

## **Instrucciones de uso**

**RealStar<sup>®</sup>**

**MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0**

01/2017 ES

# RealStar®

## MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



391012



48



01 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Contenido

<b>1. Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Almacenamiento .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>7</b>
<b>5. Información general .....</b>	<b>8</b>
<b>6. Descripción del producto.....</b>	<b>9</b>
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	12
<b>7. Advertencias y precauciones .....</b>	<b>12</b>
<b>8. Procedimiento .....</b>	<b>14</b>
8.1 Preparación de las muestras .....	14
8.2 Preparación de la Master Mix .....	15
8.3 Preparación de la reacción .....	17
<b>9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>18</b>
9.1 Configuración .....	18
9.2 Detectores de fluorescencia .....	18
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	19
<b>10. Análisis de datos.....</b>	<b>19</b>
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	20
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas .....	20
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas .....	20
10.2 Interpretación de los resultados .....	21
10.2.1 Análisis cualitativo.....	21

<b>11. Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>22</b>
11.1 Sensibilidad analítica .....	22
11.2 Especificidad analítica.....	24
11.3 Precisión .....	24
11.4 Evaluación del diagnóstico .....	26
<b>12. Limitaciones .....</b>	<b>28</b>
<b>13. Control de calidad.....</b>	<b>29</b>
<b>14. Servicio técnico.....</b>	<b>29</b>
<b>15. Bibliografía .....</b>	<b>29</b>
<b>16. Marcas comerciales e información legal .....</b>	<b>30</b>
<b>17. Explicación de los símbolos .....</b>	<b>31</b>

## 1. Uso indicado

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de síndrome respiratorio por coronavirus de Oriente Medio (MERS-CoV).

## 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen[μl/vial]
Azul	Master A Target orf1a	4	60
Violeta	Master B Target orf1a	4	120
Azul	Master A Target upE	4	60
Violeta	Master B Target upE	4	120
Rojo	Positive Control	1	250
Verde	Internal Control	1	1000
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

## 3. Almacenamiento

- El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.

- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

## 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

### NOTA



**Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.**



**Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).**

## 5. Información general

En 2012, se descubrió por primera vez que el *síndrome respiratorio de por coronavirus de Oriente Medio*, MERS-CoV (antes conocido como: coronavirus humano del Erasmus Medical Center, HCoV-EMC), causaba una enfermedad grave en humanos [1, 2]. La detección del virus se realiza preferiblemente a través de muestras del tracto respiratorio inferior. Las muestras (bastoncillos) del tracto respiratorio superior mostraban tasas más bajas de detección de virus [3]. La Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés) recomienda el uso de dos pruebas de valoración de PCR independientes para la confirmación de los casos de MERS-CoV. [4].

Se han publicado diferentes pruebas de valoración de RT-PCR en tiempo real. Dos pruebas de valoración, una que fijaba como objetivo una región por encima del gen E (*upE*) y otro que fijaba como objetivo un marco abierto de lectura 1a (*orf1a*), mostraron la sensibilidad más alta [5,6]. El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se desarrolló tomando las dos pruebas diagnósticas descritas como base.

[1] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17:20290.

[2] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med 2012;367:1814–20.

[3] Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. Lancet 2013;381:2265–72.

[4] WHO. Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2013:[http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/MERS\\_Lab\\_recos\\_16\\_Sept\\_2013.pdf](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_Lab_recos_16_Sept_2013.pdf).

[5] Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17.

[6] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17.

### NOTA



**Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de análisis basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo pueda provocar resultados de falsos negativos.**

## 6. Descripción del producto

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio.

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se compone de dos tests, uno que fija como objetivo una región por encima del gen E (*upE*) y otro que fija como objetivo un marco abierto de lectura 1a (*orf1a*) del genoma MERS-CoV. La Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés) recomienda el uso de dos pruebas de valoración de PCR independientes para la confirmación de los casos de MERS-CoV. [5].

Ambas pruebas de valoración incluyen un sistema de amplificación heterólogo (Control interno) para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR utiliza la transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana específicas y sondas específicas para detectar el ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captoreadores de fluorescencia (quencher)

En ambos ensayos, las sondas específicas para ARN de MERS-CoV están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™. El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos ARN específico del virus de MERS-CoV y el Control interno de los canales detectores correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

Los oligonucleótidos incluidos en las dos tests los había publicado anteriormente Victor Corman et al. 2012a [6] y 2012 b [7]. Un test de RT-PCR fija como objetivo *orf1a* (Master A con tapones azules, el Master B correspondiente con tapones morados) y la otra fija como objetivo una región por encima del gen E (*upE*) (Master A con tapones azules, el Master B correspondiente con tapones morados).

Conforme a la definición de casos de la OMS (<http://www.who.int/>), la confirmación de laboratorio requiere dos resultados positivos de RT-PCR en objetivos independientes. Al hacer pruebas paralelas de muestras con El test de *upE* y de *orf1a*, que se incluyen en el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0, pueden cumplirse los requisitos de la OMS para la confirmación de caso de MERS-CoV de laboratorio.

Debido al ensamblaje molecular y la posible evolución de MERS-CoV, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de pruebas basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo puede provocar resultados de falsos negativos. Al incluir dos pruebas de valoración que fijan como objetivo diferentes regiones del genoma, el riesgo se reduce de manera significativa. En caso de que solo una de las dos pruebas de valoración incluidas en el kit dé resultado positivo, la muestra deberá someterse a una nueva prueba. **Es más, las muestras positivas deberían enviarse al laboratorio de referencia nacional para una prueba de confirmación.**

Sin embargo, en el caso de que las cepas evolucionen y acumulen mutaciones, podría ser necesaria una actualización de los conjuntos de cebadores/sondas.

El test consta de tres procesos en un solo tubo:

- Transcripción inversa del ARN diana y del Control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y Control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Cuatro reactivos Master
  - (Master A y Master B fijan como objetivo *orf1a*)
  - (Master A y Master B fijan como objetivo *upE*)
- Control interno
- Control postivo
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediante la PCR y la detección del ARN específico de MERS-CoV, y el Control interno en una configuración de reacción.

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

## 7. Advertencias y precauciones

*Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.*

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
  - Integridad
  - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetaje correcto
  - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto está limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.

- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNsas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de ADNsas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los translade de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después de la PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad.
- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0.

La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico.

La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

#### PRECAUCIÓN



***Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.***



***El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.***

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 8.2 Preparación de la Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse completamente, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 contiene un Control interno heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A ( <i>orf1a</i> o <i>upE</i> )	5 µl	60 µl
Master B ( <i>orf1a</i> o <i>upE</i> )	10 µl	120 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>16 µl</b>	<b>192 µl</b>



- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A ( <i>orf1a</i> o <i>upE</i> )	5 µl	60 µl
Master B ( <i>orf1a</i> o <i>upE</i> )	10 µl	120 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

**PRECAUCIÓN**

*Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.*



*Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.*

**8.3 Preparación de la reacción**

- ▶ Pipetee 15 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	15 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

## 9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

### 9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	25 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

### 9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
Específico de MERS-CoV ( <i>orf1a</i> ) ARN	<i>orf1a</i>	FAM™	(Ninguno)
Específico de MERS-CoV ( <i>upE</i> ) ARN	<i>upE</i>	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (Control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

## 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Fase	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	58	0:45
			-	72	0:15

## 10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

## 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

### 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Para que una serie de pruebas diagnósticas sea **válida**, deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección			
	FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>
Control positivo	+	+/-*	+	+/-*
Control negativo	-	+	-	+

\* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la prueba.

### 10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas es **no válida**(i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección				Interpretación del resultado
FAM™ <i>upE</i>	JOE™ <i>upE</i>	FAM™ <i>orf1a</i>	JOE™ <i>orf1a</i>	
+	+*	+	+*	Se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>upE</i> y <i>orf1a</i> . Envíe muestras positivas al laboratorio de referencia nacional para una prueba de confirmación
+	+*	-	+	Se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>upE</i> . No se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>orf1a</i> . Repita el test. Envíe la prueba al laboratorio de referencia nacional para una prueba de confirmación.
-	+	+	+*	Se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>orf1a</i> . No se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>upE</i> . Repita el test. Envíe la prueba al laboratorio de referencia nacional para una prueba de confirmación.
-	+	-	+	No se ha detectado ARN específico de MERS-CoV <i>upE</i> ni de MERS-CoV <i>orf1a</i> . La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de MERS-CoV.
-	-	-	-	Fallo de reactivo o inhibición de RT-PCR. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

\* La detección del Control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ARN de MERS-CoV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

## 11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se realizó en colaboración con expertos en coronavirus del grupo del Prof. Dr. Christian Drosten (Departamento de virología, Centro médico de la Universidad de Bonn, Alemania). Se utilizaron muestras de pacientes de un caso importado de Múnich, Alemania, así como ARN de MERS-CoV extraído de un cultivo de células como material positivo caracterizado. Se utilizaron transcripciones *in vitro* específicas de MERS-CoV *upE* y *orf1a* de concentraciones conocidas con fines cuantitativos.

### 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias por  $\mu\text{l}$  del eluido) de moléculas de ARN específico de *orf1a* o *upE* que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de transcripciones *in vitro* (IVT) específicas de *orf1a* y *upE* de una concentración conocida.

Tabla 1: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de *orf1a*

Conc. [IU/ $\mu\text{l}$ ]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	12	92
0,316	13	7	54
0,100	13	1	8
0,032	13	1	8
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

Tabla 2: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de *upE*

Conc. [IU/ $\mu\text{l}$ ]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	13	13	100
3,162	13	13	100
1,000	13	13	100
0,316	13	6	46
0,100	13	3	23
0,032	13	0	0
0,010	13	0	0
0,003	13	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN específico de *orf1a*, la sensibilidad analítica es de 0,93 copias/ $\mu\text{l}$  [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,70 - 1,41 copias/ $\mu\text{l}$ ]
- Para la detección de ARN específico de *upE*, la sensibilidad analítica es de 0,54 copias/ $\mu\text{l}$  [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,40 - 0,97 copias/ $\mu\text{l}$ ]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de MERS-CoV.

La especificidad analítica del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de diferentes patógenos que se relacionan con MERS-CoV o que pueden causar síntomas similares al MERS-CoV.

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Coronavirus NL63
- Coronavirus OC43
- Coronavirus 229E
- Coronavirus HKU-1
- Virus de la gripe A H3N2
- Virus de la gripe A H1N1
- Virus de la gripe B
- Enterovirus 71
- Rhinovirus 16
- Virus parainfluenza 1
- Virus parainfluenza 2
- Virus parainfluenza 3
- Virus parainfluenza 4
- Virus sincitial respiratorio humano A
- Virus sincitial respiratorio humano B
- Metapneumovirus humano A
- Metapneumovirus humano B

## 11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación, basándose en valores de ciclo de umbral de ( $C_t$ ). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 3: Datos de precisión para la detección específica del ARN de *orf1a* y *upE*

<i>orf1a</i> y <i>upE</i>		Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	<i>orf1a</i>	28,96	0,08	0,29
	<i>upE</i>	29,35	0,08	0,28
Variabilidad intertest	<i>orf1a</i>	28,69	0,31	1,08
	<i>upE</i>	29,43	0,12	0,40
Variabilidad interlote	<i>orf1a</i>	28,49	0,14	0,49
	<i>upE</i>	29,14	0,39	1,34
Variabilidad total	<i>orf1a</i>	28,71	0,18	0,62
	<i>upE</i>	29,31	0,19	0,67

Tabla 4: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	29,39	0,160	0,56
Variabilidad intertest	29,80	0,558	1,87
Variabilidad interlote	29,72	0,632	2,13
Variabilidad total	29,64	0,450	1,52

## 11.4 Evaluación del diagnóstico

La evaluación del diagnóstico del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se realizó en el Instituto de virología, Centro médico de la Universidad de Bonn, Alemania.

Se analizaron 19 muestras diferentes de un paciente con pruebas de valoración internas específicos para *upE* y *orf1a* y las pruebas de valoración específicos para *upE* y *orf1a* como parte del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0.

De ellos, 8 dieron positivo con las pruebas de valoración internas y con el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 7 dieron negativo con las pruebas de valoración *internas* además de con el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0; 4 dieron un resultado discrepante (3 muestras dieron positivo solo con el RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 y 1 dio positivo solo con las pruebas de valoración *internas*).

Los resultados discrepantes se generaron todos con muestras de muy baja carga vírica indicada por un alto valor de  $C_t$ , lo que representa más una variación estadística en el límite de detección que una diferencia real de sensibilidad.

Tabla 5: Muestras del paciente probadas con RT-PCR específico para MERS-CoV y RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

Muestra	Día después inicio	<i>interno (upE)</i> <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>orf1a</i> ) <sup>1</sup>
Tubo de aspiración, aclarado con PBS (tampón fosfato salino)	16	40,00	40,00	37,74
Tubo de aspiración, pieza de filtro	16	35,80	35,00	36,17
LBA	12	34,06	31,82	32,44
LBA	12	34,96	32,67	33,16
LBA	14	35,99	34,60	34,82
LBA	13	-	-	-
Exudado, boca <sup>2</sup>	16	-	36,60	-
Exudado, boca	16	-	-	-

Muestra	Día después inicio	<i>interno (upE)</i> <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>upE</i> ) <sup>1</sup>	RealStar® MERS-CoV ( <i>orf1a</i> ) <sup>1</sup>
Exudado, boca	16	-	-	-
Exudado, nariz <sup>3</sup>	16	38,38	-	-
Exudado, nariz <sup>2</sup>	16	-	40,00	40,00
Exudado, boca	16	-	-	-
Heces	12	38,98	31,69	31,78
Heces	12	39,37	40,00	-
Heces	16	40,00	40,00	-
Orina <sup>2</sup>	12	-	40,00	37,86
Orina (catéter)	12	-	-	-
Orina (catéter)	13	-	-	-
Catéter venoso central, tubo aclarado	12	-	-	-

<sup>1</sup> los números de las columnas indican el valor de  $C_t$  respectivo de las series positivas de RT-PCR en tiempo real

<sup>2</sup> resultado positivo solo con el test comercial

<sup>3</sup> resultado positivo solo con el test interna

## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la RT-PCR (p.ej. heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones diana del genoma de MERS-CoV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

## 13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

## 14. Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)  
**Teléfono:** +49-(0)40-5480676-0

## 15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.<sup>a</sup> edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G. and Steven MO. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

## 16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

## 17. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

