en la extracción de muestras como en la RCP.
- Los guantes desechables deben cambiarse siempre tras una contaminación (o sospecha de contaminación) con reactivos o material de prueba.



- Durante el pipeteo generalmente se utilizan puntas de filtro para descartar contaminaciones cruzadas mediante aerosoles presentes en el pipeteo.

Indicaciones sobre la realización del ensayo y la seguridad

- Para evitar la contaminación, los pasos individuales del procedimiento de ensayo deberían procesarse, idealmente, como se describe a continuación, en tres espacios separados entre sí (zona pre RCP, preparación de muestras y zona de amplificación) [12]. Todos los aparatos, pipetas, reactivos y materiales, así como el equipo de protección (bata de laboratorio, gafas protectoras, guantes desechables) deberían guardarse estrictamente separados en función del espacio correspondiente al que pertenecen y utilizarse exclusivamente en esa zona.

Espacio 1 – Zona pre RCP

La zona pre RCP sirve de almacenamiento y para manipular los reactivos de la RCP. A este espacio no deben llegar muestras, productos de RCP ni controles positivos de ARN.

Espacio 2 – Preparación de muestras

Este espacio se utiliza para el aislamiento del ARN a partir de las muestras de pacientes y para la preparación de las muestras extraídas para la mezcla de RCP. A este espacio no debe llevarse ningún producto de RCP.

Espacio 3 – Zona de amplificación

Aquí tiene lugar la amplificación de RCP en el Real-Time-PCR-Cycler. Tras la RCP, los fragmentos del ácido nucleico diana a detectar se encuentran, en su caso, en un número de copias multiplicado millones hasta miles de millones de veces. También las pequeñas transmisiones en los espacios de pre RCP y preparación de muestras a través de la ropa, los aparatos, materiales o mediante aerosoles pueden causar resultados falsos en las pruebas siguientes y es imprescindible evitarlas.

- Todas las superficies de trabajo, aparatos y medios auxiliares como, p. ej., gradillas, deben limpiarse regularmente (idealmente después de cada uso) con agentes destructivos del ADN/ARN, p. ej., solución de hipoclorito diluida [13]. Aviso: Algunos medios desinfectantes como, p. ej., etanol diluido, no son adecuados para destruir los ácidos nucleicos (póngase en contacto con EUROIMMUN si desea asesoramiento adicional sobre este tema).

Preparación y estabilidad de las muestras

- **Muestras:** Como material básico para el ensayo, se utiliza ARN purificado de muestras de pacientes. Una buena calidad de la muestra de ARN utilizada es un requisito importante para el valor diagnóstico del sistema de ensayo. Para ello, hay que procurar que una recogida de muestras, una preparación de ARN y un almacenamiento de ARN incorrectos no puedan causar resultados no válidos e incluso falsos.

Para la evaluación del ensayo EURORealTime SARS-CoV-2 con muestras clínicas se utilizó ARN que fue aislado, siguiendo las instrucciones de los fabricantes, mediante el QIAamp® Viral RNA Mini Kit ((Qiagen), del CMG-2015 Prepito Viral DNA/RNA200 Kit (Chemagen) y del NucleoMag® VET Kit (Macherey-Nagel) a partir de frotis faríngeos, así como mediante el CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (Chemagen) a partir de frotis faríngeos y saliva. No obstante, al utilizar el CMG-2015 Prepito Viral DNA/RNA200 Kit, se añadieron 300 µl de tampón de lisis a 300 µl de muestra a diferencia de las instrucciones del fabricante. La carga viral en saliva puede diferir de la carga viral en frotis faríngeos, lo cual, según las circunstancias, puede influir en la idoneidad de la saliva como material de muestra para procedimientos diagnósticos. Véase, p. ej., RKI – Coronavirus SARS-CoV-2 – Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 (Notas sobre las pruebas de pacientes de la infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 del Instituto Robert Koch) [14].

Recogida de muestras y transporte: Los productos habituales para la recogida, el almacenamiento y el transporte de muestras deberían proporcionar una cantidad y calidad de muestras adecuadas como material básico para la utilización con este sistema de ensayo.



Según cada tipo de muestra utilizada y el medio de transporte utilizado, pueden ser necesarios un almacenamiento especial y, para el aislamiento del ARN, un tratamiento previo de la muestra del paciente. Tenga en cuenta las instrucciones del fabricante.

- **Recogida de muestras y transporte:** Los productos habituales para la recogida, el almacenamiento y el transporte de muestras deberían proporcionar una cantidad y calidad de muestras adecuadas como material básico para la utilización con este sistema de ensayo.

Según cada tipo de muestra utilizada y el medio de transporte utilizado, pueden ser necesarios un almacenamiento especial y, para el aislamiento del ARN, un tratamiento previo de la muestra. Tenga en cuenta las instrucciones del fabricante.

- **Preparación del ARN de muestras de pacientes:** Los productos habituales para la preparación del ARN como p. ej., el «QIAamp® Viral RNA Mini Kit» (Qiagen), el CMG-2017 Prepito Viral DNA/RNA300 Kit (Chemagen) o el CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (Chemagen), proporcionan generalmente una cantidad y calidad de ARN adecuadas para la utilización con estos sistemas de ensayo, siempre que sean adecuados para las muestras utilizadas y hayan sido validados.

El ARN purificado de la muestra de paciente es, en función de la muestra, una mezcla de ácidos nucleicos humanos y ARN viral en caso de infección. Dado que generalmente predominan los ácidos nucleicos humanos, la concentración de ARN analizada de una muestra no corresponde con la concentración de ARN viral presente. Para muestras con un contenido de ácido nucleico de hasta 20 ng/µl, no se observó ninguna alteración del límite de detección. Una cantidad de ácido nucleico superior puede causar resultados no válidos o, en casos extremos, resultados falsos.

Aviso: EUROIMMUN recomienda el uso del control interno (CI) de ARN para comprobar la eficacia de la preparación de ARN. Para tal fin, se añade el CI al tampón de lisis o a la mezcla de muestra y tampón de lisis. En ningún caso debe añadirse directamente a la muestra, es decir, antes de añadir el tampón de lisis. El volumen de CI añadido normalmente es 1/10 del volumen de la elución. Ejemplo: Si la elución del ácido nucleico resulta 60 µl, deberán añadirse 6 µl de CI a la mezcla de muestra y tampón de lisis.

- **Almacenamiento de las muestras de ARN:** El almacenamiento de las muestras de ARN debe realizarse exclusivamente en la zona de preparación de muestras y conforme a las recomendaciones para el sistema de preparación de ARN. EUROIMMUN recomienda un almacenamiento de las muestras de ARN extraídas a entre -18 °C y -25 °C, idealmente a -80 °C. Normalmente, un breve almacenamiento temporal a entre +4 °C y +8 °C es posible.

Nota: Un almacenamiento incorrecto de las muestras de ARN, si se descongelan y vuelven a congelar con frecuencia, el ARN puede dañarse y debería evitarse ya que, de lo contrario, pueden causar resultados negativos falsos.

Preparación de los reactivos

No es necesaria una preparación de los reactivos. Todos los componentes del kit están listos para usar.

Eliminación

Las muestras de pacientes, los controles y los pocillos de reacción usados deben manipularse como desechos infecciosos. Todos los reactivos deben desecharse conforme a las normativas legales.

Control de calidad

Para garantizar la corrección de los resultados, es imprescindible realizar paralelamente un control negativo (no suministrado en el equipo de ensayo) y un control positivo (parte del equipo de ensayo) en cada serie. Además, el sistema de ensayo contiene un control interno (CI) de ARN que facilita la detección de una posible inhibición de RCP en tiempo real o una extracción errónea. El CI debe detectarse especialmente en muestras negativas.



Realización del ensayo

Sinopsis:

Antes de empezar los trabajos, lea el capítulo «**Notas sobre la realización del ensayo y la seguridad importantes**».

1. Preparación del ARN	- La preparación del ARN se realiza según las indicaciones del fabricante del sistema de preparación utilizado
-------------------------------	--



2. Crear serie en el software EURORealTime Analysis¹	<ul style="list-style-type: none"> - Introducir las muestras y asignar los ensayos (o importar del archivo LIMS o csv) - Se generan el esquema de pipeteo y el diseño de la placa - Exportar el diseño de la placa
--	---



3. RCP en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> - Preparar la mezcla maestra de RCP de la mezclas A y B de RCP - Verter la mezcla maestra en la placa de RCP - Añadir las muestras y los controles - Importar el diseño de la placa generada por el software EURORealTime Analysis y el perfil de temperatura específico del ciclador¹ - Incubar en el real-time PCR cycler - Exportar los resultados de RCP (datos brutos)
------------------------------	---



4. Evaluación utilizando el software EURORealTime Analysis¹	<ul style="list-style-type: none"> - Importar los resultados de RCP (datos brutos) en el software EURORealTime Analysis - Iniciar el proceso de evaluación en el software EURORealTime Analysis - Comprobar y validar los resultados - Imprimir los documentos de los resultados y/o transferir los resultados a LIMS
---	---

¹ Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis, introducir la siguiente información en el software del real-time PCR cycler directamente:

- Posición y nombre de cada muestra y control
- Asignar los dos filtros de detección a cada muestra y control
- Perfil de temperatura específica del ciclador

Tras haber completado el ensayo:

- Iniciar el proceso de evaluación en el software del Real-Time-PCR cycler
- Comprobar y validar los resultados



Instrucciones de trabajo detalladas

Controles

Control interno:

Para comprobar una posible inhibición de RCP en tiempo real o una extracción errónea, el equipo de ensayo contiene un control interno (CI) de ARN con una secuencia artificial que no es homóloga respecto a ninguna secuencia conocida. Debe añadirse el CI a cada preparación. Sin realizar el CI, los resultados negativos serán clasificados como «no válido» por el software EURORealTime Analysis. Si la evaluación se realiza utilizando el software del real-time PCR cycler, los resultados negativos deberán clasificarse como «no válidos».

Control negativo:

Para descartar que los componentes utilizados están contaminados con ARN/ADN amplificable, en cada serie de ensayos debe realizarse un control negativo en forma de solución sin ácido nucleico (p. ej, agua sin DNase/RNase o tampón TE) que se utilice como muestra (control negativo, CN). Si el CN no se realiza o se clasifica como «no válido», todos los resultados del ensayo deben ser interpretados como «no válido» por el software EURORealTime Analysis. Si la evaluación se realiza utilizando el software del real-time PCR cycler, todos los resultados deberán también clasificarse como «no válidos». Dado que es posible que, a través de los componentes de la purificación del ARN, se haya introducido por descuido ARN/ADN amplificable en la muestra, EUROIMMUN recomienda realizar el control negativo ya en la preparación del ARN.

El CI debe añadirse obligatoriamente al control negativo. Los controles negativos sin señal de amplificación para el CI deben ser clasificados como «no válido» por el software EURORealTime Analysis. Si la evaluación se realiza utilizando el software del real-time PCR cycler, los controles negativos sin señal de amplificación para el CI deberán clasificarse como «no válido». Si se utiliza el CI como control de extracción, EUROIMMUN recomienda añadir el CI también para el control negativo ya a partir de la preparación de ARN.

Control positivo:

Para comprobar si la mezcla de reacción se ha preparado correctamente y si es posible una detección válida del patógeno en las condiciones dadas, debe realizarse un control positivo SARS-CoV-2 en cada serie. El control positivo debe añadirse directamente en la mezcla de RCP de la preparación correspondiente y no debe utilizarse en la extracción. Si el CN no se realiza o se clasifica como «no válido», todos los resultados del ensayo deben ser clasificados como «no válido» por el software EURORealTime Analysis. Si la evaluación se realiza utilizando el software del real-time PCR cycler, todos los resultados deberán también clasificarse como «no válidos».

Nota: Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis software, la adición del CI en cada muestra sigue siendo obligatorio y los controles externos CP y CN deben incluirse para la validación de los resultados.

Preparación de la serie

Programación de Real-time PCR cycler

EUROIMMUN recomienda, importar el perfil de temperatura mediante el archivo emitido por el software de análisis EURORealTime (solo en combinación con LightCycler® 480 II (Roche), 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), CFX 96 Touch (Bio-Rad) y qTOWER³ (Analytik Jena)). Hallará más información sobre el uso del archivo en el manual del software de análisis EURORealTime (ref. EUROIMMUN: YG 0661_A_UK_CXX).

Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis, los ajustes del aparato y el perfil de temperatura deben introducirse manualmente en el software del real-time PCR cycler del siguiente modo:

Ajustes del equipo

LightCycler® 480 II (Roche):

Tipo de placa:	placas blancas
Formato de detección:	Dual Color Hydrolysis Probe
Volumen de reacción:	20 µl
Velocidad de rampa:	predeterminada



7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems):

Volumen de reacción por pocillo:	20 µl
Referencia pasiva:	ninguna
Tipo de ciclador:	7500 rápido (96 pozos)
Tipo de experimento:	curva estándar de cuantificación
Reactivo:	Reactivos TaqMan®
Tiempo de ejecución:	estándar (~ 2 horas para completar la ejecución)

CFX 96 Touch (Bio-Rad):

Volumen de muestra:	20 µl
Tipo de placa:	BR Clear
Tamaño de placa:	96 pozos
Modo de escaneo:	todos los canales

qTOWER³ (Analytik Jena):

Velocidad de calentamiento/enfriamiento (para todos los pasos):	3,3
Escaneo / Medición	Azul (FAM), Amarillo (HEX_3)
Med: repetir:	3
Ganancia:	5

Rotor-Gene Q (Qiagen):

Tipo de rotor:	Rotor de 36 o 72 pocillos
Volumen de muestra:	20 µl
Optimización de ganancia:	Añadir canal Verde / Amarillo Comprobar «Realizar optimización antes de 1. ^a adquisición» (Realizar optimización antes de 1. ^a adquisición)
Canales de adquisición:	Verde, Amarillo

Reporter:

Parámetro	LightCycler [®] 480 II (Roche)	7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems)	CFX 96 Touch (Bio-Rad)	qTOWER ³ (Analytik Jena)	Rotor-Gene Q (Qiagen)
SARS-CoV-2	FAM (465-510)	FAM (Quencher None)	FAM	Azul (FAM)	Verde
CI	VIC / HEX / Yellow555 (533-580)	FAM (Quencher None)	HEX	Amarillo (HEX_3)	Amarillo

Perfil de temperatura:

	Número de ciclos	Modo de análisis (solo para LightCycler [®] 480 II)	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [Min:Seg]	λ(°C/s) (solo qTOWER ³)
Transcripción inversa	1	Ninguno	Ninguno	45	10:00	3,3
Desnaturalización	1	Ninguno	Ninguno	95	02:00	3,3
Amplificación	45	Cuantificación	Ninguno	95	00:15	3,3
			Adquisición*	58	00:45	3,3
Enfriamiento	1	Ninguno	Ninguno	37	00:20	3,3

*La definición de adquisición depende del real-time PCR cycler utilizado:

LightCycler [®] 480 II (Roche)	Individual
7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems)	Recopilación de datos el
CFX 96 Touch (Bio-Rad)	Placa leída
qTOWER ³ (Analytik Jena)	Escaneo
Rotor-Gene Q (Qiagen)	Adquisición a Ciclado A en Verde, Amarillo



Nota: El programa de RCP indicado y los ajustes se optimizaron para: Real-Time-PCR cyclers LightCycler® 480 II (Roche), 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), CFX 96 Touch (Bio-Rad); qTOWER³ (Analytik Jena) y Rotor-Gene Q (Qiagen) utilizando los pocillos de reacción de RCP recomendados anteriormente. La utilización de otros Real-Time-PCR cyclers y otros pocillos de reacción de RCP puede influir en el resultado de amplificación y, por consiguiente, modificar los datos de rendimiento del ensayo, incluidas la especificidad y la sensibilidad. El uso de otros aparatos o pocillos debería validarse y, en caso necesario, adaptar el perfil de temperatura. No obstante, debido a las posibles tolerancias de los aparatos, en caso de aparatos con estructura idéntica, se recomienda validar y comprobar regularmente el aparato utilizado cada vez por medio de muestras precaracterizadas.

Creación de una serie en el software EURORealTime Analysis

EUROIMMUN recomienda utilizar el software EURORealTime Analysis para apoyar, evaluar y documentar cada serie. Debe familiarizarse con el contenido del manual del software EURORealTime Analysis antes del primer uso. En resumen, se realizan los siguientes pasos:

Creación de una serie:

Crear un protocolo en el software EURORealTime Analysis en «New protocol» (Nuevo protocolo):

- Defina el aparato de RCP en tiempo real, la respectiva ID (en caso de definición previa de ID de aparatos), los pocillos de RCP utilizados y la disposición de la muestra.
- Introducir las muestras (a través de escaneo o manualmente, de la importación de LIMS o csv) y seleccionar «SARS-CoV-2» como ensayo.
- Introducir el lote del equipo.

El cálculo de la mezcla maestra y el esquema de pipeteo se generan automáticamente y pueden imprimirse. El software integra automáticamente los controles requeridos para la evaluación automática del ensayo (control positivo y negativo)

Se puede encontrar más información sobre la definición de un nuevo protocolo en el manual del usuario del software EURORealTime Analysis.

Exportación del protocolo de trabajo:

- Después de haber creado una serie correctamente, seleccione «Save» (Guardar) y seleccione «Export Working Protocol» (Exportar protocolo de trabajo).
- Seleccione el nombre del archivo y la ubicación de almacenamiento (directorio de red o soporte de datos locales) en la ventana «Save under» (Guardar en).
- La exportación de la plantilla específica de la serie y el ciclador y el archivo de muestra se realiza automáticamente.

Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis, crear la serie del siguiente modo y según las instrucciones del fabricante del real-time PCR cycler utilizado:

- Introducir el nombre y la posición de cada muestra
- Definir el tipo de muestra para cada muestra (control positivo, control negativo o muestra de paciente)
- Aplicar los filtros de detección para cada muestra
- Elegir el perfil de temperatura específica del ciclador

Realización de la RCP en tiempo real

Nota: La muestra de ARN, los controles y las mezclas de RCP son sensibles. Por consiguiente, se recomienda utilizar disipadores de calor o hielo durante todo el procedimiento y mantener las muestras y los reactivos a entre + 2 °C y +8 °C durante el proceso de pipeteo.

Descongelación de los reactivos y controles

Retirar las mezclas de RCP A y B y los controles del congelador unos 15 minutos antes del pipeteo de las preparaciones de RCP y descongelar a entre +2 °C y +8 °C en la zona/el espacio designado para ello. ¡Proteger de la luz y no dejar a entre +2 °C bis +8 °C durante más de 60 minutos!



Preparación de la mezcla maestra

Los siguientes pasos deben realizarse en la **zona de pre RCP** (espacio 1):

- Preparar la placa de RCP o el número requerido de pocillos de reacción y etiquetas según el protocolo.
- Mezclar invirtiendo varias veces (¡no con vórtex!) las mezclas de RCP A y B descongeladas a entre +2°C y +8°C y, a continuación, centrifugar para recoger las soluciones en la base
- Preparar la mezcla maestra de RCP conforme al esquema de pipeteo calculado por el software EURORealTime Analysis. Añadir con la pipeta la cantidad indicada de mezclas de RCP A y B, así como CI o agua sin ARN/ADN/nucleasa a un pocillo de reacción de 1,5 ml con una punta de pipeta nueva cada vez. Mezclar bien añadiendo y retirando con la pipeta varias veces.

La base para el cálculo de la mezcla en el software EURORealTime Analysis es²:

Componente	Volumen [µl]
Mezcla A de RCP	5
Mezcla B de RCP	5
CI ³	1
Σ	11

Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis, calcular el volumen de la mezcla maestra para el número requerido de reacciones manualmente según la tabla anterior. EUROIMMUN recomienda tener siempre en cuenta un excedente del 10% para contrarrestar las inexactitudes del pipeteo.

- Añadir con la pipeta 10 µl de mezcla maestra en cada cavidad necesaria (aquí se puede utilizar de nuevo la misma punta de pipeta).

Nota: Durante el pipeteo intente que no se formen burbujas de aire. Almacenar todos los componentes del kit inmediatamente después del uso a una temperatura de entre -18°C y -25°C.

Adición de muestras

Los siguientes pasos deben realizarse en la **zona de preparación de mezclas** (espacio 2).

- En caso necesario, descongelar todas las muestras de ARN y los controles, mezclar brevemente con el vórtex y, a continuación, centrifugar brevemente para recoger las soluciones en la base.
- Añadir con la pipeta 10 µl de cada muestra o control de ARN (control positivo o negativo) al correspondiente pocillo que contiene la mezcla maestra. **¡Cambiar la punta de la pipeta con cada paso!**
- Cerrar los pocillos con cuidado; si se utilizan placas de 96 pocillos, ¡asegurarse de que los tapones y la lámina estén bien colocados!
- Centrifugar brevemente la placa de RCP para recoger las soluciones en la base. Al utilizar los pocillos de reacción del Rotor-Gene Q, este paso puede omitirse ya que las soluciones en el Rotor-Gene Q se centrifugan permanentemente durante la serie (400 rpm).

² El software EURORealTime Analysis calcula automáticamente un excedente del 10% para contrarrestar las inexactitudes del pipeteo.

³ El CI solo debe añadirse a la mezcla maestra en caso de que no se haya añadido ya en el marco del aislamiento de ARN (véase «**Preparación del ARN a partir de muestras**»). En caso de que el CI se haya utilizado ya como control de extracción, NO DEBE añadirse en esta etapa. En su lugar, debe añadirse la correspondiente cantidad de agua libre de ARN/ADN/nucleasa a la mezcla maestra.



Reacción de amplificación

Los siguientes pasos deben realizarse en la **zona de amplificación** (espacio 3):

- Introducir la placa de RCP preparada o los pocillos de reacción en el real-time PCR cycler.
- Si se utiliza el software EURORealTime Analysis software⁴, importar los datos de la serie al real-time PCR cycler según la siguiente descripción:

LightCycler® 480 II (Roche):

- Iniciar el software según las instrucciones del fabricante
- Abrir el archivo de plantilla del ciclador para el ciclador seleccionado (la selección de fluoróforo y el perfil de temperatura ya están incluidos)
- Seleccionar «Sample Editor» (Editor de muestras) en la barra de menú a la izquierda
- Hacer clic en el botón «Import» (Importar) en el lado derecho de la barra
- En la ventana «Sample Information Import» (Importación de información de muestra) que se abre a continuación, seleccionar el archivo txt correspondiente
- Hacer clic en «Scan File» (Escanear archivo)
- Confirmar dos veces con la casilla de verificación

7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems):

- Iniciar el software según las instrucciones del fabricante
- Abrir el archivo de plantilla para el ciclador seleccionado (las propiedades del experimento, la selección de fluoróforos y el perfil de temperatura ya están incluidos)
- En la configuración «Plate Setup» (Configuración de placa), ir a «Import...» en «File» (Archivo)
- Seleccione el archivo txt en la ventana «Import Plate Setup» (Importar configuración de placa) y confirmar con «Start Import» (Iniciar importación)
- Los fluoróforos y las descripciones de las muestras están incluidos en el protocolo

Nota: En la versión 2.3 del software 7500, la selección preestablecida de la referencia pasiva no es reconocida por el software y la serie de RCP no puede iniciarse. Seleccione primero en «Assign Targets and Samples» (Asignar dianas y muestras), en la columna «Select the dye to use as the passive reference» (Seleccionar el colorante par utilizar como referencia pasiva), cualquier opción que no sea «None» (Ninguno) y, a continuación, restablecer a «None» (Ninguno).

CFX 96 Touch (Bio-Rad):

- Iniciar el software según las instrucciones del fabricante
- Abrir el archivo de plantilla del ciclador para el ciclador seleccionado (la selección de fluoróforos, el perfil de temperatura y la designación de muestras ya están incluidos)

qTOWER³ (Analytik Jena):

- Iniciar el software según las instrucciones del fabricante.
- En la barra de menú «Datei» (Archivo), mediante «Import LIMS», abrir el archivo de plantilla del ciclador para el ciclador seleccionado (la selección de fluoróforo, el perfil de temperatura y las denominaciones de las muestras ya están incluidos)
- El equipo Rotor-Gene Q (Qiagen) no es compatible actualmente con el software de análisis EURORealTime. Por eso, en este equipo debe comprobarse manualmente si los ajustes seleccionados, el perfil de temperatura y la asignación de muestras son correctos.
- Iniciar el real-time PCR cycler.

Precaución: La tapa calefactada y el bloque de incubación del Real-Time-PCR cycler pueden alcanzar temperaturas de hasta +110 °C. Existe el peligro de quemaduras en la piel. Tenga en cuenta las instrucciones de uso del aparato.

⁴ Si no se utiliza el software EURORealTime Analysis, verificar manualmente que se han elegido los ajustes, el perfil de temperatura y la asignación de muestras correctos.



Preparaciones para la evaluación utilizando el software EURORealTime Analysis

Exportación de datos brutos del real-time PCR cyclers:

LightCycler® 480 II (Roche):

Nota: Para cada fluoróforo, ¡utilizar un nuevo archivo de exportación como se describe a continuación! Los siguientes pasos deben realizarse dos veces, una para SARS-CoV-2 y otra para el CI.

- Seleccione el fluoróforo en «Analysis» (Análisis) mediante el botón «Filter Comb» (Combinación de filtros)
Nota: Para una correcta evaluación de las señales del CI, debe utilizarse la propia «Color Compensation» (compensación de color) del software para el CI (filter comb 533-580). Para ello, hacer clic en la flecha al lado del botón «Color comp» (Compensación del color) y seleccionar «In Database» (En base de datos). Seleccionar «Universal CC FAM(510) – VIC(580)» en la ventana de selección y confirmar con la casilla de verificación.
- Seleccionar «Calculate» (Calcular)
- Hacer clic en el botón derecho en la representación
- Seleccionar «Export Chart» (Exportar gráfico)
- Seleccionar la pestaña «Data» (Datos) en la ventana «Export Chart» (Exportar gráfico)
- Seleccionar XML en «Format» (Formato)
- Seleccionar la ubicación de almacenamiento sobre el botón «File name» (Nombre de archivo) y confirmar con Enter
- Introducir un nombre de archivo único que contenga el nombre del fluoróforo (FAM, HEX) al final del nombre del archivo. ¡Esto es obligatorio para una correcta importación de los archivos en el software EURORealTime Analysis! (Ejemplo: 200322_SARS_CoV_2_FAM.xml)
- Hacer clic en el botón de exportar

7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems):

- Guardar el archivo eds seleccionando «File» (Archivo) y «Save as» (Guardar como) en la ubicación deseada.

CFX 96 Touch (Bio-Rad):

- Marcar «No Baseline Subtraction» (Sin sustracción de base de referencia) en «Settings» (Ajustes) y «Baseline Settings» (Ajustes de la base de referencia).
- Seleccionar la pestaña «Quantification Data» (Datos de cuantificación).
- Seleccionar «Results» (Resultados) en el cuadro desplegable.
- Hacer clic en el botón derecho sobre la tabla y seleccionar «Export to Excel» (Exportar a Excel).
- Guardar el archivo en la ubicación deseada.
- Seleccionar «RFU» en el cuadro desplegable.
- Hacer clic en el botón derecho sobre la tabla y seleccionar «Export to Excel» (Exportar a Excel).
- Guardar el archivo en la ubicación deseada.

qTOWER³ (Analytik Jena):

- En la pestaña «Settings» (Ajustes) y «Scan», seleccionar y guardar la compensación de color «Standard1».
- También en la pestaña «Setting» (Ajustes) y «Samples» (Muestras), hacer clic con el botón derecho en la tabla y seleccionar «Export table to Excel-file» (Exportar tabla como archivo Excel).
- Colocar el archivo en la ubicación de almacenamiento deseada.
- En la pestaña «Monitoring», en «View» (Ver) seleccionar «Row data» (Datos brutos) en el menú desplegable.

Aviso: Debajo del diagrama, en la selección de canal, debe estar seleccionado «all colours» (Todos los colores) para exportar los datos de ambos canales en un archivo.

- Hacer clic con el botón derecho en el diagrama y seleccionar «Save chart as CSV-file» (Guardar gráfico como archivo CSV).
- Colocar el archivo en la ubicación de almacenamiento deseada.



Importación de los datos brutos en el software EURORealTime Analysis

- Abrir el software EURORealTime Analysis
- Seleccionar «Evaluate Run» (Evaluar serie) y seleccionar una serie del menú

LightCycler® 480 II (Roche):

- En la ventana de selección, ¡el archivo xml para cada reporter (FAM, HEX) debe cargarse **individualmente!**
- Cuando se hayan cargado todos los archivos, seleccionar «Load Protocol» (Cargar protocolo)

7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems):

- En el cuadro de diálogo, seleccionar el archivo eds que pertenece a la serie. Si las ubicaciones de almacenamiento de los archivos eds ya están incluidos en el software EURORealTime Analysis, habrá una preselección automática.
- Cuando el archivo eds esté cargado o preseleccionado, seleccione «Load Protocol» (Cargar protocolo).

CFX 96 Touch (Bio-Rad):

- En el cuadro de diálogo, seleccionar los archivos xls que pertenecen a la serie.
 - Con RFU Export (resultados de amplificación), abrir el archivo xls que tenga «Quantification Amplification Results» (Resultados de amplificación de cuantificación) en su nombre.
 - Con Results Export (Cq Results), abrir el archivo xls que tenga «Quantification Cq Results» (Resultados Cq de cuantificación) en su nombre
- Cuando se hayan cargado todos los archivos xls, seleccionar «Load Protocol» (Cargar protocolo).

qTOWER³ (Analytik Jena):

- En la ventana de selección, deben seleccionarse los archivos XLS y CSV pertenecientes al ciclo:
 - En la exportación de la disposición de placas, debe abrirse el archivo XLS.
 - En la exportación de datos brutos, debe abrirse el archivo CSV.
- Cuando se hayan cargado los archivos XML y CSV, seleccionar «Load Protocol» (Cargar protocolo).

Evaluación del ensayo

La detección del ARN de SARS-CoV-2 se realiza utilizando dos regiones diana que se detectan en el mismo canal de fluorescencia (FAM).

Evaluación utilizando el software EURORealTime Analysis

Todos los resultados y resultados parciales del ensayo son determinados y emitidos por el software EURORealTime Analysis.

- Los resultados para los parámetros y todos los controles se muestran en formato de tabla en la pestaña «Details» (Detalles) y las curvas de amplificación correspondientes se muestran en la pestaña «Qualitative Analysis» (Análisis cualitativo).
- El software evalúa automáticamente los resultados, **no obstante, ¡el usuario siempre debe comprobarlos y validarlos!** Los resultados solo pueden guardarse después de la aprobación/validación final del usuario.
- Después de que el usuario haya aprobado los resultados en la pestaña «Details» (Detalles), la lista que resume los resultados para SARS-CoV-2 se indica en la pestaña «Result Summary» (Resumen de resultados), incluidos todos los controles.
- Impresión de resultados:
Los resultados con los parámetros de SARS-CoV-2 y CI en la pestaña «Details» puede imprimirse con fines de documentación de forma íntegra (botón «Print parameters» [Imprimir parámetros]) o por partes (botón «Print selected parameters» [Imprimir parámetros seleccionados]). Si se activa la casilla «Show Amplification Curves» (Mostrar curvas de amplificación), los diagramas pueden integrarse en el informe de resultados. Además el resumen de la lista de resultados en la pestaña «Result Summary» (Resumen de resultados) puede imprimirse de forma íntegra (botón «Print results» [Imprimir resultados]) o por partes (botón «Print selected results» [Imprimir resultados seleccionados]). En esta vista, solo se muestra el resultado para el parámetro SARS-CoV-2.



Nota: Solo pueden imprimirse los resultados aprobados.

EUROIMMUN recomienda la siguiente evaluación de resultados:

Muestras de pacientes

detectado: La muestra indica una señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2».

no detectado: La muestra no indica ninguna señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2».

no válido: Los siguientes motivos son posibles:

- No se detectó el control interno (CI).
- El control negativo externo no es válido.
- El control positivo externo no es válido.

Control positivo (CP)

válido: El control positivo indica una señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2».

no válido: El control positivo no indica ninguna señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2».

Control negativo (CN)

válido: El control negativo no indica ninguna señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2»; el CI indica la esperada señal de amplificación.

no válido: El control negativo indica una señal de amplificación para ARN de SARS-CoV-2 en «SARS-CoV-2»; el control negativo no indica ninguna señal de amplificación o esta está inhibida para el CI.

Control interno (CI)

detectado: La muestra indica la esperada señal de amplificación para el control interno.

no detectado: La muestra no indica la esperada señal de amplificación para el control interno.

Nota: Si la señal del CI no muestra la señal de amplificación esperada, pero aumenta claramente el valor Cp y/o una reducción de la intensidad de la fluorescencia, puede indicar errores durante la extracción y/o la inhibición de la RCP. En estos casos, el software EURORealTime Analysis evalúa la señal del CI como «no detectado».

Nota: Una muestra que indica un resultado ambiguo se destaca en naranja en la pestaña de información general. El resultado está en una zona dudosa y el clasificador no puede interpretarlo con fiabilidad por motivos metodológicos. La curva correspondiente se etiqueta con diamantes naranjas en la pestaña «Qualitative Analysis» (Análisis cualitativo). EUROIMMUN recomienda repetir el análisis para esta muestra.

Explicaciones adicionales para los resultados del ensayo:

En casos especiales, se anexan las siguientes notas al pie a los resultados del ensayo:

¹ Datos de control fuera de especificación. Posibles motivos: el CI de esta muestra no se ha detectado, el CP y/o CN de el ensayo no es válido.

² Resultado modificado por el usuario.

• Transferencia de resultados a LIMS:

Los resultados pueden transferirse a un LIMS conectado. Solo se transfieren los resultados de las muestras cuyos análisis fueron asignados por el LIMS conectado.

- Hacer clic en el botón «Transfer All to LIMS» (Transferir todo a LIMS) «Transfer Selection to LIMS» (Transferir selección a LIMS).



- Los resultados del análisis de todas las muestras de pacientes guardadas en el LIMS se transfieren al LIMS.
- Una transferencia realizada correctamente se identifica en el símbolo de estado del LIMS.

Evaluación con el software del real-time PCR cycler utilizado

EUROIMMUN recomienda los siguientes ajustes:

- LightCycler® 480 II (Roche):

Interpretación de los datos mediante la opción «Abs Quant/2nd Derivative Max»

Nota: Para una correcta evaluación de la señal del CI, debe utilizarse la propia «Color Compensation» (compensación de color) del software para el CI (filter comb 533-580). Para ello, hacer clic en la flecha al lado del botón «Colour Comp» (Compensación del color) y seleccionar «In Database» (En base de datos). En la ventana de selección, elegir «Universal CC FAM(510) – VIC(580)» y confirmar con la casilla de verificación. En la ventana de selección, confirmar «FAM (465-510)» and «VIC / HEX / Yellow555 (533-580)» como los canales que se compensarán con la casilla de verificación y, después, seleccionar el botón «Calculate» (Calcular).

- 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems):

Comprobar el ajuste predeterminado «automatic threshold» (umbral automático) y corregirlo, en caso necesario, ajustando el valor del umbral.

- CFX 96 Touch (Bio-Rad):

Comprobar el ajuste predeterminado «Single Threshold» (Umbral individual) y corregirlo, en caso necesario, ajustando el valor del umbral.

- qTOWER³ (Analytik Jena):

Comprobar y, en caso necesario, ajustar los ajustes previos «Auto Threshold» (Umbral automático) y «Baseline correction» (Corrección de base de referencia).

Nota: Para que la evaluación sea correcta, utilizar la compensación de color del software «Standard» (qPCRsoft 4.0) o «Standard1» (qPCRsoft 4.1).

- Rotor-Gene Q (Qiagen):

Seleccionar o comprobar y ajustar los ajustes «Dynamic Tube» (Tubo dinámico), «Slope Correct» (Corrección de inclinación) y «Umbral» (Verde: 0,06; Amarillo: 0,1).

EUROIMMUN recomienda la siguiente evaluación de resultados:

	SARS-CoV-2 FAM (465-510)	CI VIC/HEX/Yellow	Resultado
Muestra	-	+	ARN de SARS-CoV-2 no detectado
	-	-/inhibido ⁵	resultado no válido ya que no hay ninguna señal de amplificación o esta está inhibida para el control interno
	+	-/+	ARN de SARS-CoV-2 detectado
Control positivo	+	-/+	válido
	-	-/+	no válido ⁶
Control negativo	-	+	válido
	-	-/inhibido ⁷	resultado no válido ya que no hay ninguna señal de amplificación o esta está inhibida para el control interno ⁶
	+	-/+	no válido, contaminación ⁶

⁵ Si no se detecta ninguna señal de amplificación para el parámetro y, al mismo tiempo, no hay ninguna señal de amplificación o esta está inhibida para el CI, el resultado del ensayo debe evaluarse como «no válido».

⁶ Si el control negativo y/o el control positivo muestran un resultado no válido, todos los resultados del ensayo deben evaluarse como «no válidos».

⁷ Si el control negativo no muestra ninguna señal de amplificación o esta está inhibida para el CI, todos los resultados deben evaluarse como «no válidos».



Aviso: Si la señal de CI muestra un claro aumento del valor Cp y/o una reducción de la intensidad de la fluorescencia, esto puede indicar un error durante la extracción y/o la inhibición de la RCP.

Aviso general para la evaluación: EUROIMMUN recomienda repetir los análisis de todas las muestras que muestren una curva ambigua o atípica y, por consiguiente, que no permiten una interpretación precisa. Un resultado negativo no descarta una infección. Incluso en presencia de una infección, una muestra puede contener material patógeno insuficiente. Para el diagnóstico hay que tener siempre en cuenta, además del resultado obtenido aquí, el cuadro clínico del paciente.

Características de rendimiento analíticas

Especificidad/reactividad cruzada analítica: La especificidad del sistema de ensayo se garantiza mediante el diseño especial y del iniciador, así como con las condiciones de RCP (PCR) indicadas en el manual de instrucciones.

Todos los iniciadores y sondas utilizadas se ajustaron mediante análisis de comparación de secuencias a posibles homologías de todas las secuencias disponibles en el banco de datos «nr» del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (versión de 13 febrero de 2020) para descartar posibles reacciones cruzadas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Además, se analizaron los siguientes patógenos que pueden aparecer en el tracto respiratorio o están estrechamente emparentados con el SARS-CoV-2, utilizando ácidos nucleicos (1 ng/reacción) en el sistema de RCP: Virus de la gripe A, virus sincicial respiratorio A, virus paragripales 1-3, Rhinovirus, coronavirus NL63; coronavirus MERS, coronavirus OC43, coronavirus SARS HKU39849, coronavirus 229E, coronavirus HKU1 así como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Bordetella pertussis*.

De los siguientes patógenos se analizaron cantidades variables de ácido nucleico <1 ng/reacción: Virus de la gripe B, Enterovirus 71, virus sincicial respiratorio B, virus paragripales 4, Adenovirus 5, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pneumocystis jirovecii*. No se detectó ninguna reacción cruzada en ningún caso.

Para descartar reacciones cruzadas con ADN o ARN genómico, se utilizaron cada vez 100 ng/reacción. No se detectó ninguna reacción cruzada en ningún caso.

La especificidad analítica se analizó además en el marco del estudio de evaluación (véase más abajo).

Sensibilidad/sensibilidad de detección analítica: Los iniciadores y sondas utilizados en el sistema de ensayo se desarrollaron sobre la base de la siguiente secuencia:

Patógeno	Entrada de base de datos
SARS-CoV-2	NC_045512.2

Además, se tuvieron en cuenta todas las entrada de la base de datos del SARS-CoV-2 disponibles hasta el 26 de marzo de 2020⁸. Los números de referencia hacen referencia a la entrada en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El límite de detección inferior (Limit of Detection, LoD) en relación con la muestra de ARN se determinó con ARN específico del SARS-CoV-2 cuantificado (transcripciones in vitro [IVT]). El límite de detección se confirmó en tres ensayos independientes con tres lotes independientes, cada uno con 21 réplicas en presencia de 200 ng de ácido nucleico humano en $\geq 95\%$ de las preparaciones. El límite de detección inferior se entiende como el límite de detección mínimo. Generalmente, con el sistema de ensayo también se detectaron realmente algunas copias (cp) de ARN.

⁸ La secuencia de referencia del SARS-CoV-2 muestra una discrepancia para una base dentro de un sitio de unión de la imprimación del ORF1ab en comparación con la cepa con el número de acceso LR757997. No obstante, esta cepa está amplificada a través del sistema de detección del gen N, por lo que su detección es fiable en cualquier caso. La amplificación con el sistema de detección ORF1ab-gene, no obstante, puede verse obstaculizado. Como consecuencia, el límite de detección inferior para esta cepa puede desviarse del valor dado.



Analito	Límite de detección
SARS-CoV-2-IVT	1 cp/μl de eluato

Mediante una serie de dilución de ARN específico del SARS-CoV-2-cuantificado (IVT), se calculó además el límite de detección inferior que se alcanza con una probabilidad del 95% con la ayuda de un análisis Probit. Los resultados se indican en la siguiente tabla:

Concentración de ARN [cp/μl de eluato]	Número de réplicas	Número de detecciones positivas
10	21	21
5	21	21
2	21	21
1	21	21
0,5	21	18
0,2	21	15
0,1	21	12
0,05	21	4
0,02	21	2

El límite de detección inferior calculado según el análisis Probit es, por consiguiente, de 0,68 cp/μl (intervalo de confianza del 95%: de 0,43 cp/μl a 1,43 cp/μl).

Reproducibilidad: Los ensayos para la reproducibilidad se realizaron con tres muestras: Como muestras positivas se utilizaron soluciones de IVT que contenían las secuencias objetivo para la detección del SARS-CoV-2 en el número de copias del límite de detección inferior y de 2000 cp/μl. Además, se utilizó una muestra negativa que no contenía RNA del SARS-CoV-2.

Reproducibilidad intraensayo: Las muestras de referencia mencionadas anteriormente fueron analizadas en 10 preparaciones paralelas en un ensayo por dos procesadores distintos. Los resultados se correspondieron en todos los casos con la precaracterización. El coeficiente de variación de todos los análisis de muestras del valor Cp medido con una concentración de 2000 cp/μl fue del 0,22%.

Reproducibilidad interensayo: Las muestras se analizaron en cinco ensayos independientes, realizados dos veces por dos procesadores distintos realizados en cinco días distintos, tres veces cada una. Los resultados se correspondieron en todos los casos con la precaracterización. El coeficiente de variación de todos los análisis de muestras del valor Cp medido con una concentración de 2000 cp/μl fue del 0,2%.

Reproducibilidad interlotes: Las muestras se analizaron en tres ensayos independientes, realizados dos veces por dos procesadores distintos utilizando tres lotes diferentes, tres veces cada una. Los resultados se correspondieron en todos los casos con la precaracterización. El coeficiente de variación de todos los análisis de muestras del valor Cp medido con una concentración de 2000 cp/μl fue del 0,18%.

Interferencias: La influencia de las siguientes sustancias se analizó mediante la adición a las muestras antes de la extracción de ARN utilizando el QIAamp® Viral RNA Mini Kit, el CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 y el CMG-2017 Prepito Viral DNA/RNA300 Kit (la concentración indicada entre paréntesis se refiere a la muestra que se va a extraer): Solución de lidocaína al 2% (5%), solución de 2benzocaína al 20% (5%), solución de digluconato de clorhexidina al 0,2% (10%), 100 000 U.I./ml de solución de nistatina (10%), guaifenesina (5 mg/ml), spray nasal (principio activo: Clorhidrato de xilometazolina, 10%), solución salina (0,9%, 3,5%), sangre (5% QIAamp® Kit, 0,5% chemagic Kit y Prepito Kit), 20 mg/g de gel de miconazol (10%), crema de aciclovir (10%). Ninguna de las sustancias mencionadas en las concentraciones analizadas tras la purificación según las instrucciones con los kits denominados mostró ningún efecto inhibitor en la detección del SARS-CoV-2 en muestras en el triple del límite de detección inferior. No puede descartarse que una aplicación incorrecta del procedimiento de preparación tenga influencia sobre el resultado del análisis. EUROIMMUN recomienda, utilizando el QIAamp® Viral RNA Mini Kit, realizar el paso de centrifugación adicional antes de la elución del ARN según la recomendación del fabricante para eliminar restos de etanol de la purificación, ya que el etanol tiene un fuerte efecto inhibitor en la reacción de RCP (PCR), por lo que puede causar resultados del ensayo falsamente negativos o no válidos.



Además, se demostró que los microorganismos y virus que pueden aparecer en el tracto respiratorio o estar estrechamente emparentados con el patógeno a detectar, así como los ácidos nucleicos humanos, no interfieren con la detección del SARS-CoV-2. Para tal fin, la detección del SARS-CoV-2 se confirmó en el triple del límite de detección inferior con el presente equipo de ensayo con la presencia de ácidos nucleicos genómicos de los siguientes organismos y virus: Virus de la gripe A, virus sincicial respiratorio A, virus paragripales 1-3, Rhinovirus, coronavirus NL63; coronavirus MERS, coronavirus OC43, coronavirus SARS HKU39849, coronavirus 229E, coronavirus HKU1, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Bordetella pertussis*. De los siguientes patógenos se analizaron cantidades variables de ácido nucleico <1 ng/reacción: Virus de la gripe B, Enterovirus 71, virus sincicial respiratorio B, virus paragripales 4, Adenovirus 5, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pneumocystis jirovecii*. Además, se analizó ADN y ARN genómico humano (100 ng/reacción respectivamente).

Características de rendimiento clínicas

Sensibilidad y especificidad diagnósticas de los frotis faríngeos como material de muestra:

Se evaluó en qué medida coincidían los resultados obtenidos con el ensayo EURORealTime SARS-CoV-2 para un colectivo de muestras clínicas respecto a los obtenidos con otros ensayos de referencia del SARS-CoV-2. De forma complementaria a los análisis realizados para la determinación de los parámetros de rendimiento, el sistema de ensayo se sometió a distintos factores de influencia preanalíticos (toma de muestras, calidad de muestras, purificación de ARN).

SARS-CoV-2:

		Precaracterización externa con SARS-CoV-2 Ensayo de referencia Real-Time-PCR ⁹	
		positivo	negativo
Resultados EURORealTime SARS-CoV-2	positivo	107	0
	negativo	2	55

Concordancia positiva: 98,2%
Concordancia negativa: 100%

Para los análisis se utilizaron muestras de ARN obtenidas de frotis faríngeo. Para la extracción se utilizaron: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen; 25 muestras), el NucleoMag[®] VET Kit (Macherey-Nagel; 114 muestras) y el CMG-2015 Prepito Viral DNA/RNA200 Kit (Chemagen; 25 muestras) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. No obstante, al utilizar el CMG-2015 Prepito Viral DNA/RNA200 Kit, se añadieron 300 µl de tampón de lisis a 300 µl de muestra a diferencia de las instrucciones del fabricante.

Para la evaluación del ensayo EURORealTime-SARS-CoV-2 tras la extracción de las muestras con el sistema de extracción automatizado CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96, se analizó en qué medida los resultados obtenidos para un colectivo de muestras clínicas coincidía con los determinados externamente.

		Precaracterización externa con SARS-CoV-2 Ensayo de referencia Real-Time-PCR ¹⁰	
		positivo	negativo
Resultados EURORealTime SARS-CoV-2	positivo	51	1
	negativo	2	40

Concordancia positiva: 96,2%
Concordancia negativa: 97,6%

⁹ Se utilizó el kit de ensayo de TIB MOLBIOL.

¹⁰ Se utilizó el kit de prueba ViroQ Rapid SARS-CoV-2 de BAG Diagnostics.



Para los análisis se utilizaron muestras de ARN obtenidas de frotis faríngeo. El estudio se realizó con el equipo Real-Time-PCR CFX 96 Touch (Bio-Rad) utilizando las Multiplate™ 96-Well PCR Plates, low profile, unskirted, clear, Bio-Rad, ref. MLL9601.

Sensibilidad y especificidad diagnósticas de la saliva como material de muestra

Se evaluó en qué medida coincidían los resultados obtenidos a partir de saliva con el ensayo EURORealTime SARS-CoV-2 para un colectivo de muestras clínicas con los de los frotis faríngeos extraídos paralelamente de los mismos pacientes.

SARS-CoV-2:

68 muestras (saliva/frotis nasofaríngeos)		Frotis nasofaríngeos con ensayo de referencia SARS-CoV-2 Real-Time-PCR ¹¹	
		positivo	negativo
Saliva, Resultados con EURORealTime SARS-CoV-2	positivo	35	1
	negativo	12	20

Concordancia positiva: 74,5%

Concordancia negativa: 95,2%

Para los análisis se utilizaron muestras de ARN obtenidas de saliva. El colectivo contenía 23 muestras de saliva pura y 45 muestras de saliva en tampón de estabilización Zymo DNA/RNA Shield. Para la extracción se utilizó el Chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96. El estudio se realizó con el equipo Real-Time-PCR CFX 96 Touch (Bio-Rad) utilizando las Multiplate™ 96-Well PCR Plates, low profile, unskirted, clear, Bio-Rad, ref. MLL9601, así como el LightCycler® 480 II (Roche) con la LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, blanca, Roche, ref. 04729692001.

A menos que se indique lo contrario, todos los estudios mencionados anteriormente se realizaron con el LightCycler® 480 II (Roche) utilizando el LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, blanco, Roche, ref. 04729692001.

La transferabilidad de los resultados de validación se mostraron para los aparatos de RCP en tiempo real: 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), CFX 96 Touch (Bio-Rad), qTOWER³ (Analytik Jena) y Rotor-Gene Q (Qiagen), así como los pocillos de reacción de RCP descritos anteriormente («Materiales y equipos adicionales [no suministrados en el equipo de ensayo]»).

Limitaciones del procedimiento

- Para el diagnóstico hay que tener siempre en cuenta, además del resultado diagnóstico molecular, el cuadro clínico del paciente. El resultado de la analítica de RCP debe evaluarse en relación con el de otros métodos diagnósticos.
- Los datos de rendimiento se generaron en base de la secuencia de referencia (véase párrafo Sensibilidad/Límite de detección). En las pruebas de biología molecular, no se pueden garantizar los datos de rendimiento para las variantes de secuencia que difieren de la(s) secuencia(s) de referencia en los sitios de unión de los cebadores y sondas.
- Un resultado negativo no descarta una infección. Incluso en presencia de una infección, una muestra puede contener material patógeno insuficiente para una detección.
- Con la ayuda del Real-Time-PCR, se detecta el material genético del patógeno. Este método de detección no debe equipararse necesariamente con la detección de patógeno intacto reproducible. En determinadas circunstancias, el material genético del patógeno todavía puede detectarse mediante un tratamiento correcto.

¹¹ Se utilizó el kit de ensayo TaqPath™ COVID-19 RT-PCR (ThermoFisher) o el kit de ensayo EURORealTime SARS-CoV-2 (EUROIMMUN).



- Un rendimiento de aparato no conforme a las especificaciones, así como las desviaciones respecto a la realización del ensayo descrita, condiciones del lugar, materiales, aparatos especificados y/o el material de muestra recomendado puede causar diferencias en los resultados obtenidos cumpliendo todas las especificaciones. Los controles internos y externos previstos son un medio auxiliar para la detección de fallos, pero no pueden detectar cada posible fallo. Es responsabilidad de cada laboratorio validar todas las modificaciones realizadas, así como asegurar el cumplimiento de las especificaciones de los aparatos.
- Generalmente pueden interferir sustancias en la muestra con la detección del SARS-CoV-2 y reducir la sensibilidad de detección, lo que puede causar un resultado no válido o incluso falsamente negativo. Para los tres kits de extracción: chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96, Prepito Viral DNA/RNA300 Kit y QIAamp® Viral RNA Mini Kit, se pudo demostrar que las sustancias analizadas no tenían una gran influencia en la sensibilidad de detección hasta la concentración indicada. Una concentración de sangre superior al 0,5% en la muestra primaria puede tener una fuerte influencia en la sensibilidad de detección y en la robustez con el uso de los kits chemagic y Prepito.
- Una alta calidad de la muestra de ácido nucleico utilizada es un requisito importante para el valor diagnóstico del resultado del ensayo. Si la muestra, la obtención y el almacenamiento de la muestra o la preparación y el almacenamiento del ácido nucleico no son adecuados, puede causar resultados no válidos o incluso falsos. Es responsabilidad de cada laboratorio asegurar y, en caso necesario, validar la idoneidad de la muestra y de los pasos preanalíticos.

Literatura

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2.** Nat Microbiol. 2020; 5(4): 536-44
2. Borges do Nascimento IJ, von Groote TC, O'Mathúna DP, Abdulazeem HM, Henderson C, et al. International Task Force Network of Coronavirus Disease 2019 (InterNetCOVID-19). **Clinical, laboratory and radiological characteristics and outcomes of novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection in humans: A systematic review and series of meta-analyses.** PLoS One. 2020; 15(9): e0239235
3. Gralinski LE, Menachery VD. **Return of the Coronavirus: 2019-nCoV.** Viruses 2020, 12(2), 135
4. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. **Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection.** ACS Nano. 2020 Apr 9.
5. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. **Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review.** Ann Intern Med. 172(11): 726-34
6. Xiao SY, Wu Y, Liu H. **Evolving status of the 2019 novel coronavirus Infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring.** J Med Virol. 2020; 92(5): 464-7
7. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siaty DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, et al. **Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study.** Eur Arch Otorhinolaryngol. 2020; 277(8): 2251-61
8. Sette A, Crotty S. **Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19.** Cell. 2021; 184(4): 861-80
9. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, et al. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients.** Emerg Infect Dis. 2020; 26(7)
10. Swadling L, Maini MK. **T cells in COVID-19 - united in diversity.** Nat Immunol. 2020 Sep 7
11. Health Protection Agency. **Good Laboratory Practice when Performing Molecular Amplification Assays.** National Standard Method QSOP. 2018; Q 4, Issue no: 5.



12. Dieffenbach CW, Dveksler GS. **Setting up a PCR laboratory.** PCR Methods Appl. 3 (1993) S2-S7.
13. Prince AM, Andrus L. **PCR: how to kill unwanted DNA.** Biotechniques 12 (1992) 358-360.
14. Robert Koch Institut: **Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2.** Mai 2021
(https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html, abgerufen am 21.05.2021)

Ayuda técnica

Si tiene problemas técnicos, póngase en contacto con nosotros a través de nuestro sitio web (<https://www.euroimmun.de/en/contact/>).

Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación	Símbolo	Explicación
	Mezcla de RCP A		Temperatura de almacenamiento
	Mezcla de RCP B		Sin abrir, utilizable hasta (AAAA-MM-DD)
	Control positivo		Fecha de fabricación (AAAA-MM-DD)
	Control interno		Fabricante
	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar el manual de instrucciones
	Designación del lote		Marcado CE
	Protegerlo de la luz solar		Número de pedido
	Contenido suficiente para <n> análisis		

