



Instrucciones de uso

Imegen[®] SARS-CoV-2

IMG-356

REF



Fabricado por:
Instituto de Medicina Genómica SL
Agustín Escardino 9,
Parc Científic de la Universitat de València
46980 Paterna (Valencia, España)
+34 963 212 340 - info@imegen.es

 **imegen**

A part of healthincode

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación.

Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso en diagnóstico *in vitro*. Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales o en la fabricación de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso indebido de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **Imegen® SARS-CoV-2** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: +34 963 212 340

e-Mail : tech.support@imegen.es

Imegen® es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España que forma parte del grupo Health in Code

Modificaciones de las Instrucciones de Uso (IFU)	
Versión 08	Modificación del programa de PCR (Tabla 3. Pág.14).
Versión 09	Condiciones de PCR para el CFX96 Real-time PCR System (Pág.15)
Versión 10	Programa de amplificación para el 7500 FAST Real-time PCR Cycller (Pág.15)
Versión 11	Ajuste umbral para el CFX96 Real-time PCR System (Validación clínica Instituto de Salud Carlos III, ISCiii) (Pág. 16)
Versión 12	Modificación del programa de PCR (Pág. 14-15)
Versión 13	Modificación del <i>threshold</i> de análisis (Pág. 16). Aplica a partir del lote 35620C012.

Tabla de contenido

1	Información general.....	5
2	Uso previsto.....	6
3	Características técnicas.....	7
4	Preparación de la muestra.....	10
5	Advertencias y precauciones.....	11
6	Contenido y condiciones de almacenamiento del kit.....	12
7	Equipos y materiales necesarios que no se suministran.....	13
8	Protocolo de ensayo.....	14
8.1	Preparación de las reacciones de amplificación.....	14
8.2	Configuración del programa de PCR a tiempo real.....	15
9	Análisis de Resultados.....	17
10	Troubleshooting.....	21
11	Limitaciones.....	22
11.1	Equipos.....	22
11.2	Reactivos.....	22
11.3	Estabilidad del producto.....	22

1 Información general

El SARS-CoV-2 es un nuevo betacoronavirus desconocido hasta la fecha en humanos y detectado durante un brote de enfermedades respiratorias, incluida la neumonía atípica, que comenzó a mediados de diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan en China.

El nuevo coronavirus emergente es similar a algunos de los betacoronavirus detectados en murciélagos, pero es distinto del SARS-CoV y el MERS-CoV.

El genoma del nuevo CoV emergente consiste en un solo ARN de cadena positiva que tiene aproximadamente 30k de longitud. La organización general del genoma del CoV emergente es similar a la de otros coronavirus. Su genoma ha sido recientemente secuenciado y codifica los marcos de lectura abiertos (ORF) comunes a todos los betacoronavirus:

- Gen ORF1ab que codifica la mayoría de proteínas enzimáticas
- Gen de la glucoproteína de la superficie de la espiga (S)
- Gen que codifica la proteína de la envoltura pequeña (E)
- Gen que codifica la proteína de la matriz (M)
- Gen de la proteína nucleocápside (N)
- Gen que codifica varias proteínas no estructurales.

Entre las principales prioridades para asegurar la salud pública está la elección de la tecnología *gold standard* para su diagnóstico. La detección basada en RT-PCR en tiempo real ha sido previamente demostrada en laboratorios de salud pública durante emergencias sanitarias.

Imegen SARS-CoV-2 está aprobado por el Instituto de Salud Carlos III para la detección del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 en muestras respiratorias

Referencias

- Shu, Y., McCauley, J. (2017) GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality EuroSurveillance, 22(13) doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494 PMID: PMC5388101 Web: www.gisaid.org
- Corman VM, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveillance 2020; 25: 2000045. Web: www.eurosurveillance.org
- Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Web: www.mscbs.gob.es

2 Uso previsto

De acuerdo con la guía técnica elaborada por la Organización Mundial de la Salud para la detección de SARS-CoV-2, el kit **Imegen SARS-CoV-2** permite detectar 3 dianas específicas en genes comunes a todos los betacoronavirus:

- **Gen ORF1ab** que codifica la mayoría de las proteínas enzimáticas
- **Gen S** que codifica la glucoproteína de la superficie de la espiga
- **Gen N** que codifica la proteína nucleocápside (N)

Asimismo, el kit incluye como control positivo endógeno un sistema de detección de la ribozima **RNAse P** humana.

- Este ensayo permite llevar a cabo la retrotranscripción (RT) del ARN vírico y detección mediante PCR a tiempo real (qPCR) de los genes diana, mediante una RT-qPCR en un paso único, utilizando una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes multiplexadas (FAM y VIC).
- Los resultados obtenidos en este ensayo permiten confirmar el diagnóstico del paciente. Este ensayo no es óptimo para el estudio de betacoronavirus SARS y MERS.

El kit **Imegen SARS-CoV-2** puede emplearse para uso en diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la virología y la biología molecular

3 Características técnicas

El kit **Imegen SARS-CoV-2** permite la detección de SARS-CoV-2 en muestras de ARN previamente purificadas.

- **Tipo de muestra:** ARN extraído de hisopos nasofaríngeos, lavados broncoalveolares, esputos, así como cualquier otra muestra respiratoria.
 - **Cantidad de muestra:** 12 µL ARN
 - **Inclusividad:** 100% frente a los genomas descritos GISAID (29.04.2020)
 - **Especificidad:** 100% frente a SARS y MERS
 - **Tiempo de ensayo (RT-qPCR):** 1h 20 min
- 4 dianas específicas detectadas en 2 mixes de amplificación:

Fluoróforos	Mix 1	Mix 2
FAM	ORF1ab	N
VIC (HEX)	Rnase P (Human)	S

Validación *In silico*

Los sistemas de amplificación específicos han sido diseñados sobre los 3.123 genomas de SARS-CoV-2 depositados en la base de datos de secuencias virales comisariada por la Iniciativa mundial para compartir todos los datos sobre la influenza (GISAID).

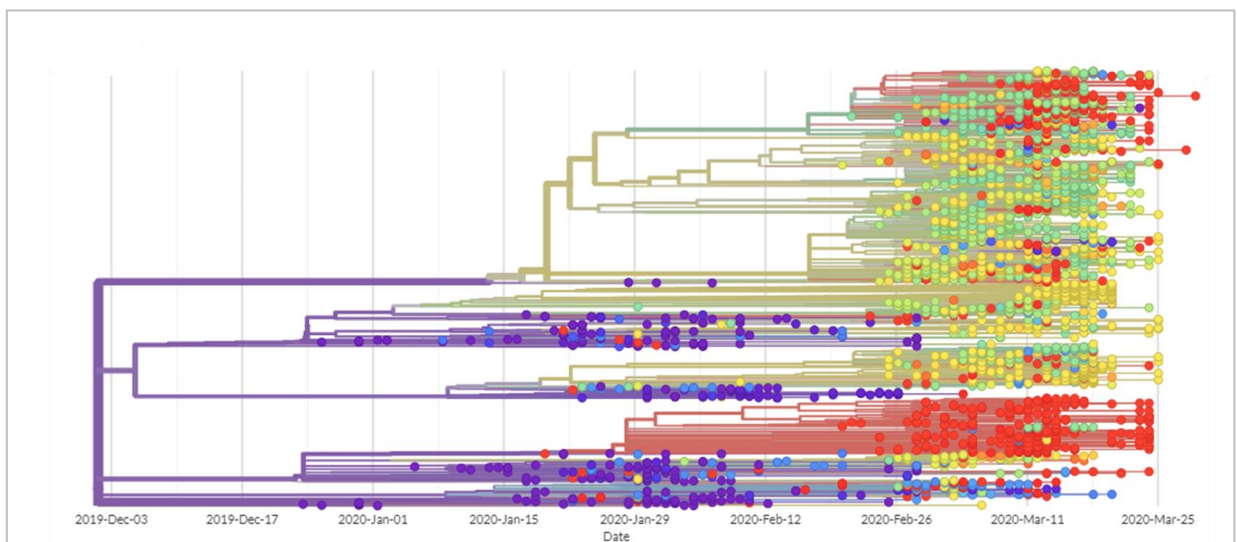


Figura 1. Gráfico de los 3123 genomas analizados entre Feb 2020 y Abril 2020.

Inclusividad

Los diseños de los genes S, ORF1ab y N se realizaron empleando herramientas bioinformáticas a partir de la información genómica existente en la base de datos GISAID, donde se muestran todas las variantes genéticas clasificadas por el país donde se detectaron, región y huésped. El diseño de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis permite detectar todas las variantes genómicas identificadas hasta el 29.04.2020.

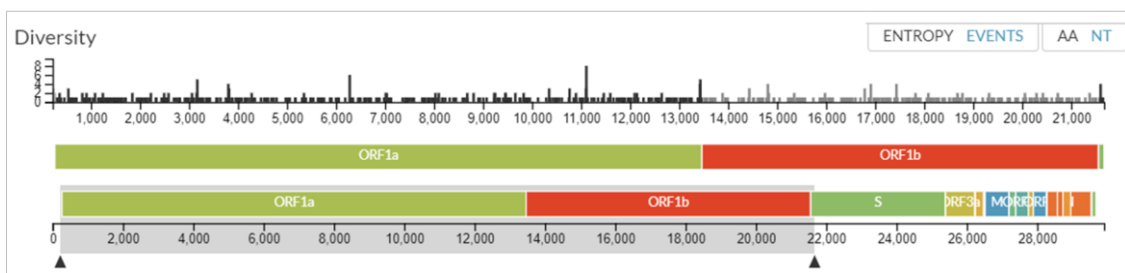


Figura 2. Representación de las variantes genéticas en el gen ORF1ab (nucleótidos 266-21555). El sistema **Imegen SARS-CoV-2** permite detectar el gen ORF1ab en todas las cepas del betacoronavirus identificadas (SARS-CoV-2, 3.123 genomas). Posición de las variantes (EVENTS) en nucleótidos (NT) relativa al genoma de referencia de SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, GenBank MN908947).

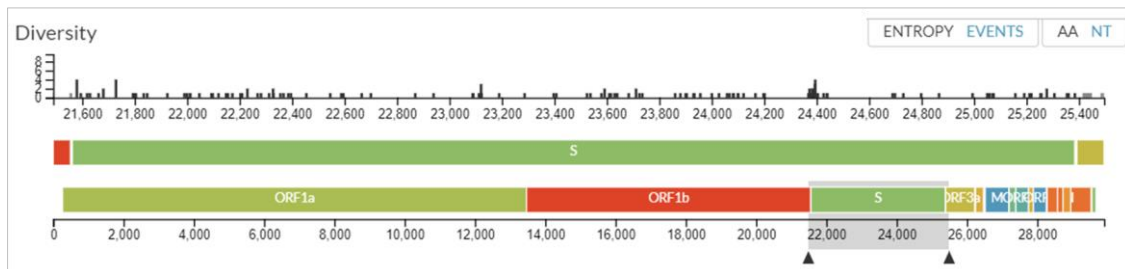


Figura 3. Representación de las variantes genéticas en el gen S (nucleótidos 21563-25384). El sistema **Imegen SARS-CoV-2** permite detectar el gen S en todas las cepas del betacoronavirus identificadas (SARS-CoV-2, 3.123 genomas).

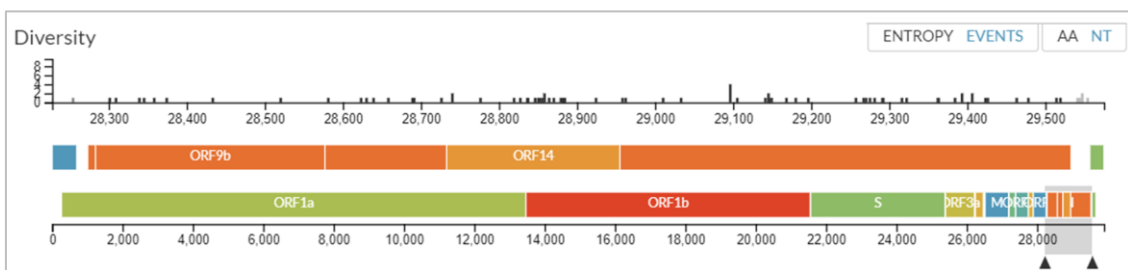


Figura 4. Representación de las variantes genéticas en el gen N (nucleótidos 28274-29533). El sistema **Imegen SARS-CoV-2** permite detectar el gen N en todas las cepas del betacoronavirus identificadas (SARS-CoV-2, 3.123 genomas).

genomas).

El sistema de la ribozima RNase P, utilizada como control endógeno humano para confirmar la integridad de la muestra de ARN, se ha extraído del método publicado por *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

Especificidad

Las secuencias del genoma sugieren la presencia de un virus estrechamente relacionado con los miembros de una especie viral denominada CoV relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), una especie definida por el agente del brote 2002/03 de SARS en humanos. Por ello, se ha evaluado la especificidad de cada sistema para confirmar su especificidad analítica mediante BLAST en las bases de datos públicas NCBI y GISAID.

Los sistemas de detección de Imegen-SARS-CoV-2 muestran similitud parcial con betacoronavirus de murciélago, pero no con SARS o MERS humanos, lo cual confirma la especificidad de los sistemas por el nuevo betacoronavirus SARS-CoV-2.

Validación analítica

El kit ha sido validado a partir de muestras de hisopos nasofaríngeos, fluidos de lavados broncoalveolares y esputos de pacientes diagnosticados mediante un kit de diagnóstico comercial. Además, se han incluido en la validación un control del genoma completo de SARS-CoV-2 (Twist), así como vectores sintéticos certificados (GenScript) que contienen las dianas de interés. Este vector está incluido en el kit y se recomienda su uso como control positivo para verificar el funcionamiento correcto de la PCR. La validación completa proporciona un método de diagnóstico robusto y específico.

Imegen es una compañía biotecnológica certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios** por AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario) para el diseño, desarrollo, fabricación y comercialización de kits de análisis genético para diagnóstico in vitro, así como para el desarrollo de software para análisis bioinformático de datos genéticos.

4 Preparación de la muestra

A continuación, destacamos algunos de los requisitos más importantes para la toma, preparación y envío de la muestra. Para más información, revise el procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 del Ministerio de Sanidad y el Instituto de Saludo Carlos III de España.

1. **Tipo de muestra:** Esputo, lavado broncoalveolar del tracto respiratorio inferior o hisopo nasofaríngeo y orofaríngeo tomados de modo simultáneo del tracto respiratorio superior.
2. **Toma de muestra:** El tomador de la muestra debe utilizar un respirador N96 o equivalente y guantes. Se recomienda registrar el tipo de muestra y hora de la toma.
3. **Preparación de la muestra para su transporte:** Se utilizará siempre un triple envase revisando la estanqueidad de cada uno de ellos para evitar derrames durante el transporte de las muestras. Realice el transporte a 4°C.
4. **Almacenamiento de la muestra de forma previa al transporte:** Si no es posible realizar el envío de la muestra al laboratorio de análisis antes de 72h desde su toma, le recomendamos que almacene la muestra a – 80°C y la transporte en hielo seco cuando sea posible.
5. **Extracción del ARN viral:** Utilice un método de extracción de ARN viral adecuado, bien sea un método manual o automatizado. Se recomienda limpiar a fondo las superficies y equipos de trabajo para eliminar nucleasas (RNase) de forma previa a iniciar el protocolo de extracción. Dependiendo del método de extracción, el rendimiento y pureza del ARN extraído puede diferir. Como método de extracción automatizado, se han utilizado con éxito el *MagNA Pure Compact System* con el correspondiente *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit* (Roche)

5 Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda, por tanto, que cada laboratorio realice una verificación del cumplimiento de las especificaciones técnicas del fabricante cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.

6 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

El kit contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo 96 reacciones de RT-qPCR con cada Master Mix específico:

- **SARS-CoV-2 Master Mix I:** Contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para llevar a cabo la amplificación del sistema específico ORF1ab (FAM) y del control endógeno humano, RNase P (VIC/HEX).
- **SARS-CoV-2 Master Mix II:** Contiene los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para llevar a cabo la amplificación del sistema específico N (FAM) y el gen S (VIC/HEX).
- **RT-PCR Master Mix:** Master Mix de PCR con los nucleótidos, MgCl₂, enzima de PCR a tiempo real y buffer necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- **RTasa:** Enzima retrotranscriptasa para llevar a cabo la retrotranscripción de ARN a ADN complementario (cDNA).
- **Control positivo:** Control positivo con las secuencias diana para la amplificación del gen S, gen N, gen ORF1ab y gen RNase P.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
SARS-CoV-2 Master Mix I	Tapa roja	915 µl	-20°C
SARS-CoV-2 Master Mix II	Tapa azul	915 µl	-20°C
RT-PCR Master Mix	Tapa blanca	770 µl	-20°C
RTasa	Tapa amarilla	96 µl	-20°C
Control Positivo	Tapa verde	60 µl	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen SARS-CoV-2

7 Equipos y materiales necesarios que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real que detecte los fluoróforos FAM y VIC
- Micropipetas de 10 μL , 20 μL y 200 μL
- Vortex
- Centrifuga

Reactivos:

- Kit de extracción de ARN viral/total
- Agua libre de nucleasas

Materiales:

- Placas ópticas de 96 pocillos o tubos ópticos de 0.2 ml
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Puntas de pipetas con filtro (10 μL , 20 μL y 200 μL)
- Tubos estériles de 1.5 ml
- Guantes de látex
- Material de limpieza de superficies como RNase away
- Material necesario para la extracción de ácidos nucleicos

8 Protocolo de ensayo

8.1 Preparación de las reacciones de amplificación

1. Descongelar a temperatura ambiente todos los reactivos del kit y el ARN de las muestras y mantener en hielo una vez descongeladas.
2. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
3. Preparar los dos mixes de PCR como se especifica a continuación empleando 2 tubos de 1.5 ml

Reactivos	Cantidad por muestra o control	
	Mix I	Mix II
SARS-CoV-2 Master Mix I	9.5 μ L	-
SARS-CoV-2 Master Mix II	-	9.5 μ L
RTase	0.5 μ L	0.5 μ L
RT-PCR Master Mix	4 μ L	4 μ L

NOTA: Para estimar la cantidad de reactivos necesaria en función del número de muestras y controles que se analicen de forma simultánea por run, recomendamos realizar los cálculos considerando una reacción más o bien incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

4. Mezclar los reactivos pipeteando varias veces, dar un spin a los mixes de PCR y dispensar 14 μ L en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.
5. Una vez dispensados los mixes de PCR añadir a los pocillos correspondientes:
 - 6 μ L de las muestras de ARN
 - 6 μ L del control positivo
 - 6 μ L de agua libre de nucleasas (control negativo de PCR)

NOTA: Se recomienda añadir un control negativo de PCR por master mix, para descartar la contaminación de los reactivos y también un control positivo por master mix, para asegurar el correcto funcionamiento de la reacción de PCR.

6. Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

8.2 Configuración del programa de PCR a tiempo real

- Fluoróforos de las sondas de hidrólisis:

Sonda	Emisor	Genotipado	Quencher
N	FAM	Gen N	BHQ1 (None)
ORFlab	FAM	Gen ORFlab	BHQ1 (None)
S	VIC (HEX)	Gen S	TAMRA
RNase P	VIC (HEX)	Gen RNase P (Humano)	TAMRA

Tabla 2. Información de las sondas de hidrólisis

- Programa RT-PCR:

StepOne Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems):

- Tipo de experimento: Quantitation-Comparative Ct
- Velocidad de rampa: Standard
- Referencia basal ROX™: ROX

CFX96 y CFX96 Touch Real-time PCR System (BioRad)

- Cq Determination mode: Single Threshold
- Data Analysis: Quantification

LightCycler 480 Real-time PCR System (Roche)

- Experimento: Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe
- Análisis: Abs Quant / Fit Points

Configurar el programa de PCR según el programa óptimo ⁽¹⁾ que se indica a continuación:

Etapa	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripción	1	48°C	20 minutos
Activación enzimática	1	95°C	10 minutos
PCR Desnaturalización, anillamiento y extensión	40	95°C	5 segundos
		59°C	15 segundos
		68°C	15 segundos ⁽²⁾

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el StepOne Plus, CFX96, CFX96 Touch y LightCycler 480.

(1) En caso de disponer de otros modelos de termocicladores, consultar capítulo 11 Limitaciones.

(2) Adquisición de la fluorescencia

7500 FAST Real-time PCR System (Applied Biosystems):

- Tipo de experimento: Quantitation-Comparative Ct
- Velocidad de rampa: Standard
- Referencia basal ROX™: ROX

Configurar el programa de PCR según el programa óptimo ⁽¹⁾ que se indica a continuación:

Etapa	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripción	1	48°C	20 minutos
Activación enzimática	1	95°C	10 minutos
PCR Desnaturalización, anillamiento y extensión	40	95°C	5 segundos
		59°C	15 segundos
		68°C	30 segundos ⁽²⁾

Tabla 4. Programa de PCR óptimo para el equipo 7500 FAST Real-time PCR system.

[1] En caso de disponer de otros modelos de termocicladores, consultar capítulo 11 Limitaciones.

[2] Adquisición de la fluorescencia

9 Análisis de Resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

- Comprobar que en los controles negativos de PCR no haya amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC (HEX). En caso de detectarse amplificación en un control negativo, se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Comprobar que en los controles positivos haya amplificación de todas las dianas en FAM y VIC (HEX).
- Comprobar que en todas las muestras analizadas existe amplificación del gen endógeno humano, RNase P. La ausencia de amplificación puede indicar una baja calidad del ARN en la muestra e invalidará la obtención de conclusiones.
- Para analizar las muestras hay que emplear el software específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado. Se recomienda ajustar:
 - *Baseline*: Ciblos 3 – 15
 - *Threshold*: StepOne Plus & 7500 (Applied Biosystems): 0.05
 - CFX96 y CFX96 Touch (BioRad): 100
 - LightCycler 480 (Roche): Ajuste de *Noise band*

A continuación, se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit **Imegen SARS-CoV-2**.

1. Clasifique los resultados de cada ensayo de modo individual de acuerdo con los valores de Ct incluidos en la tabla.

Ensayo N, S, ORFlab	Ensayo RNaseP (IPC)	Resultados SARS-CoV-2
Ct < 37	Ct < 40	Positivo
$37 \leq Ct < 40$	Ct < 40	Inconcluyente
Ct = Indeterminado o Ct = 40	Ct < 37	Negativo
Ct = Indeterminado o Ct = 40	Ct \geq 37	Inválido. Purificar nuevo ARN de la muestra

Tabla 5. Clasificación de resultados en función de los valores de Ct

2. Interprete los resultados de cada muestra utilizando la siguiente tabla.

Resultados Imegen SARS-CoV-2	Interpretación de resultados
Dos o más dianas son positivas	Presencia de SARS-CoV-2
Sólo una diana positiva	Resultado inconcluyente
Los resultados de las tres dianas son negativos	Ausencia de SARS-CoV-2

Tabla 6. Interpretación de resultados en función de la amplificación de dianas

A continuación, incluimos algunos ejemplos de cómo se visualizan algunos resultados empleando el kit Imegen SARS-CoV-2:

CONTROL NEGATIVO

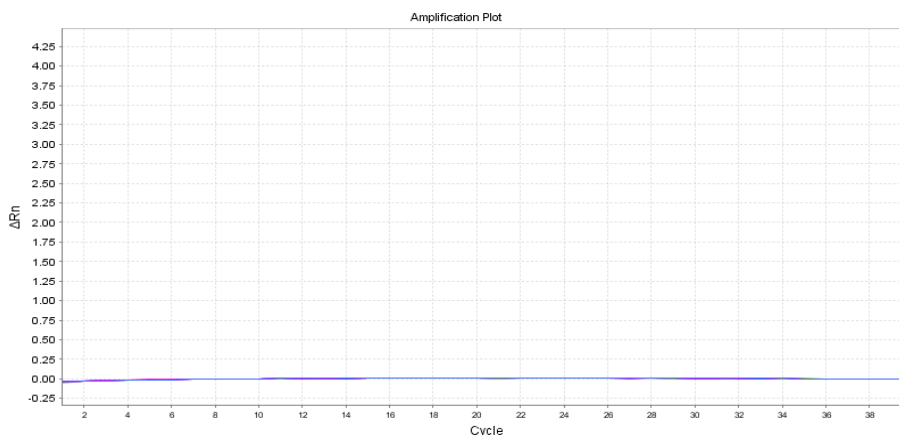


Figura 5. Resultado esperado en los controles negativos de PCR. No se observa señal de amplificación en ningún canal de fluorescencia.

CONTROLES POSITIVOS

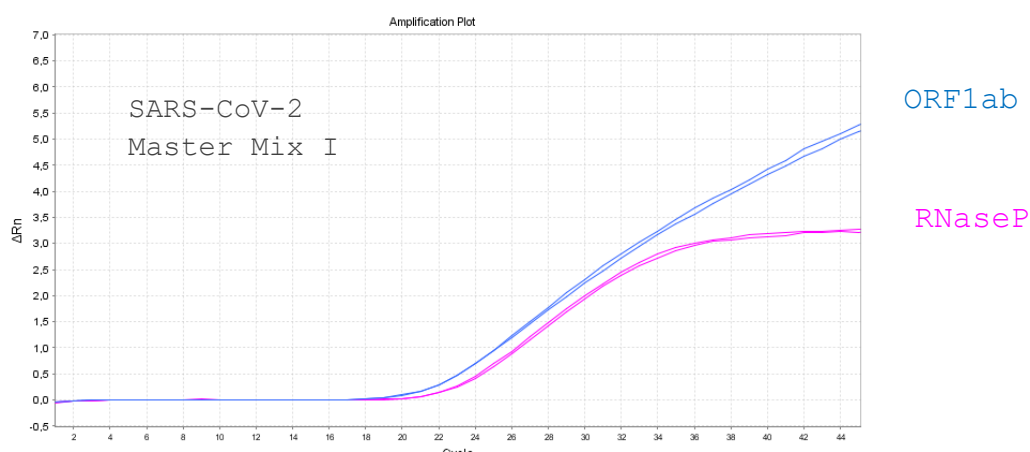


Figura 1: Resultado obtenido a partir del control positivo con el premáster SARS-CoV-2 Mix 1. La amplificación del gen específico ORF1ab (FAM) se muestra en azul, y la amplificación del control positivo interno RNaseP (VIC) se muestra en rosa.

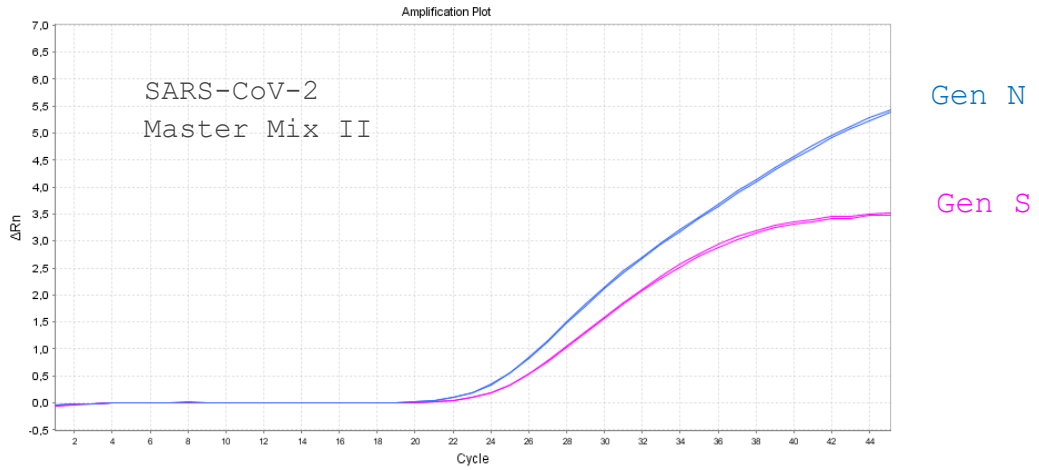


Figura 7. Resultado obtenido a partir del control positivo con el premáster SARS-CoV-2 Mix 2. La amplificación del gen específico N (FAM) se muestra en azul, y el gen específico S (VIC) se muestra en rosa.

Ejemplo muestra Positiva COVID-19:

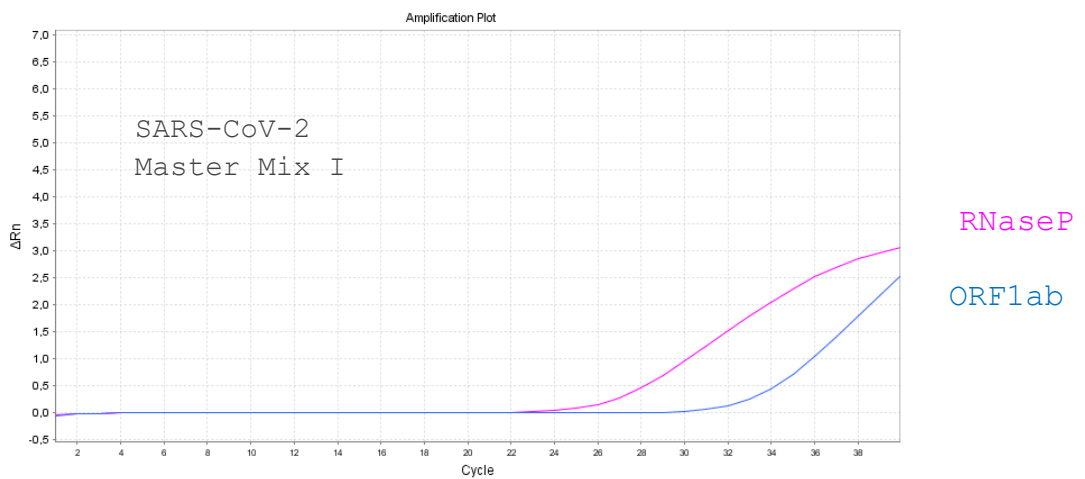


Figura 8. Resultado obtenido a partir del control positivo con el premáster SARS-CoV-2 Mix 1. La amplificación del gen específico ORF1ab (FAM) se muestra en azul, y la amplificación del control positivo interno RNaseP (VIC) se muestra en rosa.

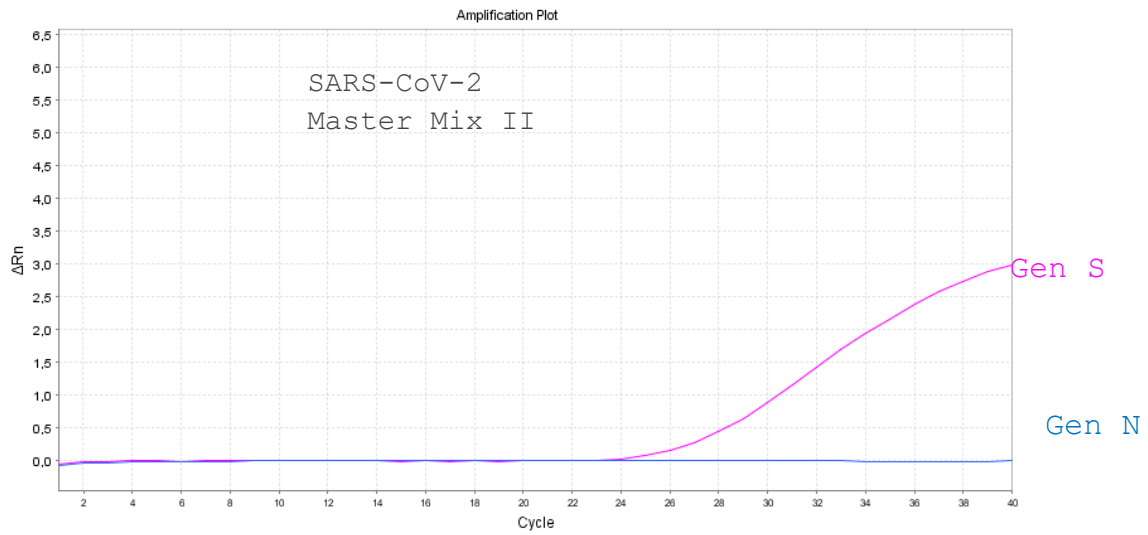


Figura 9. Resultado obtenido a partir del control positivo con el premáster SARS-CoV-2 Mix 2. Se detecta amplificación del gen específico S (VIC) en rosa. No se detecta amplificación del del gen específico N (FAM) en azul.

Conclusión: Presencia de COVID-19 por la detección de 2 genes específicos de COVID-19 con Ct < 37.



Figura 10. Imagen del kit Imegen SARS-CoV-2.

10 Troubleshooting

La siguiente tabla representa los resultados que podrían obtenerse usando los controles positivos, negativos y las muestras de ARN viral. En caso de que se obtenga un resultado inesperado, la interpretación del resultado y la razón más probable de tal resultado se recogen en la siguiente tabla:

Control	RNase P	Dianas S, N, ORFlab	Resultado / Interpretación
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo en la configuración de la PCR ¹
Muestra ARN	+	+	Resultado esperado
	+	-	
	-	-	Fallo de amplificación de las muestras de ARN ²
Control Negativo (NTC)	-	-	Resultado esperado
	+	+	Contaminación con muestras positivas o con el control positivo ³

Tabla 7. Interpretación de posibles resultados obtenidos utilizando Imegen-SARS-CoV-2

- ¹ Fallo en la configuración de la PCR: Un error en la amplificación puede deberse a un problema técnico durante la configuración de la PCR.
Recomendación: verifique el programa de amplificación y la configuración de la detección de fluorescencia son correctos.
- ² Fallo de amplificación de la muestra de ARN viral: Un fallo de amplificación del control positivo interno (IPC) en la muestra de ARN podría sugerir que la cantidad o la calidad de la muestra de ARN está comprometida.
Recomendación: realice una segunda extracción y análisis, antes de proceder a la interpretación de los resultados.
- ³ Contaminación con muestras positivas o con el control positivo: La contaminación de la PCR podría ser causada por un manejo inadecuado de la muestra, el uso de reactivos contaminados o por una contaminación ambiental, tanto con muestras positivas, como por el control positivo.

Recomendación: limpieza completa del laboratorio donde se preparan las PCR, incluido el equipo y el material utilizado. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR y prepare finalmente las reacciones de PCR que contienen los controles positivos para evitar cualquier contaminación cruzada.

11 Limitaciones

11.1 Equipos

Imegen SARS-CoV-2 ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- 7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- StepOne Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)
- CFX96 Touch Real-Time PCR System (BioRad)
- CFX96 Real-Time PCR System (BioRad) Validación ISCiii
- Light Cycler 480 PCR System (Roche)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, puede ser necesario ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

11.2 Reactivos

El fabricante no se hace responsable del mal funcionamiento del ensayo si los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Imegen.

11.3 Estabilidad del producto

El Kit Imegen SARS-CoV-2 es estable durante su vida útil, siempre que se aseguren las condiciones de almacenamiento especificadas en estas instrucciones.