

RIDA® GENE Coronavirus

REF PG6805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDA®GENE Coronavirus, realizado en el equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 II, es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de los coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS-CoV en hisopos nasofaríngeos humanos no tratados de personas con signos y síntomas de infección respiratoria.

El ensayo RIDA®GENE Coronavirus está diseñado para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS-CoV en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

El producto está previsto para uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los coronavirus pertenecen a la familia Coronaviridae y son virus de ARN monocatenario (mc). Debido a su gran variabilidad genética, las especies de virus individuales pueden superar la barrera de las especies e infectar a diferentes especies de huéspedes. Ejemplos de estas transmisiones entre especies son las infecciones por SARS-CoV (Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave), responsables de la pandemia de SARS en 2002/2003⁽¹⁾, y el MERS-CoV (Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio), que apareció en 2012⁽²⁾. El SARS-CoV provoca síntomas de neumonía atípica y se cobró más de 1000 muertes durante la pandemia de 2002/2003. Se cree que los huéspedes originales de reservorio son las civetas y los murciélagos. Aunque las distintas vías de transmisión no están totalmente aclaradas, la transmisión se produce principalmente a través de la infección por gotitas. No se puede descartar la infección por contacto o por vía fecal-oral.

Para 2015, se confirmaron más de 1100 infecciones por MERS-CoV en todo el mundo y se registraron más de 420 muertes asociadas al MERS-CoV^(3,4). La mayoría de estos casos se han identificado en la Península Arábiga. Tampoco se ha identificado aún con claridad el huésped original del MERS, pero se sospecha que los dromedarios son la principal fuente de transmisión⁽⁵⁾. Tras un periodo de incubación de 1 a 2 semanas, aparecen síntomas similares a los de la gripe; los casos graves pueden provocar neumonía y dificultad respiratoria aguda.

Además del SARS-CoV y el MERS-CoV, los diversos coronavirus patógenos humanos HKU1, NL63, 229E, OC43 son los desencadenantes de infecciones respiratorias leves hasta síndromes respiratorios agudos graves⁽⁶⁾. Aunque los cuatro coronavirus están presentes en todo el mundo, se detectan en diferentes regiones y en distintas épocas del año.

El coronavirus humano 229E (HCoV-229E) pertenece al género *Alphacoronavirus* y, junto con el coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43, género: *Betacoronavirus*), que suele ser responsable de los resfriados⁽²⁾. Otros coronavirus Beta son el SARS-CoV, el MERS-CoV y el Coronavirus HKU1. El último fue diagnosticado en 2005 en un paciente hospitalizado con síndrome respiratorio agudo y neumonía en China⁽⁷⁾. Las infecciones por el coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63) son similares a las de la parainfluenza. El virus se descubrió por primera vez en un niño con bronquiolitis en los Países Bajos en 2003 y desde entonces se ha detectado en todo el mundo en niños pequeños y en pacientes inmunodeprimidos con síndrome respiratorio agudo⁽⁸⁾.

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Coronavirus es un ensayo de RT-PCR multiplex para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS-CoV. Una vez aislado el ARN, se amplifican los fragmentos de genes específicos de los coronavirus y del MERS-CoV (ORF1) (si están presentes). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq polymerase** separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un dispositivo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Coronavirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras o una posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2 ×	700 µl	Amarillo, listo para usar
2	PP-Mix	1 ×	770 µl	Verde claro, listo para usar
3	Enzyme-Mix	1 ×	80 µl	Rojo, listo para usar
R	Internal Control RNA	2 ×	1800 µl	Marrón, listo para usar
N	PCR Water	1 ×	500 µl	Blanco, listo para usar
P	Positive Control	1 ×	100 µl	Azul, listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la Tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador de +2 °C a +8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 15 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (+2 °C a +8 °C).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
Sin abrir	-20 °C	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
Abierto	-20 °C	15 ciclos de descongelación y congelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Reactivos suministrados

Los siguientes reactivos son necesarios para realizar los ensayos RIDA®GENE Coronavirus:

Reactivos
Agua para PCR (agua sin nucleasas)

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar los ensayos RIDA®GENE Coronavirus:

Equipo
Plataforma de extracción: Maxwell® RSC (Promega)
Equipo de PCR en tiempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
Consumibles para ensayo de PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], recipientes de reacción, papeles aluminio)
Centrífuga con rotor para placas
Agitador de vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

Si tiene preguntas sobre el uso de equipos para el procesamiento automatizado, póngase en contacto con R-Biopharm AG en automation@r-biopharm.de.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y los resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

Está prohibido intercambiar y mezclar los componentes (Reaction Mix, PP Mix Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, PCR Water) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Los materiales peligrosos se indican según las obligaciones de etiquetado. Para obtener más información al respecto, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS).

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ARN a partir de hisopos nasofaríngeos

Para la preparación de ARN a partir de hisopos, se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, Maxwell[®] RSC [Promega]) que estén disponibles en el mercado. Preste atención a la información proporcionada por el fabricante.

El ensayo RIDA[®]GENE Coronavirus contiene un Internal Control RNA que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El Internal Control RNA puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de proceso (control de extracción e inhibición).

Cuando el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición para la amplificación, se debe añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (Tabla 3).

Cuando el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición para la amplificación, se debe añadir 20 µl de **Internal Control RNA** durante la extracción. Se recomienda añadir **Internal Control RNA** a la mezcla de muestra y tampón de lisado siempre que sea posible, y no directamente al material de la muestra. Se recomienda añadir 1 µl por cada reacción del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR de control negativo y a la de control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (Tablas 3 y 4). Descongele, agite en un mezclador vórtex (excepto la Enzyme Mix) y centrifugue por un corto tiempo la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, la **PCR water** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante la etapa de trabajo (+2 a +8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20,1 µl	221,1 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

Tabla 4: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,1 µl	232,0 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (viales/placas).

Control negativo: Pipetee 5 µl de PCR Water en la mezcla maestra correspondiente.

Nota: Cuando se use el Internal Control RNA como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda pipetear 1 µl del Internal Control RNA a cada mezcla para PCR del control negativo.

Muestras: Añada 5 µl de eluato a cada mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de Positive Control pipeteados a la mezcla maestra correspondiente.

Nota: Cuando se use el Internal Control RNA como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda pipetear 1 µl del Internal Control RNA a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente a baja velocidad y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. Comience el ensayo de PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (Tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal de RT-PCR en tiempo real en el equipo LightCycler® 480 II

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

Nota: El perfil universal de PCR en tiempo real también puede utilizarse para las pruebas de ADN si se combinan en una sola corrida los ensayos de PCR en tiempo real RIDA®GENE DNA y RIDA®GENE ARN.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 6: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
Roche LightCycler® 480 II	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001)
	ICR	533/580	
	MERS-CoV	618/660	

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la Tabla 7).

El **Positive Control** está disponible en una concentración de 10^3 copias/ μ l. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

Tabla 7: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

**1 No es necesario tener un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.*

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Interpretación de los resultados

Tabla 8: Interpretación de los resultados

Detección de			Resultado
Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV	ICR	
positivo	negativo	positivo /negativo	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) detectables
negativo	positivo	positivo /negativo	MERS-CoV detectable
positivo	positivo	positivo /negativo	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS-CoV detectables
negativo	negativo	positivo	Negativo (los genes diana no son detectables)
negativo	negativo	negativo	No válido

Una muestra es positiva si, tanto el ARN de la muestra como el **Internal Control RNA** presentan una amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también se califica como positiva si el ARN de la muestra presenta amplificación, pero el **Internal Control RNA** no muestra amplificación en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria en este caso debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control RNA** sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si la muestra de ARN no presenta amplificación, aunque el **Internal Control RNA** presente amplificación en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** puede descartar la inhibición de la reacción de PCR.

La muestra no es válida si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción. La muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA[®]GENE Coronavirus detecta ARN de coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y ARN de MERS-CoV a partir de hisopos nasofaríngeos humanos no tratados. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está diseñada solo para hisopos nasofaríngeos humanos.
4. El muestreo, transporte, almacenamiento y manipulación inadecuados o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica de la prueba pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
5. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
7. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados negativos falsos con el ensayo RIDA[®]GENE Coronavirus.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes diana correspondientes (ORF1) están presentes.
9. Este ensayo debería realizarse de conformidad con los Reglamentos de la UE referidos a las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir con precisión las indicaciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo RIDA®GENE Coronavirus multiplex en tiempo real RT-PCR tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ARN/reacción para los coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y MERS-CoV (Fig. 1, Fig. 2).

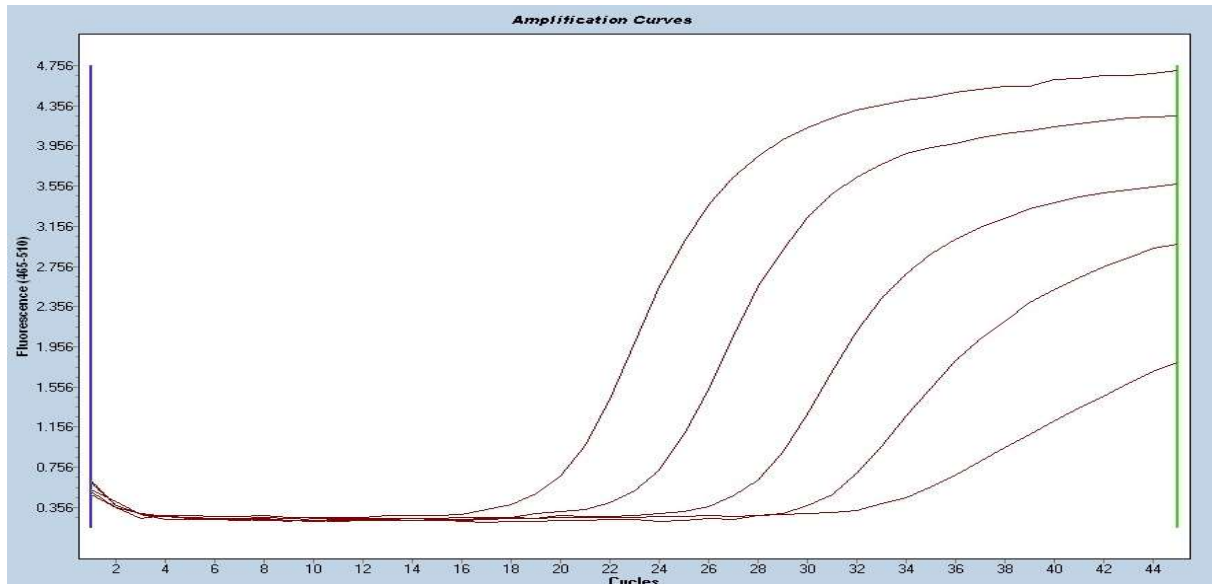


Figura 1: Dilución seriada de coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) (10^5 a 10^1 copias de ARN/ μ l) en el LightCycler® 480 II

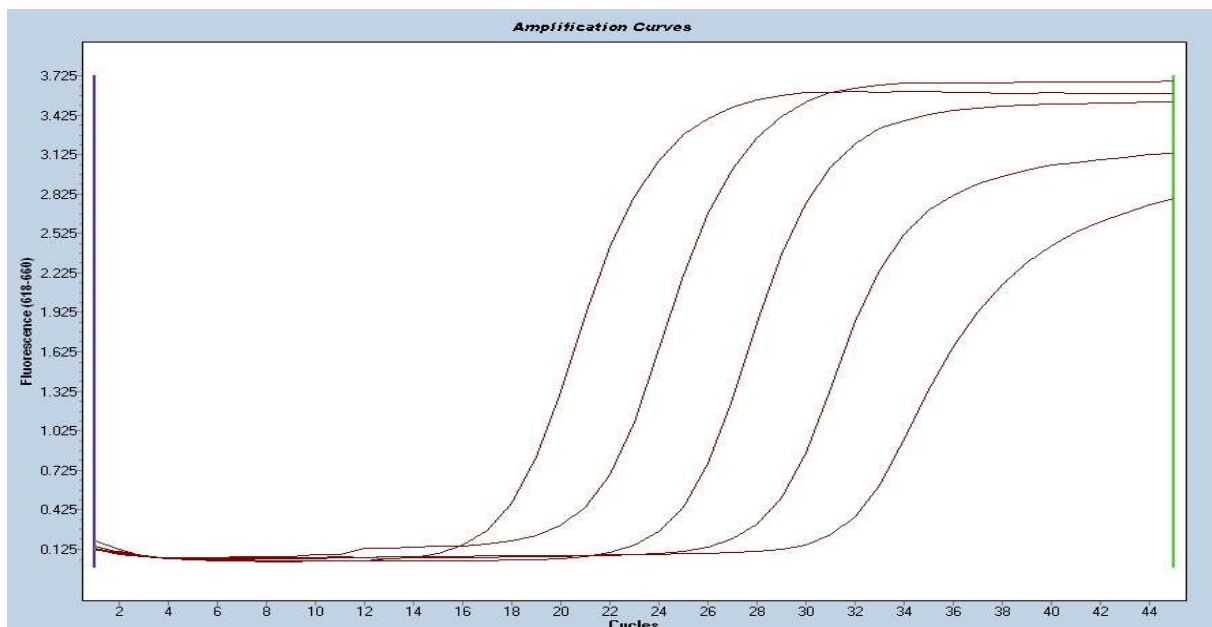


Figura 2: Dilución seriada de MERS (10^5 - 10^1 copias de ARN/ μ l) en el LightCycler® 480 II

El límite de detección de todo el método depende de la matriz de la muestra, la extracción del ARN y el contenido de ARN.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Coronavirus es específico para los coronavirus. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (Tabla 9):

Tabla 9: Organismos con posible reactividad cruzada

Microorganismo	Resultados del ensayo	
	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV
<i>Acinetobacter baumannii</i> , cepa 5377	negativo	negativo
Adenovirus	negativo	negativo
Adenovirus 1, humano, cepa adenoide 71	negativo	negativo
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	negativo	negativo
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	negativo	negativo
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	negativo	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negativo	negativo
<i>Arcobacter butzleri</i>	negativo	negativo
Astrovirus	negativo	negativo
<i>Bacillus cereus</i>	negativo	negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> , cepa 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	negativo	negativo
<i>Campylobacter coli</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	negativo	negativo
<i>Clostridium bifermentans</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sporogenes</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium septicum</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium novyi</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O6)	negativo	negativo

<i>E. coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativo	negativo
Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	negativo	negativo
Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	negativo	negativo
Virus del herpes simple 2, cepa MS	negativo	negativo
Metaneumovirus humano	negativo	negativo
Virus de Coxsackie humano B4	negativo	negativo
Citomegalovirus humano	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 1, cepa C35	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 2, cepa Greer	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 4b, cepa CH19503	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana, serotipo 3	negativo	negativo
Virus respiratorio sincitial humano cepa Long	negativo	negativo
Virus respiratorio sincitial humano cepa 9320	negativo	negativo
Rinovirus humano, genogrupo A	negativo	negativo
Virus de la influenza, infeccioso, A/PR/8/34	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
Rotavirus	negativo	negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	negativo	negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	negativo	negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	negativo	negativo

<i>Shigella flexneri</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	negativo	negativo
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	negativo	negativo
Virus de la varicela-zóster (tipo B)	negativo	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negativo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negativo	negativo

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. En consecuencia, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones de las vías respiratorias, o la existencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados del ensayo se examinaron primero en un cribado de interferencia. Se identificaron diversas sustancias que podrían estar presentes, bien como residuos de la extracción, debido a su uso generalizado en las infecciones respiratorias (diversos medicamentos de farmacia o de prescripción), bien por su presencia generalizada en las correspondientes muestras de control (p. ej., mucinas de la superficie de las mucosas o sangre), y se comprobaron inicialmente en concentraciones elevadas (tres veces la dosis diaria o simulación del "peor caso"). Si se encontraba una posible interferencia en este cribado de interferencia para una sustancia examinada, se establecía una relación dosis-efecto entre la concentración de la sustancia en cuestión y la interferencia.

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la Tabla 10.

Tabla 10: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Ciprofloxacina 500 mg (ciprofloxacino)	25 mg/ml
Ampicilina	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (dipropionato de beclometasona)	10 % [v/v]
Sangre humana	2 % [v/v]
Eritromicina	10 % [v/v]
Flutide Nasal (propionato de fluticasona)	25 mg/ml
Robitussin (guaifenesina/dextrometorfano)	10 % [v/v]
Aerosol Chloraseptic® para el dolor de garganta (fenol)	10 % [v/v]
Mucinas	60 µg/ml
Cloruro de sodio	10 % [v/v]
Nasivin 0,05 % (oximetazolina)	10 % [v/v]
Tobramicina	4 µg/ml
Fosfato de oseltamivir	25 mg/ml

13.3 Sensibilidad analítica

Se examinó la reactividad del ensayo RIDA®GENE Coronavirus multiplex en tiempo real RT-PCR con varios subtipos del coronavirus (ver la Tabla 11). Los subtipos de coronavirus del panel de muestras se detectaron con el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Coronavirus. La reactividad del subtipo HKU1 se analizó por comparación de secuencias.

Tabla 11: Pruebas de reactividad analítica

Cepa - Subtipo	Concentración	Resultado	
		Coronavirus	MERS-CoV
Coronavirus - HKU1	*	positivo	negativo
Coronavirus - OC43	1,5 x 10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus - NL63	1,2 x 10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus - 229E	1,2 x 10 ⁰ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus - MERS	1,0 x 10 ⁻⁵ U/ml	negativo	positivo










*La reactividad analítica al coronavirus HKU1 se detectó con un análisis BLAST.

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2017-09-20	Versión anterior
2021-08-13	Revisión general: 1. Uso previsto 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos necesarios no suministrados 7. Advertencias y precauciones para los usuarios 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento
2022-04-19	6. Reactivos necesarios no suministrados (RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004))

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cumplir con el manual de instrucciones
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix	Reaction Mix
PP-Mix	Mezcla de cebador/muestra
Enzyme-Mix	Enzyme Mix
Internal Control RNA	Control de extracción/inhibición
PCR Water	Control negativo
Positive Control	Control positivo

16. Bibliografía

1. World Health Organization Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) multi-country outbreak - Update 6 http://www.who.int/csr/don/2003_03_21/en/ accessed 28.07.2015
2. To K.W. et al. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* 2013; 5 (S2):S103-S108.
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV) – Saudi Arabia <http://www.who.int/csr/don/29-april-2015-mers-saudi-arabia/en/> accessed 30.07.2015
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: severe respiratory illness associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)–worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62:480–483
5. Adney DR et al. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1999–2005
6. US Centers for Disease Control and Prevention. MERS clinical features [cited 2015 May 30]. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/clinical-features.html> accessed 30.07.2015
7. Woo PC et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
8. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 368-373.