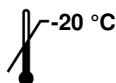


SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit

Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING



INDICE

USO PREVISTO

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

MUESTRAS Y CONTROLES

PROCEDIMIENTO

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BIBLIOGRAFÍA

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

SÍMBOLOS

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

ANEXO

| |
|-----------|
| página 1 |
| página 2 |
| página 3 |
| página 3 |
| página 3 |
| página 4 |
| página 4 |
| página 5 |
| página 6 |
| página 13 |
| página 20 |
| página 21 |
| página 22 |
| página 25 |
| página 25 |
| página A |

USO PREVISTO

El producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» forma parte de un ensayo cualitativo de retrotranscriptasa múltiple y amplificación de ácidos nucleicos, así como de análisis de la curva de fusión, para la detección y la distinción de las mutaciones E484K, E484Q y N501Y del gen S del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) en muestras clínicas de pacientes infectados por el virus.

El ensayo puede detectar las mutaciones asociadas a las siguientes variantes: variante alfa (Reino Unido), linaje B.1.1.7, variante beta (Sudáfrica), linaje B.1.351, variante gamma (Japón), linaje P1, variante zeta (Brasil), linaje P2, variante eta (Nigeria), linaje B.1.525 y variante kappa (India), linaje B.1617.1.

El ensayo se ha validado utilizando el sistema «ELITE InGenius®» y muestras de hisopados respiratorios (nasofaríngeos, nasales o bucofaríngeos).

El producto se utiliza como análisis condicionado de muestras que ya han diagnosticado como positivas para SARS-CoV-2, así como para ayudar a identificar las mutaciones N501Y, E484K y E484Q del gen S del SARS-Cov-2.

SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit

Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ensayo consiste en la realización de una retrotranscriptasa múltiple y una reacción de amplificación en tiempo real (método de un solo paso) con el **ELITE InGenius®**, un sistema integrado y automatizado para la extracción, la retrotranscriptasa, la amplificación, la detección y el análisis de fusión de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de los resultados.

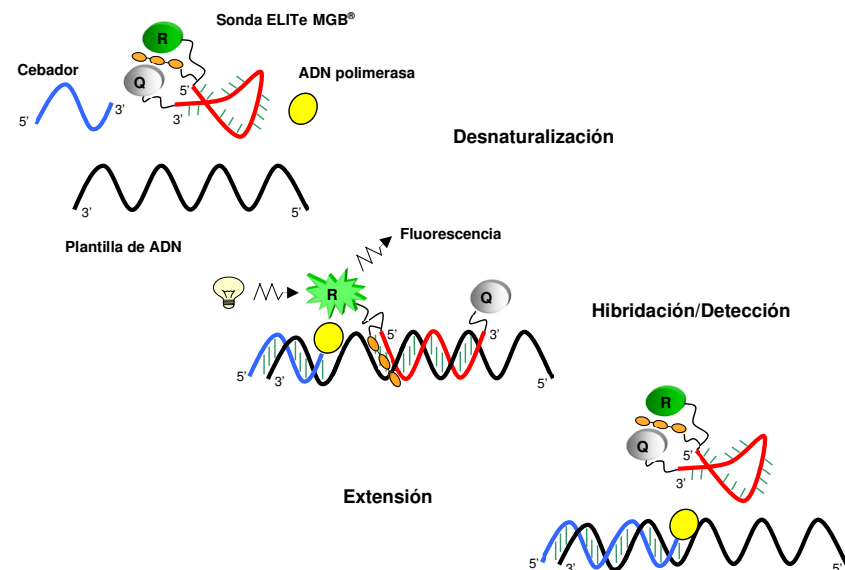
Comenzando con el ARN extraído con el instrumento **ELITE InGenius®** a partir de la muestra que va a analizarse, se realizan diferentes reacciones de retrotranscriptasa y amplificación en el cartucho «PCR Cassette», lo que tiene por objeto amplificar una región específica del gen S del SARS-CoV-2 y detectar las siguientes dianas:

- diana 484, que se detecta con la sonda específica en el canal **484** (canal 1),
- diana 501, que se detecta con la sonda específica en el canal **501** (canal 4).

La mezcla completa de reacción también amplifica el control de celularidad, extracción e inhibición basándose en el gen de la **ribonucleasa P** humana como Internal Control endógeno, que se detecta con la sonda específica en el canal **IC** (canal 3).

Las sondas con tecnología ELITE MGB®, marcadas con diferentes fluoróforos, se activan cuando se hibridan con el producto específico de la amplificación. El instrumento mide y registra la emisión de fluorescencia. Al final del ciclo de amplificación, se realiza el análisis de disociación. Los gráficos de fluorescencia se analizan para identificar los ciclos umbral (Ct) y las temperaturas de fusión (Tm). La interpretación de los resultados permite detectar la presencia de las mutaciones de interés del gen S del SARS-CoV-2.

En la siguiente ilustración se muestra de manera esquemática el mecanismo de activación y emisión de fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Tener en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación.



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» incluye los siguientes componentes:

- **Mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix»**

Una mezcla optimizada y estabilizada de oligonucleótidos y reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real, **dividida previamente en dos probetas** (tapón neutro). Cada probeta contiene **1200 µL** de solución, volumen suficiente para **48 análisis** (procesando al menos 5 muestras por sesión) cuando se usa el sistema **ELITE InGenius®**.

La mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» contiene los cebadores específicos para una región del gen S del SARS-CoV-2, así como la sonda para la dianas **484** y **501**:

- La sonda **484** se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La sonda **501** se marca con el fluoróforo AP593, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.

La mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» también contiene los cebadores específicos para el gen de la **ribonucleasa P** humana como Internal Control (IC) endógeno. La sonda **IC** se marca con el fluoróforo AP525, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.

La mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» también contiene la solución tampón, cloruro de magnesio, los nucleótidos-trifosfato, los estabilizadores y la enzima de ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

- **RT EnzymeMix**

Una mezcla optimizada y estabilizada de enzimas para la retrotranscriptasa, dividida previamente en **dos probetas** (tapón con inserto negro). Cada probeta contiene **20 µL** de solución, suficiente para **48 análisis** (procesando al menos 5 muestras por sesión) cuando se utiliza el sistema **ELITE InGenius®**.

El producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» incluye componentes suficientes para **96 análisis**, inclusive los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

| Componente | Descripción | Cantidad | Clasificación de peligros |
|---------------------------------|---|-------------|---------------------------|
| Mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» | Mezcla de reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real tapón neutro | 2 × 1200 µL | - |
| RT EnzymeMix | Retrotranscriptasa e inhibidor de la ribonucleasa tapón con inserto negro | 2 × 20 µL | - |

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Probeta Sarstedt de 2,0 mL con base de apoyo y tapón roscado (Sarstedt ref. 72.694.005).
- Agua para biología molecular.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Este producto **no** incluye los reactivos para la extracción de ARN de las muestras que van a analizarse, el Positive Control de amplificación ni los consumibles.

Para la extracción automática de ARN, la retrotranscriptasa, la amplificación en tiempo real y la interpretación de resultados, es necesario utilizar el instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos (EG S.p.A.):

- parámetros para la amplificación del Positive Control «**SARS-CoV-2 VAR ELITE_PC**»,
- parámetros para la amplificación del control negativo «**SARS-CoV-2 VAR ELITE_NC**»;
- parámetros para las muestras de hisopados respiratorios «**SARS-CoV-2 VAR ELITE_RsS_200_100**».

Con el instrumento «**ELITE InGenius®**» se necesitan los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (EG SpA, ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (EG SpA, ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificación «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (EG SpA ref. INT035PCR),
- puntas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (EG SpA, ref. F2102-000).

Como plantilla de Positive Control de amplificación, es necesario utilizar el producto específico «**SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control**» (EG S.p.A., ref. CTR171ING). Este producto incluye dos soluciones estabilizadas que contienen ADN plasmídicos.

En el caso de un análisis múltiple de diferentes dianas de la misma muestra, se recomienda utilizar el producto «**CPE - Internal Control**» (EG S.p.A., ref. CTRCPE) como plantilla de Internal Control exógeno de extracción e inhibición. que es una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos y el ARN genómico del bacteriófago MS2.

Como dispositivo de recogida para las muestras de hisopados respiratorios, es necesario utilizar el producto genérico «**UTM® kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 360C o 305C) o un dispositivo equivalente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado para uso *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio al 3 %, o procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material combustible desechable debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de ser eliminados.

Utilizar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones proporcionadas con el producto antes de realizar el ensayo.

Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y
la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de amplificación, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo.

Es necesario tener disponibles áreas independientes para las pruebas de biología molecular y las pruebas de cultivo microbiológico. No manipular nunca cultivos líquidos o sólidos en el área designada para las reacciones de extracción/amplificación.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o ser utilizadas con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la retrotranscriptasa y la amplificación deben prepararse para un máximo de tres sesiones consecutivas utilizando el ELiTe InGenius. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o ser utilizadas con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse reduciendo en la medida de lo posible la dispersión hacia el entorno.

Los cartuchos «PCR Cassette» deben manipularse evitando en lo posible la dispersión del producto de amplificación en el entorno para que las muestras y los reactivos no se contaminen.

Advertencias y precauciones específicas de los componentes

Mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix»

La mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» debe conservarse a una temperatura inferior a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» puede congelarse y descongelarse un máximo de **diez veces**: más ciclos de congelación y descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

RT EnzymeMix

La mezcla «RT EnzymeMix» debe conservarse a una temperatura inferior a -20 °C.

La mezcla «RT EnzymeMix» no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos por cada uso.

La mezcla «RT EnzymeMix» no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante **más de 10 veces**: un uso durante más tiempo puede reducir el rendimiento del producto.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Exudado respiratorio

Las muestras de hisopados respiratorios para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en un medio de transporte universal (p. ej., UTM®, COPAN Italia S.p.A. o un medio equivalente) de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de un día, o a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cinco días; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de un mes o a -70 °C durante periodos más largos. Los 200 µL de medio deben verse en la probeta de extracción que se incluye en el componente «ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set».

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y
la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

Nota: El pipeteado de muestras desde la probeta primaria de hisopados hasta la probeta de extracción puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en el apartado «Advertencias y precauciones».

Nota: Para realizar la extracción de ARN a partir del hisopado respiratorio con el sistema **ELiTe InGenius** y la versión 1.3.0.16 del **ELiTe InGenius Software** (o una versión posterior), utilizar el protocolo de ensayo «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100**» que procesa 200 µL de muestra y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Sustancias interferentes

Una cantidad de ADN o ARN genómicos humanos superior a 1 µg por reacción puede inhibir la reacción de retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real.

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del apartado «Características de rendimiento».

Controles de amplificación

Antes de analizar una muestra, es obligatorio preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote de reactivos de amplificación que se van a utilizar en el ensayo:

- Como Positive Control de amplificación, utilizar el reactivo «**SARS-CoV-2 Variants – ELiTe Positive Control**» (no incluido en este kit) junto con el protocolo de ensayo «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe_PC**».
- Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) junto con el protocolo de ensayo «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe_NC**».

Nota: El sistema **ELiTe InGenius** requiere resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación guardado en su base de datos.

Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan después de **15 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control con el lote de reactivos de amplificación.

Además, los controles de amplificación también deben volver a procesarse en los siguientes casos:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- Los resultados del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento **ELiTe InGenius**.

Controles de calidad

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado. Se deben realizar controles externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «**SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit**» con el sistema **ELiTe InGenius** comprende tres pasos:

- Verificación de la disponibilidad del sistema.
- Configuración de la sesión.
- Revisión y exportación de los resultados.

Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes de iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el instrumento **ELiTe InGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión «**CLOSED**».
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, «**CoV-2 Wild type Positive Control**» y «**CoV-2 Mutant Positive Control** and **CoV-2 Variants Negative Control**») se hayan procesado y aprobado con el lote de reactivos que va a utilizarse, así como que no hayan caducado («Status»). Si no se cuenta con controles de amplificación aprobados y válidos, habrá que ejecutarlos como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión, siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELiTechGroup S.p.A. Estos protocolos de diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELiTe MGB®, el instrumento **ELiTe InGenius** y la matriz mencionada.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
 Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

Los protocolos de ensayo disponibles para el análisis de muestras con el producto «SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit» se describen en la tabla siguiente:

| Protocolo de ensayo para el producto «SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit» | | | |
|--|----------------------|--|--|
| Nombre | Matriz | Informe | Características |
| SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100 | Exudado respiratorio | Positivo/Negativo Sin mutaciones/Mutado | Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Internal Control: NO Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 10 µL |

Si el protocolo de ensayo deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELiTechGroup más cercano.

Configuración de la sesión

El producto «SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit» puede utilizarse con el sistema ELiTe InGenius para realizar las siguientes tareas:

- Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control (modo de procesamiento «PCR Only»).

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se abren automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

Nota: El sistema ELiTe InGenius puede conectarse al servidor de información de laboratorios (LIS, «Laboratory Information Server»), que permite cargar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) las probetas de mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» (tapón neutro) que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada una de ellas es suficiente para **48 análisis**. Mezclar en una agitadora vortical a baja velocidad tres veces durante 10 segundos, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y, después, conservar en hielo o en un bloque frío.

Nota: descongelar la mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

- Tomar las probetas de mezcla «RT EnzymeMix» (tapón con inserto negro) que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada una de ellas es suficiente para configurar **48 análisis**. Agitar suavemente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y, después, conservar en hielo o en un bloque frío.

Nota: la mezcla «RT EnzymeMix» no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos.

- Preparar una probeta de 2 mL con tapón roscado (número de referencia de Sarstedt 72.694.005, no incluida en el kit) para la **mezcla completa de reacción** y etiquetarla de forma identificable con un rotulador permanente.
- Calcular los volúmenes de los dos componentes proporcionados con el kit que se necesitan para preparar la **mezcla completa de reacción** basándose en el número de muestras que van a analizarse, tal como se describe en la siguiente tabla.

Nota: Para calcular los volúmenes de los dos componentes que van a utilizarse para preparar la **mezcla completa de reacción**, es necesario definir el número de muestras (N) que van a analizarse en la sesión y seguir las indicaciones de la tabla siguiente.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
 Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

| Número de muestra (N) | Mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix» | RT EnzymeMix |
|-----------------------|---------------------------------|------------------|
| 1 ≤ N ≤ 5 | (N + 1) × 20 µL | (N + 1) × 0,3 µL |
| 6 ≤ N ≤ 11 | (N + 2) × 20 µL | (N + 2) × 0,3 µL |
| N = 12 | 290 µL | 4.4 µL |

- Preparar la **mezcla completa de reacción** añadiendo a la probeta dedicada de 2 mL los volúmenes calculados de los dos componentes.
- Mezclar **en un agitador vórtex a baja velocidad** tres veces durante 10 segundos y, después, centrifugar la probeta durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

Nota: La **mezcla completa de reacción** debe utilizarse en el transcurso de **7 horas** cuando se conserva en el bloque refrigerado. Durante este tiempo, es posible llevar a cabo 2 sesiones de trabajo de 3 horas cada una e iniciar una tercera sesión de trabajo. La mezcla completa de reacción **no puede** conservarse para su reutilización.

Nota: La **mezcla completa de reacción** es fotosensible, por lo que no debe exponerse a la luz directa.

A continuación, se describen los pasos principales para configurar los tres tipos de sesión.

A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, seguir las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación:

- Descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) las probetas que contienen las muestras que van a analizarse y manipularlas de acuerdo con las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles» Tener en cuenta que se necesitan 200 µL de muestra para el análisis.
- En caso necesario, descongelar las probetas de «CPE» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C). Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («Sample ID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100»).
- Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» sea «Extract + PCR».
- En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» para la muestra. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar el CPE (en caso necesario) y la mezcla completa de reacción en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla «CoV-2 Variants PCR Mix». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar los cartuchos «PCR Cassette», los cartuchos de extracción «ELiTe InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELiTe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «**PCR Cassette**» que contienen los productos de amplificación, los cartuchos de extracción y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la **mezcla completa de reacción** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 2 sesiones de trabajo de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión de trabajo (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación a partir del ARN extraído, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) las probetas que van a analizarse y que contienen las muestras de ácido nucleico extraídas. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
4. Para cada carril deseado, rellenar el SID escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100»).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» sea «Elution Tube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la **mezcla completa de reacción** en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla «**CoV-2 Variants PCR Mix**». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los **cartuchos de PCR** y las muestras de ácido nucleico extraídas siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELiTe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «**PCR Cassette**» que contienen los productos de amplificación y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la **mezcla completa de reacción** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 2 sesiones de trabajo de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión de trabajo (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control

Para configurar la sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar las probetas de «**CoV-2 Wild Type Positive Control**» y de «**CoV-2 Mutant Positive Control**» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente +25°C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Como **Negative Control**, verter al menos 50 µL de agua para biología molecular en una probeta de elución, incluida en el producto «ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set».
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Aunque no se vaya a realizar ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
5. En la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
6. Para el Positive Control, seleccionar «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_PC» en la columna «Assay» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de los componentes «**CoV-2 Wild Type Positive Control**» y «**CoV-2 Mutant Positive Control**».
7. Para el Negative Control, seleccionar «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_NC» en la columna «Assay» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del agua para biología molecular. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la **mezcla completa de reacción** en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla «**CoV-2 Variants PCR Mix**». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», las probetas de «CoV-2 Wild Type Positive Control» y de «CoV-2 Mutant Positive Control» y la probeta de Negative Control siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el sistema **ELiTe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, el control «**CoV-2 Wild Type Positive Control**» y el control «**CoV-2 Mutant Positive Control**» que quedan deben extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. El Negative Control que queda debe eliminarse.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «**PCR Cassette**» que contienen los productos de amplificación y los consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la **mezcla completa de reacción** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 2 sesiones de trabajo de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión de trabajo (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/los controles y la información relativa a la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Nota: El sistema **ELiTe InGenius** se puede conectar al «servidor de información de laboratorios» (LIS), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

El sistema **ELiTe InGenius** genera los resultados con el producto «SARS-CoV-2 VAR ELiTe MGB® Kit» mediante el siguiente procedimiento:

- Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
- Validación de los resultados de las muestras.
- Elaboración de los informes de resultados de las muestras

A. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de la amplificación

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de las dianas 484 y 501 (canales **484** and **501**) en la reacción de amplificación del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_PC» y «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_NC».

Los resultados del Positive Control y del Negative Control de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación utilizado, se guardan en la base de datos («Controls»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación, caducan **después de 15 días**.

El software del instrumento utiliza los resultados de las series de amplificación del Positive Control y del Negative Control para calcular los gráficos de control («Control Charts»). Se necesitan cuatro resultados de los controles Positive Control y del Negative Control de cuatro sesiones diferentes para configurar el gráfico de control («Control Chart»). Después de esto, los resultados del Positive Control y del Negative Control se utilizan para controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Nota: si el resultado del Positive Control o del Negative Control de la amplificación no cumple los criterios de aceptación, el instrumento muestra el mensaje «Failed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, debe repetirse la reacción de amplificación del Positive Control o del Negative Control.

Nota: si el Positive Control o el Negative Control se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, las muestras pueden aprobarse, pero los resultados no se validan. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

B. Validación de los resultados de la muestra

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas para las dianas 484 y 501 (canales **484** y **501**) y por la sonda del Internal Control (canal **IC**) en las reacciones de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo «SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100».

Los resultados se muestran en los informes generados por el instrumento («Result Display»).

La sesión de la muestra puede aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la siguiente tabla.

| 1) Positive Control | Estado |
|----------------------------------|----------|
| CoV-2 Wild Type Positive Control | APROBADO |
| CoV-2 Mutant Positive Control | APROBADO |
| 2) Negative Control | Estado |
| CoV-2 Negative Control | APROBADO |

Para cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según se establece en el algoritmo del **software ELiTe InGenius** y en los parámetros del protocolo del ensayo.

En la tabla siguiente se muestran los mensajes de los posibles resultados. Para cada muestra, el sistema muestra una combinación de los siguientes mensajes y especifica si las dianas patógenas se han detectado o no.

SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

| Resultado de la sesión de la muestra | Interpretación |
|---|--|
| CoV2 484: RNA Detected. 484E wild type. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con el codón 484E sin mutaciones. |
| CoV2 484: RNA Detected. 484K mutant. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con el codón 484K mutado. |
| CoV2 484: RNA Detected. 484Q mutant. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con el codón 484Q mutado. |
| CoV2 484: RNA Detected. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2, pero el análisis del codón 484 no era viable. |
| CoV2 501: RNA Detected. 501N wild type. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con el codón 501N sin mutaciones. |
| CoV2 501: RNA Detected. 501Y mutant. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con el codón 501Y mutado. |
| CoV2 501: RNA Detected. | Se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2, pero el análisis del codón 501 no era viable. |
| CoV2 484: RNA Not Detected or below the LoD. | No se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con la sonda 484. |
| CoV2 501: RNA Not Detected or below the LoD. | No se ha detectado en la muestra ARN del gen S del SARS-CoV-2 con la sonda 501. |
| Invalid - Retest Sample. | Resultado no válido del ensayo debido a un fallo en el Internal Control (extracción incorrecta o arrastre de inhibidores). Es necesario repetir el análisis. |

Las muestras que el **ELiTe InGenius Software** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ARN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente debido a la aparición de problemas en el paso de retrotranscriptasa, amplificación o extracción (degradación del ARN, reducción del título de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido) o a que el número de células de la muestra no era suficiente como consecuencia de una obtención de muestras incorrecta, lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse, tal cual o diluida, con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only». Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra puede volver a analizarse a partir de la extracción de una nueva porción en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras que se indican como «RNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar el ARN diana. En este caso no se puede descartar que el ARN diana esté presente en una concentración por debajo del límite de detección del ensayo (ver «Características de rendimiento»).

Las muestras notificadas como «RNA Detected» sin una indicación sobre el estado de los codones 484 y 501 no son aptas para la genotipificación. En este caso, el ARN diana se ha detectado en la muestra, pero no ha sido posible calcular una Tm, o el valor calculado para la Tm se encontraba fuera de los intervalos de Tm para la tipificación. Este último caso puede deberse a mutaciones diferentes de las previstas o a problemas en el paso de extracción (por ejemplo, arrastre de inhibidores en el eluido).

Nota: los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la sesión de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados («Result Display») por personal que tenga la cualificación de administrador («Administrator») o analista («Analyst») y siga las instrucciones de la interfaz. La ventana «Result Display» permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

C. Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y pueden verse o exportarse como «Sample Report» y «Track Report».

El «Sample Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la pista seleccionada.

El personal autorizado puede imprimir y firmar los informes «Sample Report» y «Track Report».

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit» se definió utilizando muestras de hisopados respiratorios y el sistema ELITE InGenius.

El LoD se definió analizando un panel de muestras negativas de hisopados respiratorios recogidos en UTM (COPAN Italia S.p.A.), que se enriquecieron con material de referencia certificado de SARS-CoV-2 («SARS-CoV-2, Culture Fluid», ZeptoMetrix) a un título conocido. Se prepararon seis niveles de diluciones comenzando por 562 gEq/mL y llegando hasta 32 gEq/mL. Cada nivel de dilución se procesó en 12 duplicados utilizando el sistema **ELITE InGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». El límite de detección (LoD) para la diana 484 se calculó mediante el análisis de regresión Probit de los datos como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

A continuación, el valor calculado para el LoD se verificó analizando 20 duplicados enriquecidos con material de referencia del SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 sin mutaciones y variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2, ZeptoMetrix) a las concentraciones declaradas y, después, estos se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». El LoD se confirmó según la directiva EP17-A del CSLI (al menos 18 resultados positivos de 20 duplicados).

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

| Límite de detección | Intervalo de confianza del 95 % | |
|---------------------|---------------------------------|-----------------|
| | Límite inferior | Límite superior |
| 470 gEq/mL | 296 | 1156 |

| Límite de detección para muestras de hisopados respiratorios y el ELITE InGenius | | | | | |
|--|------------|-----------|----|-----------|-----------|
| Muestra | Título | Diana | N | Positivas | Negativas |
| Exudados recogidos en UTM | 470 gEq/mL | Diana 484 | 20 | 18 | 2 |
| | | Diana 501 | 20 | 18 | 2 |

El valor del LoD para las dianas 484 y 501 se confirmó en 470 gEq/mL en el caso de hisopados respiratorios recogidos en UTM (COPAN Italia S.p.A.).

Inclusividad: eficacia de detección

La eficacia de amplificación y detección con las diferentes variantes del SARS-CoV-2 se evaluó mediante una comparación informática de las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos EpiCoV de la GISAID (Iniciativa global para compartir los datos de los virus gripales).

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes en la alineación de las secuencias para las regiones 484 y 501 del gen S del SARS-CoV-2 mostró conservación de la secuencia y ausencia de mutaciones reseñables, a excepción de las previstas, por lo que cabe esperar una amplificación y una detección eficientes de las diferentes variantes del SARS-CoV-2.

La inclusividad del ensayo, expresada como la eficiencia de detección de las diferentes variantes, se verificó realizando un análisis con el producto «SARS-CoV-2 ONBOARD Variant Swab Kit» de Microbix Biosystems.

Cada muestra del panel se diluyó en UTM negativo (COPAN Italia) y se analizó con el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

| Etiqueta de la OMS | Linaje Pango | Pos./Dup. | Resultado para 484 | Resultado para 501 |
|--------------------|------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| (sin mutaciones) | (sin mutaciones) | 3/3 | 484E sin mutaciones | 501N sin mutaciones |
| Alfa | B.1.1.7 | 3/3 | 484E sin mutaciones | 501Y mutado |
| Beta | B.1.351 | 3/3 | 484K mutado | 501Y mutado |
| Gamma | P.1 | 3/3 | 484K mutado | 501Y mutado |

Todas las variantes del SARS-CoV-2 analizadas se detectaron correctamente como positivas y el estado de los codones 484 y 501 se distinguió correctamente cuando se analizaron con el producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit».

Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos no intencionados del ensayo se evaluó mediante una comparación informática de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos.

Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes se revisaron en la alineación de las secuencias de otros microorganismos no pretendidos. El análisis de las regiones de hibridación demostró la ausencia de homologías reseñables y no indicó ninguna interferencia potencial.

La ausencia de reactividad cruzada con otros microorganismos que puede encontrarse en las muestras clínicas de hisopados respiratorios se verificó también analizando un panel de materiales de referencia certificados.

Las muestras de ADN o ARN genómicos de diferentes marcadores potencialmente interferentes de ATCC y ZeptoMetrix se analizaron a una alta concentración en tres duplicados utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only». Los ADN y ARN de cada microorganismo se enriquecieron con 0,4 ng por reacción de ARN total humano (InVivoScribe) y 500 ng por reacción de ADN genómico humano (Promega) con el fin de imitar la muestra clínica extraída.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

| Muestra | Resultado |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Virus de la gripe A (H1N1) | Sin reactividad cruzada |
| Virus de la gripe A (H3N2) | Sin reactividad cruzada |
| Virus de la gripe B (Florida) | Sin reactividad cruzada |
| Virus paragripal 1 | Sin reactividad cruzada |
| Virus paragripal 2 | Sin reactividad cruzada |
| Virus paragripal 3 | Sin reactividad cruzada |
| Metanemovirus humano | Sin reactividad cruzada |
| Coronavirus humano OC43 | Sin reactividad cruzada |
| Coronavirus humano 229E | Sin reactividad cruzada |
| SARS-CoV | Sin reactividad cruzada |
| VRS A | Sin reactividad cruzada |
| VRS B | Sin reactividad cruzada |
| Virus ECHO 4 | Sin reactividad cruzada |
| Rinovirus 1A | Sin reactividad cruzada |
| ADV | Sin reactividad cruzada |
| CMV | Sin reactividad cruzada |
| <i>Bordetella pertussis</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Escherichia coli</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Aspergillus spp</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Candida albicans</i> | Sin reactividad cruzada |
| <i>Pneumocystis jiroveci</i> | Sin reactividad cruzada |

Ninguno de los marcadores potencialmente interferentes mostró reactividad cruzada para la detección y la tipificación de las dianas de 484 y 501 cuando se analizaron con el producto «**SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit**».

Marcadores potencialmente interferentes: Interferencia

La ausencia de interferencia con otros microorganismos que puede encontrarse en las muestras clínicas de hisopados respiratorios se verificó también analizando un panel de materiales de referencia certificados.

Las muestras de ADN o ARN genómicos de diferentes marcadores potencialmente interferentes (ATCC y ZeptoMetrix) a una alta concentración se enriquecieron con material de referencia certificado de SARS-CoV-2 (BEI Resources) a una baja concentración (aproximadamente 30 gEq/reacción). Las muestras se analizaron en tres duplicados utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only». Cada muestra se enriqueció con 0,4 ng por reacción de ARN total humano (InVivoScribe) y 500 ng por ADN genómico humano (Promega) con el fin de imitar la muestra clínica extraída.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

| Muestra | Resultado |
|-----------------------------------|-------------------|
| Virus de la gripe A (H1N1) | Sin interferencia |
| Virus de la gripe A (H3N2) | Sin interferencia |
| Virus de la gripe B (Florida) | Sin interferencia |
| Virus paragripal 1 | Sin interferencia |
| Virus paragripal 2 | Sin interferencia |
| Virus paragripal 3 | Sin interferencia |
| Metaneumovirus humano | Sin interferencia |
| Coronavirus humano OC43 | Sin interferencia |
| Coronavirus humano 229E | Sin interferencia |
| SARS-CoV | Sin interferencia |
| VRS A | Sin interferencia |
| VRS B | Sin interferencia |
| Virus ECHO 4 | Sin interferencia |
| Rinovirus 1A | Sin interferencia |
| ADV | Sin interferencia |
| CMV | Sin interferencia |
| <i>Bordetella pertussis</i> | Sin interferencia |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | Sin interferencia |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Sin interferencia |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Sin interferencia |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Sin interferencia |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Sin interferencia |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Sin interferencia |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | Sin interferencia |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Sin interferencia |
| <i>Escherichia coli</i> | Sin interferencia |
| <i>Aspergillus spp</i> | Sin interferencia |
| <i>Candida albicans</i> | Sin interferencia |
| <i>Pneumocystis jiroveci</i> | Sin interferencia |

Ninguno de los marcadores potencialmente interferentes mostró un efecto reseñable en la detección y la tipificación de las dianas 484 y 501 cuando se analizaron con el producto «**SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit**».

Sustancias potencialmente interferentes

Un panel de sustancias potencialmente interferentes a las concentraciones pertinentes se analizó con el producto «**SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit**».

Las sustancias se añadieron individualmente a las muestras de hisopados respiratorios enriquecidas con material de referencia de la variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a una concentración de aproximadamente 3 veces el LoD. Las muestras se procesaron en tres duplicados en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Los valores de Ct de las dianas de 484 y 501 y del Internal Control (muestras de referencia y de análisis) se utilizaron para calcular el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) con el fin de evaluar la posible interferencia. El mismo análisis se llevó a cabo también para los valores de Tm de las dianas 484 y 501.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

| Muestra | %CV del Ct para 484 | %CV del Ct para 501 | %CV del Ct para el IC | %CV de Tm para 484 | %CV de Tm para 501 |
|------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Sangre | 2,28 | 2,62 | 2,08 | 0,12 | 0,09 |
| Mucina | 1,52 | 2,40 | 2,20 | 0,08 | 0,13 |
| Azitromicina | 2,02 | 2,29 | 0,98 | 0,16 | 0,09 |
| Ambroxol | 1,83 | 2,16 | 1,65 | 0,06 | 0,12 |
| Beclometasona | 2,83 | 3,24 | 0,77 | 0,11 | 0,33 |
| Ebastina | 1,83 | 2,58 | 0,65 | 0,06 | 0,09 |
| CPE - Internal Control | 1,33 | 1,46 | 0,70 | 0,09 | 0,12 |

Todas las muestras se detectaron y tipificaron correctamente para las dianas 484 y 501. El %CV de los valores de Ct fue inferior al 3,5 % para los valores de Ct y del 0,5 % para los valores de Tm.

Repetibilidad entre sesiones

La repetibilidad entre sesiones de los resultados obtenidos con el producto «**SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit**» cuando se utilizó el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de muestras de hisopados respiratorios. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de la variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD (1410 gEq/mL) y 5 veces el LoD (2350 gEq/mL).

La repetibilidad entre sesiones se evaluó a través del análisis de las muestras por parte del mismo operador, en cuatro duplicados, en dos sesiones al día, en dos días distintos, y utilizando el mismo lote de producto y el mismo instrumento. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Los valores de Ct de las dianas de 484 y 501 y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión. El mismo análisis se llevó a cabo también para los valores de Tm de las dianas 484 y 501.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

| Diana 484 | | | | |
|------------------|--------------|------------|--------------|--------------|
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 16/16 | 2,57 | 484E | 0,29 |
| 5xLoD | 16/16 | 2,49 | 484E | 0,09 |
| Negativas | 0/16 | - | - | - |
| Diana 501 | | | | |
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 16/16 | 2,78 | 501Y | 0,21 |
| 5xLoD | 16/16 | 3,01 | 501Y | 0,17 |
| Negativas | 0/16 | - | - | - |
| Internal Control | | | | |
| Muestra | Válidas/Dup. | %CV del Ct | | |
| Panel completo | 48/48 | 1,42 | | |

Todas las muestras se detectaron y tipificaron correctamente para las dianas 484 y 501. El %CV de los valores de Ct fue inferior al 3,5 % para los valores de Ct y del 0,3 % para los valores de Tm.

Reproducibilidad entre lotes

La reproducibilidad entre lotes de los resultados obtenidos con el producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit» cuando se utilizó el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de muestras de hisopados respiratorios. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de la variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD (1410 gEq/mL) y 5 veces el LoD (2350 gEq/mL).

La reproducibilidad entre lotes se evaluó a través del análisis de las muestras en cuatro duplicados, en dos sesiones al día y en dos días distintos. Se utilizaron tres lotes diferentes de producto en seis días distintos, en un instrumento y con un solo operador. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Los valores de Ct de las dianas de 484 y 501 y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión. El mismo análisis se llevó a cabo también para los valores de Tm de las dianas 484 y 501.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

| Diana 484 | | | | |
|------------------|--------------|------------|--------------|--------------|
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 48/48 | 2,48 | 484E | 0,25 |
| 5xLoD | 48/48 | 2,05 | 484E | 0,13 |
| Negativas | 0/48 | - | - | - |
| Diana 501 | | | | |
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 48/48 | 2,61 | 501Y | 0,19 |
| 5xLoD | 48/48 | 2,85 | 501Y | 0,21 |
| Negativas | 0/48 | - | - | - |
| Internal Control | | | | |
| Muestra | Válidas/Dup. | %CV del Ct | | |
| Panel completo | 144/144 | 1,61 | | |

Todas las muestras se detectaron y tipificaron correctamente para las dianas 484 y 501. El %CV de los valores de Ct fue inferior al 3 % para los valores de Ct y del 0,3 % para los valores de Tm.

Reproducibilidad entre instrumentos

La reproducibilidad entre instrumentos de los resultados obtenidos con el producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit» cuando se utilizó el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de muestras de hisopados respiratorios. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de la variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD (1410 gEq/mL) y 5 veces el LoD (2350 gEq/mL).

La reproducibilidad entre instrumentos se evaluó a través del análisis de las muestras en cuatro duplicados, en dos sesiones al día y en dos días distintos. Se utilizaron tres lotes diferentes de producto en seis días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Los valores de Ct de las dianas de 484 y 501 y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión. El mismo análisis se llevó a cabo también para los valores de Tm de las dianas 484 y 501.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

| Diana 484 | | | | |
|------------------|--------------|------------|--------------|--------------|
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 24/24 | 1,88 | 484E | 0,16 |
| 5xLoD | 24/24 | 2,11 | 484E | 0,14 |
| Negativas | 0/24 | - | - | - |
| Diana 501 | | | | |
| Muestra | Pos./Dup. | %CV del Ct | Tipificación | %CV de la Tm |
| 3xLoD | 24/24 | 2,29 | 501Y | 0,21 |
| 5xLoD | 24/24 | 2,27 | 501Y | 0,24 |
| Negativas | 0/24 | - | - | - |
| Internal Control | | | | |
| Muestra | Válidas/Dup. | %CV del Ct | | |
| Panel completo | 72/72 | 1,73 | | |

Todas las muestras se detectaron y tipificaron correctamente para las dianas 484 y 501. El %CV de los valores de Ct fue inferior al 2,5 % para los valores de Ct y del 0,3 % para los valores de Tm.

Pruebas del panel de eficacia

El producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit» se evaluó con el sistema ELITE InGenius analizando el panel de eficacia «QCMD 2020 Coronavirus Outbreak Preparedness (CVOP) EQA Pilot Study» (QCMD, Reino Unido). El panel imitaba muestras de hisopados respiratorios en medio de transporte e incluyó muestras negativas para SARS-CoV-2, muestras con microorganismos interferentes y muestras positivas para SARS-CoV-2.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Se analizaron los valores de Ct y de Tm de las dianas de 484 y 501.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

| ID de la muestra | Contenido | Título (log c./mL) | Ct para 484 | Tm para 484 | Ct para 501 | Tm para 501 | Resultado |
|------------------|------------------|--------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|--|
| CPO20S-01 | SARS-CoV-2 | 4,30 | 31,45 | 66,4 | 34,67 | 56,6 | Positivo 484 sin mutaciones/501 sin mutaciones |
| CPO20S-02 | Coronavirus NL63 | 4,64 | Sin determinar | N/A | Sin determinar | N/A | Negativo |
| CPO20S-03 | SARS-CoV-2 | 3,30 | 34,49 | 66,7 | 38,46 | 56,6 | Positivo 484 sin mutaciones/501 sin mutaciones |
| CPO20S-04 | Coronavirus OC43 | 4,03 | Sin determinar | N/A | Sin determinar | N/A | Negativo |
| CPO20S-05 | Muestra negativa | - | Sin determinar | N/A | Sin determinar | N/A | Negativo |
| CPO20S-06 | SARS-CoV-2 | 4,30 | 31,86 | 66,4 | 34,96 | 56,6 | Positivo 484 sin mutaciones/501 sin mutaciones |
| CPO20S-07 | SARS-CoV-2 | 5,30 | 28,47 | 66,6 | 31,10 | 56,7 | Positivo 484 sin mutaciones/501 sin mutaciones |
| CPO20S-08 | SARS-CoV-2 | 2,30 | 38,57 | 67,5 | Sin determinar | N/A | Positivo 484 sin mutaciones/ 501 n/a |

SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

Todas las muestras se detectaron correctamente como positivas o negativas. Las muestras positivas se tipificaron para las dianas 484 y 501 tal como se esperaba. Debido a su bajo título (aproximadamente 200 c./mL), la tipificación para la diana 501 no fue viable en la muestra CPO20S-08.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras de SARS-CoV-2 sin mutaciones (484E y 501N)

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas de SARS-CoV-2 sin mutaciones (484E y 501N), se evaluó analizando muestras clínicas de hisopados respiratorios recogidos en UTM (COPAN Italia), que se certificaron como negativos para SARS-CoV-2 mediante un ensayo para diagnóstico *in vitro* con marcado CE y se enriquecieron con material de referencia de SARS-CoV-2 sin mutaciones de ZeptoMetrix (cepa aislada USA-WA1/2020).

Las muestras se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Se analizaron los valores de Ct y de Tm de las dianas de 484 y 501. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

| Muestras sin mutaciones | N | 484E sin mutaciones | 484K mutado | 484Q mutado | 484 negativo | No válida |
|--|----|---------------------|-------------|-------------|--------------|-----------|
| Muestras negativas de hisopados respiratorios enriquecidas con SARS-CoV-2 sin mutaciones | 48 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Muestras sin mutaciones | N | 501N sin mutaciones | 501Y mutado | 501 negativo | No válida |
|--|----|---------------------|-------------|--------------|-----------|
| Muestras negativas de hisopados respiratorios enriquecidas con SARS-CoV-2 sin mutaciones | 48 | 48 | 0 | 0 | 0 |

Todas las muestras dieron un resultado positivo para las dianas 484 y 501 y se detectaron como 484E y 501N sin mutaciones. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras de SARS-CoV-2 mutado (E484K, E484Q o N501Y)

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas de SARS-CoV-2 mutado (E484K, E484Q o N501Y), se evaluó analizando muestras clínicas de hisopados respiratorios recogidos en UTM (COPAN Italia), que se certificaron como negativos para SARS-CoV-2 con un ensayo para diagnóstico *in vitro* con marcado CE y se enriquecieron con:

- material de referencia de la variante beta del SARS-CoV-2 (E484K y N501Y) de ZeptoMetrix (Sudáfrica/KRISP-K005325/2020),
- ADN plasmídico con una región amplificada del gen S del SARS-CoV-2 S con la mutación E484Q, de la variante kappa del SARS-CoV-2 (India) y la mutación N501Y,
- material de referencia de la variante alfa del SARS-CoV-2 (484E y N501Y) de ZeptoMetrix (cepa aislada de Inglaterra/204820464/2020).

Las muestras se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Se analizaron los valores de Ct y de Tm de las dianas de 484 y 501. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

| Muestras de E484K | N | 484E sin mutaciones | 484K mutado | 484Q mutado | 484 negativo | No válida |
|--|----|---------------------|-------------|-------------|--------------|-----------|
| Muestras negativas de hisopados respiratorios enriquecidas con la variante beta del SARS-CoV-2 | 48 | 1 | 47 | 0 | 0 | 0 |

Todas las muestras dieron un resultado positivo para las dianas 484 y 501 en el primer análisis. Cuarenta y siete (47) de 48 muestras se detectaron como E484K mutado. Una dio un resultado no mutado para la posición 484 del gen S (484E), probablemente debido a un error durante el procedimiento de enriquecimiento. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo para la mutación E484K fue del 97,6 %.

SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit
Reactivos para la retrotranscriptasa de ARN y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS171ING

| Muestras de E484Q | N | 484E sin mutaciones | 484K mutado | 484Q mutado | 484 negativo | No válida |
|---|----|---------------------|-------------|-------------|--------------|-----------|
| Muestras negativas de hisopados respiratorios enriquecidas con ADN plasmídico | 45 | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 |

Todas las muestras dieron un resultado positivo para las dianas 484 y 501 en el primer análisis y se detectaron como E484Q mutado. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo para la mutación E484Q fue del 100 %.

| Muestras de N501Y | N | 501N sin mutaciones | 501Y mutado | 501 negativo | No válida |
|--|----|---------------------|-------------|--------------|-----------|
| Muestras negativas de hisopados respiratorios enriquecidas con la variante alfa del SARS-CoV-2, la variante beta del SARS-CoV-2 o ADN plasmídico | 96 | 0 | 96 | 0 | 0 |

Todas las muestras dieron un resultado positivo para las dianas 484 y 501 en el primer análisis y se detectaron como N501Y mutado. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo para la mutación N501Y fue del 100 %.

Nota: los datos y resultados completos de los análisis las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con la matriz y el instrumento se incluyen en la documentación técnica del producto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit», FTP 171ING.

BIBLIOGRAFÍA

P. Zhou et al. (2020) *Nature* **579**: 270–273

C. W. Ku et al. (2021) *Int J Infect Dis* **104**: 255 - 261.

R. A. Lee et al. (2021) *J Clin Microbiol* doi: 10.1128/JCM.02881-20.

Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases, WHO interim guidance 19 March 2020

Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19, CDC 6 January 2021

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este producto está diseñado para uso exclusivo *in vitro*.

Utilizar este producto únicamente con muestras clínicas de hisopados respiratorios (nasofaríngeos, nasales o bucofaríngeos).

En la actualidad, no se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con las siguientes muestras clínicas: saliva, lavados broncoalveolares (LBA), esputo, aspirados nasofaríngeos y sobrenadante de cultivo celular.

No utilizar este producto con una cantidad de ARN extraído superior a 1 µg, pues una alta cantidad de ácidos nucleicos puede inhibir las reacciones de retrotranscriptasa y de amplificación y dar lugar a resultados no válidos.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir estrictamente las instrucciones incluidas con los productos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación cruzada con las muestras positivas, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Las contaminaciones cruzadas dan lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar las contaminaciones cruzadas. Sin embargo, las contaminaciones cruzadas solo pueden evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Para utilizar este producto y con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de ropa de trabajo y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de áreas independientes para la prueba de biología molecular y la prueba de cultivo microbiológico.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por profesionales debidamente formados y cualificados en técnicas de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos.

Es necesario tener áreas separadas para la preparación de la mezcla de reacción completa y la extracción/amplificación/detección de los productos de amplificación.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ARN diana no se ha detectado en el ARN extraído de la muestra. No obstante, no puede descartarse que el ARN diana tenga un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

La investigación de las publicaciones científicas no proporciona información exhaustiva sobre el rendimiento del análisis molecular del SARS-CoV-2 en la población pediátrica.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del Internal Control. En este caso, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción, lo que puede provocar retrasos a la hora de obtener los resultados finales.

Asimismo, los posibles polimorfismos, así como las inserciones o eliminaciones existentes en la región del ARN diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto, pueden afectar negativamente a la detección del ARN diana.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no puede eliminarse ni reducirse aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

| Reacción no válida del Positive Control | |
|---|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error de configuración del instrumento. | Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como la del Positive Control. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como los del Positive Control. |
| Error en la preparación de la mezcla completa de reacción. | Comprobar los volúmenes de los reactivos utilizados durante la preparación de la mezcla completa de reacción. |
| Degradación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes. | No utilizar la mezcla completa de reacción durante más de tres sesiones (7 horas en el área de inventario). No dejar la mezcla completa de reacción a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes. |
| Degradación del control positivo. | No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes (3 horas cada una en el área de extracción). Utilizar una nueva alícuota de Positive Control. |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup. |

| Reacción no válida del Negative Control | |
|--|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error de configuración del instrumento. | Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como del control negativo. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como del control negativo. |
| Configuración incorrecta de la sesión en el ELITE InGenius | Comprobar la posición de la mezcla de reacción o la del control negativo. Comprobar el volumen de la mezcla de reacción o el del control negativo. |
| Error al configurar el instrumento | Comprobar la configuración de las posiciones de las muestras, de los controles negativos y de los calibradores en el instrumento. |
| Contaminación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes. | Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes. |
| Contaminación del control negativo | Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular. |
| Contaminación del área de extracción, de las gradillas o del bloque de inventario. | Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir las probetas y las puntas utilizadas. |
| Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación. | Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas. |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup. |

| Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardíos similares) | |
|---|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos. | Evitar cualquier contacto entre la micropipeta y la pared de la probeta. Limpiar la micropipeta con solución de hipoclorito de sodio al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra. No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz del ELITE InGenius Software. Seguir la secuencia de carga indicada por el software. |
| Contaminación medioambiental en el laboratorio | Limpiar todas las superficies que están en contacto con el operador y las muestras (inclusive las pipetas) con solución de hipoclorito de sodio al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN. Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV. Utilizar una nueva probeta de la mezcla de PCR. |

| Reacción no válida de la muestra | |
|---|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error en la configuración de la sesión. | Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como de la muestra. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como de la muestra. |
| Error en la preparación de la mezcla completa de reacción. | Comprobar los volúmenes de los reactivos utilizados durante la preparación de la mezcla completa de reacción. |
| Degradación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes. | No utilizar la mezcla completa de reacción durante más de tres sesiones (7 horas en el área de inventario). No dejar la mezcla completa de reacción a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. No exponer la mezcla «RT EnzymeMix» a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos. Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes. |
| Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras. | Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una ejecución en el modo «PCR Only». Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR». |
| Degradación de la muestra. | Utilizar una nueva alícuota de la muestra |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup. |

| Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones | |
|---|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Distribución incorrecta de la muestra. | Mezclar con cuidado las muestras, los controles negativos y los calibradores en la mezcla de reacción, pipeteando minuciosamente tres veces. Evitar la formación de burbujas. |
| Error de configuración del punto de referencia. | Configurar el rango de cálculo de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal aún no ha empezado a aumentar, p. ej., del ciclo 6 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline». |

| Error 30103 | |
|---|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Concentración demasiado alta de la diana en la muestra. | Si se observa una amplificación notable en el gráfico de PCR, proceder de la manera siguiente: - Seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se necesita un valor de Ct, proceder de la manera siguiente: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR». |

| Error de TH | |
|--|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Muestra con una forma anómala en el gráfico. | Si se observa una amplificación notable en el punto de referencia negativo del gráfico de PCR: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR». |

SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo



Límite superior de temperatura

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad (último día del mes)

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.



Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: consultar las instrucciones de uso.

CONT

Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante.

**AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA
LIMITADA**

Este producto contiene reactivos fabricados por Thermo Fisher Scientific, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Thermo Fisher Scientific. La compra de este producto incluye derechos limitados y no transferibles para utilizar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico en humanos. Para obtener información sobre cómo adquirir una licencia para este producto con fines distintos de los indicados anteriormente, contactar con el departamento de licencias de Thermo Fisher Scientific. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256, así como por patentes europeas, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

Esta licencia limitada permite a la persona, o a la entidad legal a la que se ha suministrado el producto, utilizar este producto y los datos generados con el uso de este exclusivamente para el diagnóstico en humanos. Ni ELITechGroup S.p.A. ni sus licenciarios otorgan ninguna otra licencia, explícita o implícita, para cualquier otro propósito.

SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® KIT (Ref. RTS171ING)
SARS-CoV-2 Variants - ELITE Positive Control (Ref. CTR171ING)
 used in association with ELITE InGenius®

ELITechGroup
 EMPOWERING IVD

Caution, this document is a simplified version of the official instruction for use. This document is available only in English.
 Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

A. Intended use

The «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification and melting curve analysis assay, for the detection and discrimination of the mutations E484K, E484Q and N501Y of the S gene of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in clinical samples from subjects infected by the virus.

The assay is able to detect the mutations associated with the following variants: Alpha variant (UK), lineage B.1.1.7, the Beta variant (South Africa), lineage B.1.351, the Gamma variant (Japanese), lineage P1, the Zeta variant (Brazil), lineage P2, the Eta variants (Nigeria), lineage B.1.525 and Kappa variant (India), lineage B.1617.1.

The assay is validated in association with «ELITE InGenius®» system and Respiratory Swab samples (nasopharyngeal, nasal or oropharyngeal swabs).

The product is used as a reflex test to identify the possible presence of the N501Y, E484K and E484Q mutations of the SARS-Cov-2 S gene, in samples already diagnosed as positive for SARS-CoV-2.

B. Amplified sequences

| Target | Gene | Fluorophore | Channel |
|-------------------------------|--------------------|-------------|-----------|
| 484 | S gene, 484 target | FAM | 484 (Ch1) |
| 501 | S gene, 501 target | AP593 | 501 (Ch4) |
| Internal Control (endogenous) | RNase P gene | AP525 | IC (Ch3) |

C. Validated Matrixes



› Respiratory Swabs

Note: Transfer 200 µL of sample from the Swab tube into the extraction tube. Do not insert the primary tube directly into the instrument to perform the run.



D. Tube type collection

| Copan Ref. | Description |
|--------------|-------------|
| 360C or 305C | UTM kit |

E. SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® KIT (RTS171ING) content

| CoV-2 Variants PCR Mix (Neutral cap) | RT EnzymeMix (Black cap) | Maximum shelf-life: 12 Months |
|---|---|---|
|  X 2 |  X 2 | Storage temp.: below -20 °C |
| 2 tubes of 1200 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles | 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles | Prepare the complete reaction mixture in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005) |

F. SARS-CoV-2 Variants - ELITE Positive Control (CTR171ING) content

| CoV-2 Wild Type Positive Control (black cap) | CoV-2 Mutant Positive Control (red cap) | Maximum Shelf-life: 24 Months |
|---|---|-------------------------------|
|  X 2 |  X 2 | Storage temp.: below -20 °C |
| 2 tubes of 160 µL 4 sessions / tube 4 freeze-thaw cycles | 2 tubes of 160 µL 4 sessions / tube 4 freeze-thaw cycles | |

G. Material required not provided in the kit

| | |
|--|--------------|
| › ELITE InGenius instrument: | INT030 |
| › ELITE InGenius SP200 Extraction Kit: | INT032SP200 |
| › ELITE InGenius PCR Cassette: | INT035PCR |
| › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: | INT032CS |
| › ELITE InGenius Waste Box: | F2102-000 |
| › 300 µL Filter Tips Axygen: | TF-350-L-R-S |

H. ELITE InGenius protocol

| Protocol | Volume |
|-------------------|---------|
| Sample | 200 µL |
| Total eluate | 100 µL |
| PCR eluate input | 10 µL |
| Complete PCR Mix | 20 µL |
| Control Frequency | 15 days |

I. Result Interpretation

Sample results:

| Result of sample run | Interpretation |
|---|---|
| CoV2 484: RNA Detected. 484E wild type. | The RNA of SARS-CoV-2 484E wild type was detected in the sample |
| CoV2 484: RNA Detected. 484K mutant. | The RNA of SARS-CoV-2 484K mutant was detected in the sample |
| CoV2 484: RNA Detected. 484Q mutant. | The RNA of SARS-CoV-2 484Q mutant was detected in the sample |
| CoV2 484: RNA Detected. | The RNA of SARS-CoV-2 was detected in the sample, but 484 typing was not feasible |
| CoV2 501: RNA Detected. 501N wild type. | The RNA of SARS-CoV-2 501N wild type was detected in the sample |
| CoV2 501: RNA Detected. 501Y mutant. | The RNA of SARS-CoV-2 501Y mutant was detected in the sample |
| CoV2 501: RNA Detected. | The RNA of SARS-CoV-2 was detected in the sample, but 501 typing was not feasible |
| CoV2 484: RNA Not Detected or below the LoD | The RNA of SARS-CoV-2 484 was not detected in the sample |
| CoV2 501: RNA Not Detected or below the LoD | The RNA of SARS-CoV-2 501 was not detected in the sample |
| Invalid – Retest sample. | Not valid result caused by Internal Control failure |

Sample Ct and Tm range:

| Ct 484 | Tm 484 | Ct 501 | Tm 501 | Ct RNase P | Result |
|--------|-------------|--------|-------------|------------|------------------------------------|
| Det. | 65.5 - 68.5 | - | - | +/- | SARS-CoV-2 484E wild type |
| Det. | 59.4 - 61.7 | - | - | +/- | SARS-CoV-2 mutation E484K detected |
| Det. | 57.1 - 59.3 | - | - | +/- | SARS-CoV-2 mutation E484Q detected |
| - | - | Det. | 55.6 - 58.6 | +/- | SARS-CoV-2 501N wild type |
| - | - | Det. | 62.6 - 65.6 | +/- | SARS-CoV-2 mutation N501Y detected |
| Undet. | - | Undet. | - | Ct > 35 | Invalid |

Positive Control Ct and Tm limits:

| Controls | Target | Ct | Tm | Result |
|----------------------------------|----------|---------|-------------|------------------------|
| CoV-2 Wild Type Positive Control | 484E WT | Ct < 35 | 65.5 - 68.5 | Positive Control Valid |
| | 501N WT | Ct < 38 | 55.6 - 58.6 | |
| CoV-2 Mutant Positive Control | 484K MUT | Ct < 37 | 59.4 - 61.7 | Positive Control Valid |
| | 501Y MUT | Ct < 36 | 62.6 - 65.6 | |
| Negative Control | 484 | Ct > 45 | - | Negative Control Valid |
| | 501 | Ct > 45 | - | |

J. Samples

- Sample inactivation is not required as shown in WHO guideline. The sample can be pretreated with a denaturant solution under a Biosafety cabinet of class II (BSC2). In case of this procedure, dispense 200 µL of sample into the tubes and no more than 200 µL of buffer containing denaturants. Note: This procedure is an off-label protocol and needs to be validated before use as per WHO guidelines
- Handle and dispose of all biological samples as if they were able to transmit infectious agents even if the sample is inactivated.
- Eluates obtained with extraction in association with SARS-CoV-2 ELITE MGB KIT (Ref. RTS170ING) or SARS-CoV-2 PLUS ELITE MGB KIT (Ref. RTS180ING) can be used.
- High-medium viral titre for SARS- CoV-2 allows to obtain good results using this reflex kit.

K. References

- ECDC Reference: "Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom" December 2020

L. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse transcription, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, PCR only or extraction only.

Before analysis

| | | |
|---|--|---|
| 1. Switch on ELITE InGenius Login with username and password Select the mode "Closed" | 2. Verify controls in the "Control menu": CoV-2 Wild Type Positive Control, CoV-2 Mutant Positive Control, negative control Note: All had to be run, approved and not expired | 3. Thaw the CoV-2 VAR PCR Mix and RT Enzyme Mix tubes Mix gently and spin down 5 sec Reconstitute the complete reaction mixture in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005) as shown in the table below |
|---|--|---|

Complete reaction mixture preparation:

| Reagent | 1 Reaction | Samples N | Total reactions |
|------------------------|------------|-----------|-----------------|
| CoV-2 Variants PCR Mix | 20 µL | 1 to 5 | N + 1 |
| RT Enzyme Mix | 0.3 µL | 6 to 11 | N + 2 |
| | | 12 | N + 2.5 |

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

| | | |
|---|--|---|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elute: "100 µL" | 3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest | 5. Select the sample position: "Extraction tube" Note: 200 µL of sample must be transferred into Extraction tube For samples see C and D | 6. Load the complete reaction mixture in the inventory block |
| 7. Load the PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks | 8. Close the door Start the run | 9. View, approve and store the results |

Procedure 2 - PCR only

| | | |
|--|--|--|
| 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above | 5. Select the mode: "PCR only" Set the sample position: "Elution tube" | 6. Load the extracted nucleic acid tubes in the Elution tubes rack |
| 7. Load the complete reaction mixture in the inventory block Load the PCR cassette, Elution tube, Tip racks | 8. Close the door Start the run | 9. View, approve and store the results |

Procedure 3 - Extraction only

| | | |
|---|---|--|
| 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above | 5. Select the mode: "Extraction Only" Set the sample position: "Extraction tube" Note: 200 µL of sample must be transferred into Extraction tube For samples see C and D | 6. Load the Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks. |
| 7. Close the door Start the run | 8. Archive the eluted samples | |