

Instrucciones de uso

FlexStar[®]

**SARS-CoV-2 Type & FLU
RT-PCR Detection Mix 1.5**

02/2022 ES

Respiratory

FlexStar[®]

SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5

Para utilizar con

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96[™] Dx System (Bio-Rad)
CFX96[™] Deep Well Dx System (Bio-Rad)



FS0021515



384



02 2022



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

Contenido

1.	Acerca de estas instrucciones de uso.....	6
2.	Uso indicado.....	6
3.	Contenido del producto.....	7
4.	Almacenamiento	8
5.	Información general.....	9
6.	Descripción del producto.....	10
6.1	Componentes	11
6.2	Instrumentos de PCR en tiempo real	12
6.3	Tipos de muestras	12
7.	Material necesario, pero no proporcionado	13
8.	Advertencias, precauciones y limitaciones.....	14
9.	Procedimiento	16
9.1	Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras	16
9.2	Preparación de las muestras.....	17
9.3	Configuración de master mix.....	19
9.4	Configuración de reacción.....	20
10.	Programación del instrumento de PCR en tiempo real.....	21
10.1	Configuración	22
10.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	22
10.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia.....	23
11.	Análisis de datos.....	23
11.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas.....	24
11.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas.....	24

11.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas.....	24
11.2	Interpretación de los resultados	24
11.2.1	Análisis cualitativo	25
12.	Evaluación del rendimiento	26
12.1	Hisopos respiratorios.....	26
12.1.1	Sensibilidad analítica.....	26
12.1.2	Especificidad analítica.....	30
12.1.2.1	Muestras negativas	31
12.1.2.2	Sustancias interferentes.....	31
12.1.2.3	Reactividad cruzada.....	32
12.1.3	Inclusividad.....	33
12.1.4	Precisión.....	36
12.1.5	Índice de fallo total.....	38
12.1.6	Arrastre.....	38
12.1.7	Rendimiento clínico	39
13.	Eliminación	41
14.	Control de calidad.....	41
15.	Asistencia técnica.....	42
16.	Bibliografía	42
17.	Marcas comerciales y aviso legal.....	43
18.	Explicación de los símbolos	44
19.	Historial de revisiones.....	46

1. Acerca de estas instrucciones de uso

En este manual, los términos PRECAUCIÓN y NOTA tienen los significados siguientes:

PRECAUCIÓN



Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Contacte con el soporte técnico de Altona Diagnostics para recibir ayuda.

NOTA



Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.

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

2. Uso indicado

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de ARN específico de coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) y virus de la gripe en muestras de hisopos respiratorios humanos. La detección de SARS-CoV-2 se basa en la detección paralela del gen E de linaje B de betacoronavirus (que incluye el SARS-CoV-2) y el gen S del SARS-CoV-2.

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 está previsto para usarse como ayuda para el diagnóstico de la infección de SARS-CoV-2 y virus de la gripe.

Los resultados generados con el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 deben interpretarse junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se ha diseñado para que lo utilicen usuarios profesionales formados en técnicas de biología molecular y procedimientos de diagnósticos *in vitro*.

3. Contenido del producto

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contiene los siguientes componentes:

Tabla 1: Componentes del kit

Color de la tapa	Componente	Número de tubos	Volumen nominal [μl/tubo]
Azul	Detection Mix ¹⁾	8	240
Rojo	PC ²⁾	2	250
Blanco	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Contiene material biológico de origen animal

²⁾ Positive Control (control positivo) [ARN específico de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y del virus de la gripe]

³⁾ No Template Control (control negativo)

PRECAUCIÓN



Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes para ver si están completos en cuanto a número, tipo y relleno. No utilice un producto incompleto o defectuoso, pues el rendimiento del mismo podría verse afectado.

4. Almacenamiento

- El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se envía en hielo seco. Los componentes del producto deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no están congelados en el momento de la recepción, o si se han puesto en peligro tubos durante el envío, póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics para obtener ayuda (consulte el capítulo 15. Asistencia técnica).
- Todos los componentes deben almacenarse entre los -25 °C y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada del componente Detection Mix, ya que podría repercutir en el rendimiento del producto.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada del Positive Control (PC, control positivo) y del No Template Control (NTC, control negativo) (más de 4 veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto.
- El almacenamiento a temperatura ambiente (máx. +30 °C) no debe superar un período de 2 horas.
- Proteja de la luz el componente Detection Mix.

PRECAUCIÓN



Unas condiciones de almacenamiento inadecuadas podrían afectar al rendimiento del producto.

PRECAUCIÓN



No exceda la secuencia de congelación y descongelación ni las duraciones de manipulación especificadas en estas instrucciones de uso, ya que podría afectar al rendimiento del producto.

PRECAUCIÓN



No use productos cuya fecha de caducidad haya expirado. El uso de productos caducados puede afectar al rendimiento del producto.

5. Información general

SARS-CoV-2

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que pertenece a la familia *Coronaviridae*, género Betacoronavirus, subgénero lineaje B.

El SARS-CoV-2 surgió en la región china de Wuhan en diciembre de 2019 y se ha extendido por todo el mundo en un periodo de 2 meses. El virus inicialmente se denominó 2019-nCoV (nuevo coronavirus) y el «International Committee on Taxonomy of Viruses» (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) cambió el nombre a SARS-CoV-2 el 11/02/2020. Al mismo tiempo, la OMS llamó COVID-19 a la enfermedad causada por el SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta la rápida escalada y propagación de la COVID-19 en todo el mundo, la OMS declaró el brote como una pandemia el 12/03/2020.

El SARS-CoV-2 es muy contagioso y se transmite mediante aerosoles y gotitas, y provoca infecciones respiratorias agudas con síntomas similares a los de la gripe. En personas mayores y personas con enfermedades preexistentes principalmente, aunque no exclusivamente, la infección por SARS-CoV-2 puede provocar una enfermedad grave y potencialmente mortal. Se han notificado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muertes [1,2].

Virus de la gripe

La gripe (también conocida como influenza) es una enfermedad infecciosa causada por un virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae* (virus gripales) [3,4]. Los virus gripales se caracterizan por el cambio constante de la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) de sus principales antígenos superficiales (deriva antigénica) [5]. Infectan a aves y mamíferos por vía aérea [6]. Los virus gripales A y B provocan varias infecciones graves, predominantemente del tracto respiratorio, con fiebre y tos como síntomas más frecuentes. En casos más graves, la gripe provoca neumonía, que puede resultar mortal, particularmente en niños y personas mayores [7].

NOTA



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

6. Descripción del producto

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 es un test diagnóstico *in vitro*. Al usarlo en combinación con el FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, permite la detección cualitativa y la diferenciación de ARN específico de linaje B de betacoronavirus (linaje B-βCoV, gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y virus de la gripe (A+B) en muestras de hisopos respiratorios humanos.

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se basa en la tecnología de RT-PCR en tiempo real, que utiliza la reacción de la transcriptasa inversa (RT) para convertir ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias objetivo específicas de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y gripe (A+B) y sondas específicas objetivo etiquetadas con fluorescencia para la detección del ADNc amplificado.

Además de los sistemas de detección y amplificación específicos de ARN del linaje B-βCoV, SARS-CoV-2 y el virus de la gripe, el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 incluye oligonucleótidos para la amplificación y la detección de un control interno (IC, AltoStar® Internal Control 1.5). El IC se añade automáticamente al principio del procedimiento de purificación del ácido nucleico en el AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) (en lo sucesivo abreviado como AltoStar® AM16). Para obtener más detalles, consulte las instrucciones de uso del AltoStar® Internal Control 1.5.

Las sondas específicas para ARN de linaje B-βCoV (gen E) se etiquetan con el fluoróforo ROX™, las sondas específicas para ARN de SARS-CoV-2 (gen S) se etiquetan con el fluoróforo Cy5 y las sondas específicas para ARN de virus de la gripe (A+B) se etiquetan con el fluoróforo FAM™, respectivamente. La sonda específica para el IC está marcada con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas conectadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S), virus de la gripe (A+B) y el IC en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

6.1 Componentes

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contiene reactivos suficientes para 384 reacciones. El producto consta de los siguientes componentes:

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Contiene material biológico de origen animal

²⁾ Positive Control (control positivo) [ARN específico de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y del virus de la gripe]

³⁾ No Template Control (control negativo)

Salvo por la polimerasa de ADN y la transcriptasa inversa, que se incluyen en el FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, el componente Detection Mix contiene todos los reactivos (solución amortiguadora de PCR, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la detección y la diferenciación de linaje B-βCoV (gen E) y SARS-CoV-2 (gen S) y la detección de ARN específico del virus de la gripe (A+B), además de ARN específico del IC.

El PC contiene ARN específico de linaje B-βCoV (gen E) y SARS-CoV-2 (gen S), además del virus de la gripe. Se utiliza para verificar la funcionalidad de los sistemas de amplificación y detección específicas del linaje B-βCoV, SARS-CoV-2 y virus de la gripe.

El NTC no contiene ARN específico del linaje B-βCoV, SARS-CoV-2 ni virus de la gripe (A+B), pero contiene la plantilla del IC. El NTC se utiliza como control negativo para la PCR en tiempo real específica de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y gripe (A+B) e indica una posible contaminación del componente Detection Mix.

6.2 Instrumentos de PCR en tiempo real

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

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.

6.3 Tipos de muestras

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se ha validado para su uso con el siguiente tipo de muestras:

- Muestra de hisopo respiratorio humano

PRECAUCIÓN



¡No utilice otros tipos de muestras! El uso de otros tipos de muestras puede afectar al rendimiento del producto.

7. Material necesario, pero no proporcionado

Estos instrumentos y consumibles adicionales son necesarios para el uso del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, aunque no se proporciona con este producto:

- Instrumento de PCR en tiempo real apropiado (consulte el capítulo 6.2 Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico apropiado (consulte el capítulo 9.2 Preparación de las muestras)
- Agitador vórtex
- Centrífuga (por ejemplo, de sobremesa) para el centrifugado de los reactivos del kit
- Centrífuga para el centrifugado de PCR plates (placas PCR)
- Placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción apropiados con su material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

Se necesitan reactivos, aunque no vienen incluidos en el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (n.º de pedido FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (n.º de pedido IC15-16/IC15-46)

8. Advertencias, precauciones y limitaciones

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes para ver si están completos en cuanto a número, tipo y relleno. No utilice un producto incompleto o defectuoso, pues el rendimiento del mismo podría verse afectado.
- Unas condiciones de almacenamiento inadecuadas podrían afectar al rendimiento del producto.
- No exceda la secuencia de congelación y descongelación ni las duraciones de manipulación especificadas en estas instrucciones de uso, ya que podría afectar al rendimiento del producto.
- No use productos cuya fecha de caducidad haya expirado. El uso de productos caducados puede afectar al rendimiento del producto.
- ¡No utilice otros tipos de muestras! El uso de otros tipos de muestras puede afectar al rendimiento del producto.
- La manipulación incorrecta de componentes de productos y muestras puede provocar contaminación y podría afectar al rendimiento del producto:
 - No intercambie tapones de viales y botes.
 - Almacene los materiales positivos y/o potencialmente positivos separados de los componentes del kit.
 - Utilice áreas de trabajo separadas para la preparación de las muestras, la configuración de reacción y las actividades de amplificación/detección.
 - Deseche siempre los guantes después de manipular material positivo y/o potencialmente positivo.
 - No abra los tubos y/o las PCR plates (placas PCR) después de la amplificación.
- No mezcle componentes de diferentes lotes del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, ya que esto podría afectar al rendimiento del producto.
- Trate siempre las muestras como si fuera material infeccioso y (bio)peligroso conforme a los procedimientos de seguridad y de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.
- La presencia de inhibidores de PCR podría provocar falsos negativos o resultados no válidos.

- La eliminación de los residuos peligrosos y biológicos deberá cumplir las normativas locales y nacionales para evitar la contaminación medioambiental.
- El almacenamiento de eluidos en condiciones incorrectas puede provocar la degradación de las secuencias objetivo de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y/o virus de la gripe y podría afectar al rendimiento del producto.
- La ausencia de centrifugación de los componentes del producto tras la descongelación podría provocar la contaminación con restos de reactivos en las tapas y podría afectar al rendimiento del producto.
- No supere el tiempo de almacenamiento de la mezcla de PCR, ya que esto podría afectar al rendimiento del producto.
- Como con cualquier test diagnóstico, los resultados se interpretarán teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Si la muestra contiene otros patógenos distintos de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y/o virus de la gripe, puede darse competencia con la amplificación objetivo o reactividades cruzadas, lo que provocaría unos resultados de examen IVD incorrectos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y/o virus de la gripe cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.

9. Procedimiento

PRECAUCIÓN

La manipulación incorrecta de componentes de productos y muestras puede provocar contaminación y podría afectar al rendimiento del producto:

- No intercambie tapones de viales y botes.
- Almacene los materiales positivos y/o potencialmente positivos separados de los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para la preparación de las muestras, la configuración de reacción y las actividades de amplificación/detección.
- Deseche siempre los guantes después de manipular material positivo y/o potencialmente positivo.
- No abra los tubos y/o las PCR plates (placas PCR) después de la amplificación.



PRECAUCIÓN

No mezcle componentes de diferentes lotes del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, ya que esto podría afectar al rendimiento del producto.



9.1 Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras

Para la recogida de las muestras, hay que usar hisopos disponibles comercialmente con varilla de plástico y punta de poliéster o de fibra Dacron. Los hisopos secos se deben resuspender en medio de transporte universal (por ejemplo, UTM®, Copan). No deben utilizarse bastoncillos de alginato de calcio, bastoncillos con la varilla de madera o puntas de algodón, ni bastoncillos que contengan gel de agar. El transporte deberá realizarse de acuerdo con la legislación local o nacional relativa al transporte de material biológico.

Antes de su uso, los hisopos respiratorios resuspendidos en UTM® no deberían permanecer almacenados durante más de 48 horas a temperatura ambiente (de +20 °C a +25 °C), 5 días a una temperatura entre +2 °C y +8 °C o 2 meses a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.

PRECAUCIÓN



Trate siempre las muestras como si fuera material infeccioso y (bio)peligroso conforme a los procedimientos de seguridad y de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.

NOTA



El almacenamiento en congelación no pone en peligro el rendimiento del kit. Cuando trabaje con muestras congeladas, asegúrese de que se hayan descongelado y mezclado correctamente antes de su uso.

NOTA



No deben utilizarse bastoncillos de alginato de calcio, ya que esto podría provocar resultados incorrectos o no válidos debido a la inhibición de la PCR.

NOTA



No deben utilizarse bastoncillos con la varilla de madera o puntas de algodón ni bastoncillos con gel de agar como medio de transporte, ya que los restos de madera, algodón o agar pueden interferir con la transferencia de muestras al AltoStar® AM16 y las muestras no se procesarán.

9.2 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del producto.

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se validó con muestras de hisopos respiratorios humanos utilizando el AltoStar® AM16 en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Tras completarse la extracción del ácido nucleico usando AltoStar® AM16, los eluidos de la eluate plate (placa de eluidos) sin sellar son estables a temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante un total de 4 horas.

Los eluidos en una eluate plate (placa de eluidos) sellada pueden almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante hasta 24 horas antes del inicio de una configuración de reacción. Para obtener información detallada sobre el sellado de las eluate plates (placas de eluidos), consulte las instrucciones de uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. Sin embargo, la idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 debe validarla el usuario.

PRECAUCIÓN



¡No utilice otros tipos de muestras! El uso de otros tipos de muestras puede afectar al rendimiento del producto.

PRECAUCIÓN



Trate siempre las muestras como si fuera material infeccioso y (bio)peligroso conforme a los procedimientos de seguridad y de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.

PRECAUCIÓN



La presencia de inhibidores de PCR podría provocar falsos negativos o resultados no válidos.

PRECAUCIÓN



La eliminación de los residuos peligrosos y biológicos deberá cumplir las normativas locales y nacionales para evitar la contaminación medioambiental.

PRECAUCIÓN



El almacenamiento de eluidos en condiciones incorrectas puede provocar la degradación de las secuencias objetivo de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y/o virus de la gripe y podría afectar al rendimiento del producto.

Si necesita más información o ayuda en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics (ver capítulo 15. Asistencia técnica).

9.3 Configuración de master mix

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

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 está configurado para su uso con el FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 y el AltoStar® Internal Control 1.5, el cual permite controlar el procedimiento de preparación de las muestras (extracción de ácido nucleico) y la posterior RT-PCR.

- ▶ El IC se añade automáticamente al principio del procedimiento de purificación del ácido nucleico en el AltoStar® AM16.
- ▶ Cuando se usan otros métodos de extracción del ácido nucleico, el IC se debe añadir durante el paso de lisis o bien de forma manual o automática mediante el instrumento respectivo.
- ▶ Independientemente del método o sistema que se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente a la muestra. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de muestra o tampón de lisis. El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 50 % 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 30 µl de IC por muestra a la mezcla de muestra o tampón de lisis.

- Configure la master mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Tabla 2: Esquema de pipeteo (configuración de master mix)

Número de reacciones (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
Volumen de master mix	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN



La ausencia de centrifugación de los componentes del producto tras la descongelación podría provocar la contaminación con restos de reactivos en las tapas y podría afectar al rendimiento del producto.

9.4 Configuración de reacción

- Pipeta 20 µl de la master mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o de un tubo de reacción óptica.
- Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (PC o NTC).

Tabla 3: Esquema de pipeteo (configuración de reacción)

Configuración de reacción	
Master mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- Asegúrese de que al menos se utilicen 1 PC y 1 NTC 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 película 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 microtítulos y los tubos de reacción en una centrífuga adecuada durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~3 000 rpm).
- ▶ El NTC ya contiene la plantilla del IC en la concentración correcta.

Tras completarse la configuración de mezcla de PCR, la mezcla de RT-PCR de la PCR plate (placa PCR) sellada es estable a temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante máx. 30 minutos.

PRECAUCIÓN



No supere el tiempo de almacenamiento de la mezcla de PCR, ya que esto podría afectar al rendimiento del producto.

10. Programación del instrumento de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte las instrucciones de uso del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics (ver capítulo 15. Asistencia técnica).

10.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Tabla 4: Configuración de la serie

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

10.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Tabla 5: Detectores de fluorescencia

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Amortiguador de la fluorescencia
ARN específico del linaje B-βCoV	E gene	ROX™	(Ninguno)
ARN específico de SARS-CoV-2	S gene	Cy5	(Ninguno)
ARN específico del virus de la gripe (A+B)	Flu	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

10.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

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

Tabla 6: Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	52	05:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	00:05
Amplificación	Ciclo	45	-	95	00:05
			Sí	58	00:25

11. Análisis de datos

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

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto el soporte técnico de Altona Diagnostics (ver capítulo 15. Asistencia técnica).

11.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

11.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Tabla 7: Condiciones de control para una serie de pruebas válida

ID de control	Canal de detección			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Control positivo [linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y virus de la gripe]	+	+	+	No aplicable
Control negativo	-	-	-	+

11.1.2 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 el caso de una serie **no válida** de pruebas diagnósticas, repita las pruebas usando los ácidos nucleicos purificados restantes o empiece de nuevo a partir de las muestras originales.

11.2 Interpretación de los resultados

PRECAUCIÓN



Como con cualquier test diagnóstico, los resultados se interpretarán teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

11.2.1 Análisis cualitativo

Tabla 8: Interpretación del resultado

Canal de detección				Interpretación del resultado
ROX™ (gen E)	Cy5 (gen S)	FAM™ [gripe (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV y SARS-CoV-2.
+	-	-	+/-*	Solo se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV.**
-	+	-	+/-*	Solo se ha detectado ARN específico de SARS-CoV-2.**
-	-	+	+/-*	Solo se ha detectado ARN del virus de la gripe (A y/o B).
+	-	+	+/-*	Se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV y del virus de la gripe (A y/o B).
-	+	+	+/-*	Se ha detectado ARN específico del SARS-CoV-2 y del virus de la gripe (A y/o B).
+	+	+	+/-*	Se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV, SARS-CoV-2 y del virus de la gripe (A y/o B).
-	-	-	+	No se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV, del SARS-CoV-2 ni del virus de la gripe (A y/o B). La muestra no contiene cantidades detectables de ARN del linaje B-βCoV, SARS-CoV-2 ni del virus de la gripe.
-	-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* La detección del IC en el canal de detección JOE™ no es necesaria para obtener resultados positivos en el canal de detección de ROX™ y/o Cy5 y/o FAM™. Una elevada carga de ARN del linaje B-βCoV (gen E objetivo) y/o SARS-CoV-2 (gen S objetivo) y/o gripe (A+B) en la muestra puede dar lugar a señales reducidas o ausentes del IC.

** La detección en solo uno de los dos canales de detección respectivos para linaje B-βCoV (gen E) y SARS-CoV-2 (gen S) podría deberse a una baja concentración de ARN vírico cerca del límite de detección o debido a la mutación de una de las dos secuencias objetivo.

12. Evaluación del rendimiento

El rendimiento del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se evaluó utilizando el estándar internacional de la OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146)», material del virus de la gripe A (cepa de gripe A H3N2 Wisconsin/67/05) y material del virus de la gripe B (cepa Florida/04/06) disponible comercialmente.

12.1 Hisopos respiratorios

12.1.1 Sensibilidad analítica

Para la determinación del límite de detección (LoD), se generó una serie de dilución del estándar internacional de la OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA», material del virus de la gripe A (cepa de gripe A H3N2 Wisconsin/67/05) y material del virus de la gripe B (cepa Florida/04/06) disponible comercialmente, diluido en medio de transporte universal (UTM®, Copan) que contenía matriz nasal simulada [5 % p/v de mucina, 5 % v/v de sangre, 0,8 % v/v de NaCl (95 % de salino) y 0,00002 % p/v de ADN genómico humano (entrega de 510k para el ensayo BD MAX™ MRSA XT; número de entrada: K133605)].

Se analizó una serie de dilución del estándar internacional de la OMS «1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA» de entre 1,00E+04 UI/ml y 5,00E-01 UI/ml. Para el virus de la gripe A y el virus de la gripe B, se analizó una serie de dilución de entre 2,00E+03 copias/ml y 1,00E+01 copias/ml.

Cada dilución se probó en 8 réplicas en 3 series diferentes (total n = 24 por dilución) usando combinaciones de:

- 3 lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotes de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lotes del kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

Los datos de todas las series se combinaron para cada virus y se realizó un análisis de probit para determinar el valor de LoD del 95 %.

Tabla 9: Resultados de PCR usados para el cálculo de la sensibilidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para SARS-CoV-2 (gen S)

Concentración [UI/ml]	N [total]	N [positivo]	Índice de éxito [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

El LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para la detección de SARS-CoV-2 (gen S) en UTM® es de 201 UI/ml (intervalo de confianza del 95 %: 107-501 UI/ml).

Tabla 10: Resultados de PCR usados para el cálculo de la sensibilidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para SARS-CoV-2 (gen E)

Concentración [UI/ml]	N [total]	N [positivo]	Índice de éxito [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	2	8
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

El LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para la detección de SARS-CoV-2 (gen E) en UTM® es de 226 UI/ml (intervalo de confianza del 95 %: 124-545 UI/ml).

Tabla 11: Resultados de PCR usados para el cálculo de la sensibilidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para el virus de la gripe A

Concentración [copias/ml]	N [total]	N [positivo]	Índice de éxito [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	23	96
2,50E+02	24	22	92
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	9	38
2,50E+01	24	6	25
1,00E+01	24	1	4

El LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para la detección del virus de la gripe A en UTM® es de 341 copias/ml (intervalo de confianza del 95 %: 230-611 copias/ml).

Tabla 12: Resultados de PCR usados para el cálculo de la sensibilidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para el virus de la gripe B

Concentración [copias/ml]	N [total]	N [positivo]	Índice de éxito [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	19	79
1,00E+02	24	3	13
5,00E+01	24	6	25
2,50E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4

El LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para la detección del virus de la gripe B en UTM® es de 432 copias/ml (intervalo de confianza del 95 %: 286-780 copias/ml).

12.1.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 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 garantizar que se detectaran todos los genotipos relevantes de SARS-CoV-2 y virus de la gripe.

Para la verificación de la especificidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, se realizaron los siguientes experimentos (consulte los capítulos desde el 12.1.2.1 Muestras negativas hasta el 12.1.2.3 Reactividad cruzada).

12.1.2.1 Muestras negativas

Se analizaron 30 muestras de hisopos respiratorios negativas para SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B procedentes de donantes individuales con el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Todas las muestras (30 de 30) dieron negativo para el ARN específico de SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B y positivo para el IC. La especificidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 para muestras de hisopos respiratorios es de ≥ 95 %.

12.1.2.2 Sustancias interferentes

Para evaluar la influencia de sustancias endógenas y exógenas potencialmente interferentes en el rendimiento del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, se añadieron sustancias seleccionadas al UTM® que contenía SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B a una concentración final de 3 x LoD (6,03E+02 UI/ml, 1,02E+03 copias/ml y 1,29E+03 copias/ml, respectivamente) y a UTM® que no contenía SARS-CoV-2, virus de la gripe A ni virus de la gripe B.

Los resultados obtenidos para las muestras que contenían sustancias potencialmente interferentes se compararon con los resultados generados para UTM® que no se enriquecieron con interferentes. Cada muestra se procesó en 3 réplicas.

No se observó interferencia para las muestras que contenían niveles elevados de:

- Sustancias endógenas
 - ADN genómico humano
 - Sangre entera humana
 - Mucina
- Sustancias exógenas
 - Spray nasal antialérgico (con dipropionato de beclometasona)
 - Spray descongestionador nasal (con hidrocloreuro de xilometazolina y dexpanthenol)
 - Mupirocina
 - Zanamivir

PRECAUCIÓN



La presencia de inhibidores de PCR podría provocar falsos negativos o resultados no válidos.

12.1.2.3 Reactividad cruzada

Se evaluó la especificidad analítica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 con respecto a la reactividad cruzada con otros patógenos distintos del SARS-CoV-2, el virus de la gripe A y el virus de la gripe B:

- Patógenos relacionados con el SARS-CoV-2 y los virus de la gripe
- Patógenos que provocan síntomas similares a una infección por SARS-CoV-2 o virus de la gripe

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Adenovirus
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterovirus
- *Haemophilus influenzae*
- Coronavirus humano 229E
- Coronavirus humano NL63
- Coronavirus humano OC43
- Metapneumovirus humano (MPVh)
- *Legionella pneumophila*
- Coronavirus MERS
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Virus parainfluenza 1-4
- *Pneumocystis jirovecii*
- Virus sincitial respiratorio A
- Virus sincitial respiratorio B
- Rinovirus
- *Streptococcus pneumoniae*

PRECAUCIÓN

Si la muestra contiene otros patógenos distintos de linaje B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) y/o virus de la gripe, puede darse competencia con la amplificación objetivo o reactividades cruzadas, lo que provocaría unos resultados de examen IVD incorrectos.

12.1.3 Inclusividad

La especificidad del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 respecto a la detección de diferentes variantes de SARS-CoV-2 y cepas del virus de la gripe se garantiza principalmente mediante la selección de cebadores y sondas. Para verificar que el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 permite la detección de diferentes variantes de SARS-CoV-2 y distintas cepas del virus de la gripe, se analizaron las siguientes variantes/cepas (consulte las tablas 13 y 15).

Tabla 13: Linajes de SARS-CoV-2 analizados

Variante (linaje)	Canal ROX™ (gen E)	Canal Cy5 (gen S)	Canal VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (tipo natural)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (tipo natural)	+	+	+
Alfa (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gamma (P.1)	+	+	+

Tabla 14: Inclusividad [análisis *in silico* para 2 993 884 secuencias de genoma completo de SARS-CoV-2 publicadas mediante GISAID e.V. (www.gisaid.org) a fecha de 10 de octubre de 2021 y 518 615 secuencias de genoma completo publicadas mediante National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) a fecha de 10 de octubre de 2021 para el gen E y el gen S objetivo: FlexStar® SARS-CoV-2 Type y FLU RT-PCR Detection Mix 1.5]

3 512 499 secuencias de genoma completo		Secuencias que muestran una homología del 100 %	Secuencias que muestran disparidades (número de disparidades)
Gen E	Cebador directo	3 505 942	6 549 (1) 8 (2)
	Cebador inverso	3 509 461	3 032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonda	3 510 308	2 183 (1) 4 (2)
Gen S	Cebador directo	3 491 594	20 728 (1) 160 (2)
	Cebador inverso	3 490 361	22 061 (1) 77 (2)
	Sonda	3 498 798	13 653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

* La secuencia (ID de acceso EPI_ISL_415593, GISAID) mostró 4 disparidades en el sitio de unión de la sonda del gen S. Esta secuencia se publicó el 10 de marzo de 2020, y tiene su origen en Washington (EE. UU.). Desde entonces, ninguna de las secuencias publicadas ha vuelto a mostrar tantas disparidades. Los autores comentaron la secuencia: «Precaución. Tramos de NNN (1,74 % de la secuencia global)», lo que indica una calidad de secuenciación no ideal, por lo que no se ha investigado el impacto en los oligonucleótidos específicos del gen S.

**La secuencia (acceso MW584978.1) mostró 3 disparidades en el sitio de unión del cebador inverso del gen E. Esta muestra se recogió el 3 de abril de 2020 y se publicó en febrero de 2021, y tuvo su origen el Cleveland (EE. UU.) Desde entonces, ninguna de las secuencias publicadas ha vuelto a mostrar tantas disparidades.

Dependiendo de la posición, es muy poco probable que los eventos de mutación que dan lugar a ≤ 2 disparidades en una única secuencia de oligonucleótidos tengan un impacto negativo significativo en el rendimiento del ensayo. Todas estas secuencias (≤ 2 disparidades) analizadas en experimentos de laboratorio en húmedo con motivo de las actividades de vigilancia posterior a la comercialización para los kits RealStar®, FlexStar® y AltoStar® para la detección del SARS-CoV-2 hasta ahora confirmaron que el rendimiento no se vio afectado por dichas mutaciones. Con la excepción de una única secuencia, ninguna de las demás secuencias analizadas presentó disparidades en más de un oligonucleótido y ninguna de las secuencias dispares presentó disparidades en ambos sistemas de detección específicos (gen E y gen S), por lo que no se espera que afecte a la reactividad de los oligonucleótidos específicos incluidos en los kit RealStar®, FlexStar® y AltoStar® para la detección del SARS-CoV-2.

Tabla 15: Cepas analizadas del virus de la gripe A y la gripe B

Subtipo/cepa	Canal FAM™ (virus de la gripe A y B)	Canal VIC™ (IC)
Virus de la gripe A, subtipo H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Virus de la gripe A, subtipo H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Virus de la gripe A, subtipo de variante de deriva A/H3N2 (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Virus de la gripe A, subtipo H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Virus de la gripe B (B/Colorado/6/2017, linaje B-Victoria)	+	+
Virus de la gripe B (B/Phuket/3073/2013, linaje B/Yamagata 16/88)	+	+

12.1.4 Precisión

Se evaluó la precisión del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 usando un panel compuesto por:

- 1 muestra de SARS-CoV-2 con carga viral alta [50 x LoD (1,00E+04 UI/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra de virus de la gripe A con carga viral alta [50 x LoD (1,70E+04 copias/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra de virus de la gripe B con carga viral alta [50 x LoD (2,16E+04 copias/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra de SARS-CoV-2 con carga viral baja [3 x LoD (6,03E+02 UI/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra de virus de la gripe A con carga viral baja [3 x LoD (1,02E+03 copias/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra de virus de la gripe B con carga viral baja [3 x LoD (1,29E+03 copias/ml)] en UTM® que contenía matriz nasal simulada
- 1 muestra negativa para SARS-CoV-2, el virus de la gripe A y el virus de la gripe B (UTM® que contenía matriz nasal simulada)

Cada miembro del panel se probó en al menos 6 réplicas por serie.

Se ejecutaron 5 series en 5 días diferentes usando combinaciones de:

- 3 lotes de FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotes de FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lotes del kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

Se determinó la repetibilidad (variabilidad intraserie), la variabilidad interlote y la reproducibilidad (variabilidad total) en función de:

- Valores de ciclo de umbral (C_q^*) para muestras positivas para SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B con carga viral alta (consulte las tablas 16 y 17)
- Valores de ciclo de umbral (C_q^*) del IC en las muestras negativas para SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B (consulte la tabla 18)

* Tenga en cuenta que el término elegido C_q es equivalente a la designación de C_t , la cual podría ser usada por otros cicladores distintos del CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tabla 16: Datos de precisión (valores C_q expresados en % de CV) para muestras de SARS-CoV-2 con carga viral alta

	Muestra de SARS-CoV-2 con carga viral alta (C_q en el canal ROX™, gen E objetivo)	Muestra de SARS-CoV-2 con carga viral alta (C_q en el canal Cy5, gen S objetivo)
Variabilidad intraserie	0,21-0,42	0,44-0,60
Variabilidad interlote	0,59	0,52
Variabilidad total	0,89	0,63

Todas las muestras analizadas con 3 x LoD (muestras positivas con carga viral baja) dieron positivo para SARS-CoV-2 (gen E y gen S).

Tabla 17: Datos de precisión (valores C_q expresados en % de CV) para muestras del virus de la gripe A y el virus de la gripe B con carga viral alta

	Muestra del virus de la gripe A con carga viral alta (C_q en el canal FAM™)	Muestra del virus de la gripe B con carga viral alta (C_q en el canal FAM™)
Variabilidad intraserie	0,93-1,16	0,52-1,48
Variabilidad interlote	1,02	1,02
Variabilidad total	1,48	1,69

Todas las muestras analizadas con 3 x LoD (muestras positivas con carga viral baja) dieron positivo para el virus de la gripe A y el virus de la gripe B.

Tabla 18: Datos de precisión (valores C_q expresados en CV %) del IC en las muestras negativas para SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B

	IC
Variabilidad intraserie	0,23-0,35
Variabilidad interlote	0,38
Variabilidad total	0,74

12.1.5 Índice de fallo total

Se evaluó la solidez del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 mediante el análisis de 30 muestras de hisopos respiratorios humanos negativos para SARS-CoV-2, el virus de la gripe A y el virus de la gripe B procedentes de donantes individuales y enriquecidas con SARS-CoV-2, virus de la gripe A y virus de la gripe B hasta una concentración final de 3 x LoD (6,03E+02 UI/ml de SARS-CoV-2, 1,02E+03 copias/ml del virus de la gripe A y 1,29E+03 copias/ml del virus de la gripe B). Todas las muestras (30 de 30) dieron positivo en los canales de detección de fluorescencia específicos de SARS-CoV-2 (Cy5 y ROX™) y en el canal de detección de fluorescencia específico del virus de la gripe A y el virus de la gripe B (FAM™).

12.1.6 Arrastre

La contaminación por arrastre es un riesgo que depende del flujo de trabajo y no del ensayo PCR que se utilice. Para el AltoStar® Workflow (flujo de trabajo) se utilizó el kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 como modelo de ejemplo. Se evaluó la posible contaminación cruzada por arrastre de muestras con carga viral alta analizando muestras alternativas de parvovirus B19 con carga viral alta (1,00E+07 UI/ml) y muestras negativas (n = 44 cada una por serie, 2 series) con el kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. No se observó arrastre, es decir, todas las muestras negativas para el parvovirus B19 dieron negativo.

12.1.7 Rendimiento clínico

Se evaluó el FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en un estudio comparativo con el *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik), con marcado CE. Retrospectivamente, se analizaron en paralelo 165 muestras individuales de hisopos respiratorios humanos.

Se utilizó el *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) en combinación con el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) y el MagNA Pure 96 Extraction System (Roche).

El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se utilizó en combinación con el kit AltoStar® Purification Kit 1.5 y el AltoStar® Internal Control 1.5 en el AltoStar® AM16 y el CFX96™ DW Dx.

Para el análisis cualitativo se excluyeron todas las muestras con un resultado no válido para uno o ambos ensayos.

Los resultados para las muestras restantes (164 para SARS-CoV-2 y 152 para el virus de la gripe) se muestran en las tablas 19 y 20, respectivamente.

Tabla 19: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico para SARS-CoV-2 en muestras de hisopos respiratorios

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	58	1
	NEGATIVO	0	105

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en comparación con el *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) fueron del 100 % (intervalo de confianza del 93,8 % al 100 %) y del 99,1 % (intervalo de confianza del 94,9 % al 100 %), respectivamente.

Tabla 20: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico para el virus de la gripe en hisopos respiratorios

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	37	1
	NEGATIVO	0	114

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 en comparación con el *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) fueron del 100 % (intervalo de confianza: 90,1 % al 100 %) y del 95,3 % (intervalo de confianza del 95,3 % al 100 %), respectivamente.

13. Eliminación

Elimine los desechos peligrosos y biológicos conforme a las regulaciones locales y nacionales. No debe permitirse que los componentes sobrantes de producto ni los desechos lleguen al alcantarillado, a cursos de agua o al suelo exterior.

PRECAUCIÓN



Trate siempre las muestras como si fuera material infeccioso y (bio)peligroso conforme a los procedimientos de seguridad y de laboratorio. Si se derrama material de las muestras, utilice rápidamente un desinfectante adecuado. Manipule los materiales contaminados como si fueran biopeligrosos.

PRECAUCIÓN



La eliminación de los residuos peligrosos y biológicos deberá cumplir las normativas locales y nacionales para evitar la contaminación medioambiental.

14. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

15. Asistencia técnica

Si necesita asistencia, póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics:

email: support@altona-diagnostics.com

teléfono: +49-(0)40-5480676-0

NOTA



Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con este producto, se notificará a Altona Diagnostics y a la autoridad competente del país.

16. Bibliografía

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.^a edición. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, último acceso el 24 de marzo de 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006). "Influenza Virology: Current Topics". Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, último acceso el 24 de marzo de 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). "The biology of influenza viruses". Vaccine. Vol.26, Supl. 4:D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID 19230160.
- [6] Richard M, Fouchier RAM (2016) "Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential". FEMS Microbiology Reviews. Vol.40, Supl. 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] World Health Organization (WHO). Fact sheets - "Influenza (Seasonal)". 18 de noviembre de 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), último acceso el 24 de marzo de 2020.

17. Marcas comerciales y aviso legal

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); CFX96™ (Bio-Rad); UTM® (Copan); Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.
















El FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.




Producto sin licencia de Health Canada y no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

18. Explicación de los símbolos

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

Símbolo	Explicación
	Versión
	Nota
	Contiene material biológico de origen animal

19. Historial de revisiones

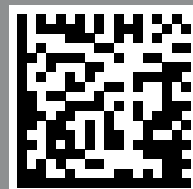
Tabla 21: Historial de revisiones

Identificador	Fecha de emisión [mes/año]	Modificaciones
MAN-FS0021510-ES-S01	02/2022	Lanzamiento inicial

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

www.altona-diagnostics.com



COV-FlexStar-DM-CE-EN-02_01/2021