

# OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test

## English Version

Used for real-time PCR identification of SARS-CoV-2 RNA extracted from upper and lower respiratory specimens (such as nasal, nasopharyngeal, oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage, and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate).



## Versión Española

Para utilización en la identificación por PCR en tiempo real del SARS-CoV-2 RNA extraído de muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores (como hisopos nasales, nasofaríngeos, orofaríngeos, esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal).



**IVD** **CE**

For *in vitro* diagnostic use only / Solo para uso diagnóstico *in vitro*

**REF** 99-57003 & 99-57004



Version CE-IVD #2  
06-57003-03

Approval Date: 15-DEC-2020

 **OPTIMedical**

# Table of Contents

(ENGLISH)

Intended Use.....	EN-1
Product Description.....	EN-1
Materials and Storage.....	EN-2
Materials Required but Not Provided.....	EN-3
Warnings and Precautions.....	EN-4
Specimen Collection.....	EN-5
Transporting Specimens.....	EN-5
Storing Specimens.....	EN-5
Reconstitution of Dried Components.....	EN-5
Extraction.....	EN-5
Quality Controls.....	EN-6
Test Procedure.....	EN-6
Limitations.....	EN-8
Assay Performance.....	EN-9



MENU



PRINT

English version

## OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test

### Intended Use

The OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test is a real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction test for the qualitative detection of nucleic acid from the SARS-CoV-2 in upper and lower respiratory specimens (such as nasal, nasopharyngeal, oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage, and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate) from patients suspected of COVID-19 by their health care provider.

Results are for the identification of SARS-CoV-2 RNA. The SARS-CoV-2 RNA is generally detectable in upper and lower respiratory samples during the acute phase of infection. Positive results are indicative of active infection; clinical correlation with patient history and other diagnostic information is necessary to determine patient infection status. Positive results do not rule out bacterial infection or co-infection with other viruses. Laboratories within the United States and its territories are required to report all positive results to the appropriate public health authorities.

Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for patient management decisions. Negative results must be combined with clinical observations, patient history, and epidemiological information.

The OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test is intended to be used by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time nucleic acid amplification and *in vitro* diagnostic procedures.

### Product Description





The OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test is a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) test that uses the N1 and N2 primer and probe sequences which are described by the CDC design<sup>1</sup>. The OPTI SARS-CoV-2 Mix (SARS-CoV-2 Mix) includes primers and probes for the detection of SARS-CoV-2 RNA when amplified with the OPTI RNA Master Mix (RNA MMx). SARS-CoV-2 RNA targets (N1 and N2) are both detected in the FAM channel. The internal control for the test is RNase P (RP), which is detected in the HEX channel. The internal control for the test is based on the detection of a conserved nucleic acid sequence present in human samples. This host target is referred to as the internal sample control (ISC). Detection of endogenous nucleic acid in the test sample controls for sample addition, extraction, and amplification. Primers and probe for detection of the internal sample control are included in the SARS-CoV-2 Mix.

During the real-time reverse transcription polymerase chain reaction, viral RNA is reverse transcribed into cDNA and subsequently amplified in a real-time PCR cycling protocol. During the process, the probe anneals to a specific target sequence located between the forward and reverse primers. During the extension phase of the PCR cycle, the 5' nuclease activity of Taq polymerase degrades the probe, causing the reporter dye to separate from the quencher dye, generating a fluorescent signal. With each cycle, additional reporter dye molecules are cleaved from their respective probes, increasing the fluorescence intensity exponentially. Fluorescence intensity is monitored at each PCR cycle by one of the PCR thermal cycler instruments listed in Section "Materials Required but Not Provided".

In addition, the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test utilizes the OPTI Positive Control (PC) and OPTI PCR Grade Water (Negative Control). The OPTI Positive Control (PC) contains SARS-CoV-2 and ISC synthetic material and works as a positive control for the reaction. OPTI PCR Grade Water is used as the RT-PCR negative control, as well as to reconstitute the dried SARS-CoV-2 Mix and the PC.

- 1 "Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Real-Time rRT-PCR Panel Primers and Probes." Centers for Disease Control and Prevention, 6 Mar. 2020, [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html)

## Materials and Storage

Identification/ General Information	Cap color	Quantity		Storage		Freeze/Thaw cycles
		100 tests 99-57003	500 tests 99-57004	At receipt	After reconstitution	
<b>OPTI SARS-CoV-2 Mix (SARS-CoV-2 Mix), dried</b>   61-56616-00  Contains N1, N2 and ISC primers and probes. Reconstitute to 1 mL in PCR Grade Water. Store the SARS-CoV-2 Mix in the dark. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form.	Red	1 x 1.0 mL	5 x 1.0 mL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<b>OPTI RNA Master Mix (RNA MMx)</b>   61-56618-00  Concentrated master mix that includes reverse transcriptase and hot-start polymerase. The RNA MMx is more viscous than most master mixes— see the Test Procedure section for handling recommendations. A reference dye (ROX) has been added for normalizing volume inaccuracies. Protect the RNA MMx from light.	Black	1 x 1.0 mL	5 x 1.0 mL	-25 to -15°C (Long-term)	N/A	≤6
<b>OPTI Positive Control, dried (PC)</b>   44-56617-00  The PC contains the targets for SARS-CoV-2 (N1 target region) and the internal control (RNase P). Reconstitute to 200 µL in PCR Grade Water. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form.	Blue	1 x 200 µL	1 x 200 µL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<b>OPTI PCR Grade Water</b>   61-56619-00  PCR Grade Water has been qualified for reverse transcription-PCR (RT-PCR) use. It is used for the reconstitution of the SARS-CoV-2 Mix and PC. It is also used as the PCR negative control for each test run. Do not transfer PCR Grade Water vials between PCR work areas. Separate vials of water are needed for each area to avoid contamination risk.	Clear	2 x 1.0 mL	7 x 1.0 mL	-25 to 8°C		N/A

**Note:** See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels.

## Materials Required but Not Provided

<b>Real-Time PCR Instrument and consumables</b>	<b>Source and part number</b>
<b>Thermo Scientific</b>	
Applied Biosystems® 7500 FAST Applied Biosystems® QuantStudio 5 96 well PCR plate Optical plate cover	7500 instrument (4351106) and 7500 software v2.0.6 QS5 instrument (A28138) and QuantStudio Design and Analysis Desktop software (v1.5.1) plate: 4346906 cover: 4311971
<b>Agilent</b>	
Agilent Mx3005P™ 96 well PCR plate Optical cap strips	3005P instrument (401449) and MxPro qPCR software v4.10 plate: 401334 caps: 401425
<b>IDEXX Laboratories</b> (for use with upper respiratory specimens)	
Bio Molecular Systems Mic qPCR Tubes and caps	Instrument (98-0012758-00) and micPCR software v2.8.10 tubes + caps: 98-0012759-01
<b>Bio-Rad Laboratories</b>	
Bio-Rad CFX96 Touch plate + cover	Instrument (1855196) and Bio-Rad CFX Manager software v3.1 plate: HSP9601 cover: MSB1001
<b>Roche</b>	
Roche LightCycler® 480 96 well PCR plate + cover	Instrument (05015278001) and LightCycler 480 SW v1.5.1 plate + cover: 04 729 692 081
<b>Extraction Equipment and Consumables</b>	<b>Source and part number</b>
RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit NucleoMag VET Magnetic Extraction Kit OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit PurePrep Pathogens Extraction Kit	IDEXX 99-56102 (384 samples) / 99-56106 (96 samples) Macherey Nagel 744200.4 OPTI Medical Systems 99-58015 MolGen BV OE00290096 (n=96) and OE00290960 (n=960)
<b>Thermo Scientific</b>	
Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex 96 deep well plate 96 well elution plate 96 tip comb for deep well magnet	Flex instrument (5400630) and software v1.0.1.0 Deep well plate: 95040460 Elution plate: 97002540 Tip Comb: 97002534
Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime 96 deep well plate 12-tip elution strip for deep well plate 12-tip comb for deep well plate	Duo instrument (5400110) and software v1.02.27.RT18 Deep well plate: 95040460 Elution strip: 97003520 Tip comb: 97003500
Manual Magnetic Extraction (OPTI) Magnetic separator for 96 well plates Plate shaker/heater Multichannel pipette	Manual Extraction (OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit) MLS MLS MLS
Extraction control containing human specimen (HSC) material	See Quality Controls section

Equipment and Lab Consumables	Source and part number
Micro-centrifuge for 2 mL microtubes capable of 1500–3000 x g	MLS
Vortex mixer	MLS
1.5 mL microcentrifuge tubes (DNase/ RNase free)	MLS
Pipettes and multi-channel pipettes (5–1000 $\mu$ L); dedicated pipettes for preparation of PCR Mix	MLS
Nuclease-free, aerosol resistant pipette tips	MLS
Personal protective equipment consistent with current guidelines for handling infectious samples	MLS
Optional: Centrifuge with rotor and adapters for multi-well plates	MLS

MLS = Major Laboratory Supplier, such as vwr.com or fisherscientific.com

## Warnings and Precautions

### General

- The assay is for *in vitro* diagnostic (IVD) use under the FDA Emergency Use Authorization Only.
- For prescription use only.
- Handle all specimens as of infectious using safe laboratory procedures. Refer to Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with SARS-CoV-2: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples.
- Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled.
- Modifications to assay reagents, assay protocol, or instrumentation are not permitted, and are in violation of the product Emergency Use Authorization.
- Dispose of waste in compliance with the local, state, and federal regulations.
- Laboratories within the United States and its territories are required to report all positive results to the appropriate public health authorities.

### PCR

- Reagents must be stored and handled as specified in these instructions for use. Do not use reagents past expiration date.
- The entire procedure must be performed under nuclease-free conditions.
- Wear powder-free gloves when working with the reagents and nucleic acids.
- Always use pipette tips with aerosol barriers. Tips that are used must be sterile and free from DNases and RNases.
- Keep reagents and PCR Mix tubes capped or covered as much as possible.
- To avoid cross-contamination, use nuclease-free, aerosol-resistant pipette tips for all pipetting, and physically separate the workplaces for nucleic acid extraction/handling, PCR setup and PCR.

- Work surfaces, pipettes, and centrifuges should be cleaned and decontaminated with cleaning products such as 10% bleach, “DNAzap™” or “RNase AWAY®” to minimize risk of nucleic acid contamination. Residual bleach should be removed using 70% ethanol.
- The internal control for the test detects human nucleic acid; it is important to avoid environmental sources of human nucleic acid contamination.

## Specimen Collection

- The Sample collection device is not a part of the test kit. The OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test is compatible with FDA recommended swabs and transport media. Refer to Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
- Follow specimen collection manufacturer instructions for proper collection methods.
- Swab specimens should be collected using only swabs with a synthetic tip, such as nylon or Dacron® and an aluminum or plastic shaft. Calcium alginate swabs should not be used and cotton swabs with wooden shafts are not recommended. Place swabs immediately into sterile tubes containing 2–3 mL of viral transport media.

## Transporting Specimens

- Specimens must be packaged, shipped, and transported according to the current edition of the International Air Transport Association (IATA) Dangerous Goods Regulation. Follow shipping regulations for UN 3373 Biological Substance, Category B when sending potential 2019-nCoV specimens. Store specimens at 2–8°C and ship on ice packs.

## Storing Specimens

- Specimens can be stored at 2–8°C for up to 72 hours after collection.
- If a delay in extraction is expected, store specimens at –70°C or lower.

## Reconstitution of Dried Components

Reconstitute the SARS-CoV-2 Mix and Positive Control by pipetting PCR Grade Water to the volume indicated on the component label. Allow to sit at 18 to 26°C for at least 10 minutes; mix and microcentrifuge briefly prior to use. Once the SARS-CoV-2 Mix and the Positive Control are reconstituted, aliquot as appropriate and store the solutions frozen. When handling frozen components, thaw at 18 to 26°C for approximately 15 to 30 minutes, mix gently and then microcentrifuge briefly (~1,500 – 3,000 × g).

## Extraction

### Magnetic Bead Extraction kits

For automated use on Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex and Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime The OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit is also validated for use with a manual magnetic separator.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX, Part #99-56102 / 99-56106)

NucleoMag VET Magnetic Extraction Kit (Macherey Nagel, Part #744200.4)

OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit (OPTI Medical System, #99-58015)

Other extraction or lysis methods may also be used once validated by the laboratory. Store the purified RNA at <–15°C if testing is not performed immediately after RNA extraction.

## Quality Controls

Control(s) that are provided with the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test are listed below:

- Negative Control (OPTI PCR Grade Water): A “no template” (negative) control is needed to confirm the PCR plate is valid. PCR Grade water is used and should be included for each PCR run. The negative control should test negative for the SARS CoV-2 target and internal control. The no template control is not included during extraction.
- Positive Control (OPTI Positive Control): A positive template control is needed to confirm the PCR plate is valid. Synthetic nucleic acid for the N1 target region is used at 20 copies per  $\mu\text{L}$ . The positive control should be included on each PCR run and should test positive for both the SARS CoV-2 target and internal control channels. The positive control is not included during extraction.
- The internal control for the test is a human endogenous nucleic acid sequence (RNase P) and controls for sample addition, extraction and PCR. The internal control is expected to test positive for each sample tested.

Control(s) that are required but not provided with the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test are listed below:

- Extraction control: An extraction control containing human specimen control (HSC) material should be extracted and tested with each set of patient samples. The extraction control is used to demonstrate successful recovery of RNA during the extraction process and should test negative for the SARS CoV-2 target and positive for the RNase P internal control. Laboratories may use confirmed negative human specimen material (e.g. a negative respiratory specimen). This material should be prepared in enough volume to be used across multiple runs. Material should be tested prior to use as the extraction control to ensure it generates the expected results.

## Test Procedure

---

- 1 Preparation of the PCR Mix.
  - Mix the thawed RNA MMx by inversion or gentle vortex.
  - The RNA MMx is a viscous solution; always pipette it slowly.
  - To prepare the PCR Mix add 10  $\mu\text{L}$  SARS-CoV-2 Mix and 10  $\mu\text{L}$  RNA MMx for each reaction.
  - When preparing the PCR Mix, first pipette SARS-CoV-2 Mix into the tube and then add the RNA MMx. Pipette up and down a few times to rinse the MMx pipette tip.
  - Gently vortex the solution to ensure the components are mixed well.
  - Pipette the PCR Mix slowly into the PCR plate.

Load the PCR plate within 20 minutes or store at 2 to 8°C for up to 4 hrs. The PCR Mix can be stored at -25 to -15°C for up to 2 weeks. Protect from light.

---

- 2 Pipette 20  $\mu\text{L}$  of the PCR Mix into the required wells of the multiwell plate.
  - 3 Add 5  $\mu\text{L}$  of sample RNA to each well. The final reaction volume is 25  $\mu\text{L}$ .
  - 4 Include the Positive Control (5  $\mu\text{L}$ ), PCR negative control (5  $\mu\text{L}$  PCR Grade Water) and Extraction Control (5  $\mu\text{L}$ ) for each test run.
  - 5 Cover the plate and briefly spin the plate, if necessary, to settle contents and remove air bubbles.
-



---

6 Set up thermal cycler with Cycling Program below.

Settings for Reporter and Quencher

<u>Target</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
SARS-CoV-2	FAM™	BHQ® (none)
Internal Control (RNase P)	HEX™ (VIC)	BHQ (none)
Passive Reference	ROX™	N/A

Cycling Program (used for all instruments)

<u>Step</u>	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Cycles</u>
Reverse transcription (RT)	50°C	15 min.	1
Denaturation	95°C	1 min.	1
Amplification**	95°C	15 sec.	45
	60°C	30 sec.	

\*\*Ensure the instrument is set to record fluorescence following the 60°C amplification step.

---

7 Analyze data

All test controls should be examined prior to interpretation of patient results. If the controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

Using the PCR instrument software, assign a unique identifier for the SARS-CoV-2 and internal control targets on the plate. To obtain appropriate Ct values, analysis for both the SARS CoV-2 target and internal control target should be performed by manually setting the threshold. Each target threshold should be set separately. The threshold should be adjusted to the inflection point for the exponential phase of the curve and above background signal. This is best done while viewing all amplification curves, for each respective target for a given run, on a logarithmic scale. It is important to follow the same procedure run to run when setting the manual threshold.

Refer to specific instrument's user manual for guidance on how to analyze data.

Plate Validity Criteria

The following control results must be obtained for each PCR run in order for the run to be deemed valid. If the plate controls are not valid, the patient results cannot be interpreted, are not valid, and the plate must be repeated.

<u>Control</u>	<u>SARS-CoV-2 FAM Ct Value</u>	<u>SARS-CoV-2 FAM Result</u>	<u>Internal Control HEX Ct Value</u>	<u>Internal Control HEX Ct Result</u>
Positive Control	<40	Positive	<36	Positive
PCR Negative Control	No Signal	Negative	≥36	Negative
Extraction Control	No Signal	Negative	<36	Positive

Sample Validity: The validity for each sample is determined by the internal control result for the respective sample. The table below details the results interpretation of the SARS-CoV-2 and internal control target for each sample.

---

## 8 Examination and Interpretation of Patient Specimen Results

Assessment of clinical specimen test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If the controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

<u>Sample Result</u>	<u>SARS-CoV-2 FAM Ct Value</u>	<u>Internal Control HEX Ct Value</u>	<u>Other Characteristics</u>
SARS-CoV-2 RNA POSITIVE	< 40	Any Ct value	A characteristic amplification curve in comparison to the PCR negative control. An internal control amplification curve in the HEX (VIC) channel is expected. A strong positive SARS CoV-2 sample may result in a negative internal control result.
SARS-CoV-2 RNA NEGATIVE	No Ct value	≤ 36	Amplification curve in the HEX (VIC) internal control channel
Invalid Sample**	No Ct value	> 36	Absence of an amplification curve in the FAM and HEX (VIC) channels indicates an invalid result for the sample.

\*\*An invalid sample can be an indication of failed sample addition, extraction and/or PCR. It is recommended that the RNA be diluted five-fold into PCR grade water and retested; include the undiluted RNA as a sample. If the test is still not valid a new extraction is recommended.

---

## Limitations

### 9 Limitations

- Performance of the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test has only been established in upper and lower respiratory specimens (such as nasal, nasopharyngeal, oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage, and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate). Other specimen types have not been evaluated and should not be tested with this assay.
- Negative results do not preclude infection with SARS-CoV-2 virus and should not be the sole basis of a patient management decision.
- Laboratories are required to report all positive results to the appropriate public health authorities.
- Samples must be collected, transported, and stored using appropriate procedures and conditions. Improper collection, transport, or storage of specimens may affect the test performance.
- Extraction and amplification of nucleic acid from clinical samples must be performed according to the specified methods listed in this procedure. Other extraction approaches and processing systems have not been validated.
- A false negative result may occur if a specimen is improperly collected, transported or handled. False negative results may also occur if amplification inhibitors are present in the specimen or if inadequate numbers of organisms are present in the specimen.
- If the virus mutates in the test target region, SARS-CoV-2 RNA may not be detected or may be detected less predictably. Inhibitors or other types of interference may produce a false negative result.
- False-positive results may arise from cross contamination during specimen handling, preparation, nucleic acid extraction, PCR assay set-up or product handling.
- This test cannot rule out diseases caused by other bacterial or viral pathogens.
- The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutic, immunosuppressant drugs or cold medications have not been evaluated.

## Assay Performance

### 10 Inclusivity (analytical reactivity)

To assess the *in silico* inclusivity of the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test, a multiple sequence alignment (MSA) was generated from the GISAID CoV database sequences submitted between the dates of December 23, 2019 and April 15, 2020 and compared for identity to the test primers and probes. Only full length, high coverage sequences were used, resulting in 6,267 sequences in the design regions. 6,260 sequences have a 100% match to the N1 forward primer, 6,218 have a 100% match to the N1 probe and 6,224 have a 100% to the N1 reverse primer. This represents 99.9%, 99.2% and 99.3% of N1 sequences analyzed. Likewise, 6,258 sequences have a 100% match to the N2 forward primer, 6,257 have a 100% match to the N2 probe and 6,261 have a 100% match to N2 reverse primer. This represents 99.9%, 99.8%, and 99.9% of N2 sequences analyzed. Of the remaining sequences with mismatches, only one sequence had a mismatch in more than one binding region of the N1 design (hCoV-19/USA/UN-UW-1407/2020 | EPI\_ISL\_422983 | 2020-03-17). However, this strain maintains a perfect match to the N2 design and is therefore predicted to be amplified and detected by the combined target assay. No sequences were identified with a mismatch in both the N1 and N2 target regions. Therefore, the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test would be predicted to amplify and detect all analyzed sequences.

### 10.1 Exclusivity (Cross-Reactivity)

To assess the *in silico* exclusivity of the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test, an MSA was generated from several high priority pathogens from the same genetic family as SARS-CoV-2 as well as other high-profile pathogens likely in the same biological niche as SARS-CoV-2. This alignment was then compared for identity to the test primers and probes.

The N1 and N2 design regions were aligned with SARS coronavirus (NC\_004718), MERS coronavirus (NC\_019843), and human coronaviruses NL63 (NC\_005831), OC43 (KX344031), 229E (NC\_002645), and HKU1 (NC\_006577). No single primer or probe sequence contained greater than 80% identity to the design region.

For the organisms listed in Table 1 below, there was insufficient identity to align any of the additional organisms listed. No single organisms contained greater than 80% identity to the design region.

It can reasonably be concluded that the N1 and N2 primers and probes will not amplify and detect any of the virus, bacterial or yeast sequences analyzed.

Table 1: List of organisms analyzed *in silico*

Organism	Strain	Accession or WGS number
Human Adenovirus	A	NC_001460
Human Metapneumovirus (hMPV)	00-1	NC_039199
Parainfluenza virus 1	NM001	KX639498
Parainfluenza virus 2	VIROAF10	KM190939
Parainfluenza virus 3	CFI1849/2012	KJ672618
Parainfluenza virus 4	SC3019/2015	KY986647
Infuenza A	8/1934(H1N1)	NC_002016 to NC_002023
Infuenza B	2/2012 BX-51C	MT056021 to MT056028
Enterovirus	D68	MN389735
Respiratory syncytial virus	B/WI/629-Q0190/10	JN032120
Human Rhinovirus	14	NC_001490
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL029	AE001363
<i>Haemophilus Influenzae</i>	NCTC8143	LN831035

<i>Legionella pneumophila</i>	Phil. 1	CP015928
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HN-506	AP018036
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCTC7465	LN831051
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NCTC8198	LN831034
<i>Bordetella pertussis</i>	18323	HE965805
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	CP010546
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	E2178	NJFV01000001 to NJFV01000219
<i>Candida albicans</i>	SC5314	CP017623 to CP017630
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	AE004091
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATC 12228	NC_004461
<i>Staphylococcus (Streptococcus) salivarius</i>	NCTC8618	NZ_LR134274

## 10<sup>2</sup> Analytical Sensitivity- SARS-CoV-2 RNA

The analytical sensitivity was defined as the lowest concentration of analyte that could be reliably detected with 95% confidence. This was assessed by testing dilutions of RNA template representing the SARS-CoV-2 genomic region of interest. Seven dilutions were tested on the Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR instrument, in three sessions of 12 replicates each, resulting in 36 replicates for each concentration tested. The detection rate mean FAM (SARS CoV-2) Ct, Ct standard deviation (SD) and Ct coefficient of variation (%CV) were calculated for each dilution level.

Table 2 summarizes the analytical sensitivity test results. The data shows that the OPTI SARS CoV-2 RT-PCR Test detects 1 copy/ $\mu$ L of SARS-CoV-2 viral RNA with a confidence  $\geq$ 95%. This concentration demonstrates the limit of detection of the kit.

Table 2: Analytical Sensitivity

ABI 7500 Results						
<u>Dilution Level</u>	<u>RNA Concentration (copies/<math>\mu</math>L)</u>	<u>Replicates Detected</u>	<u>Detection Rate</u>	<u>Mean Ct (FAM)</u>	<u>Ct SD</u>	<u>Ct % CV</u>
1	400	36	100%	26.5	.092	0.3%
2	40	36	100%	29.7	.084	0.3%
3	4	36	100%	33.2	.361	1.1%
4	2	36	100%	34.6	.722	2.1%
<b>5</b>	<b>1</b>	<b>35</b>	<b>97%</b>	<b>35.3</b>	<b>.625</b>	<b>1.8%</b>
6	0.5	31	86%	36.6	.938	2.6%
7	0.2	18	50%	36.4	.616	1.7%

---

### 10.<sup>3</sup> Precision

Assay precision is expressed in the form of the Ct standard deviation (SD) and Ct coefficient of variation (%CV) for multiple wells. Precision for the OPTI SARS CoV-2 RT-PCR Test was determined by the repeated testing of SARS-CoV-2 RNA template dilutions prepared to represent 3 viral load levels:

- High- 2000 copies/reaction (400 copies/ $\mu$ L)
  - Mid- 200 copies/reaction (40 copies/ $\mu$ L)
  - Low- 20 copies/reaction (4 copies/ $\mu$ L)
- 

### 10.<sup>3.1</sup> Repeatability

Repeatability was measured by analyzing 12 replicates each of the High, Mid and Low RNA copy number dilutions on a single plate. Results are shown in table 3, below.

Table 3: Repeatability

ABI 7500 Results						
<u>Dilution Level</u>	<u>RNA Concentration (copies/<math>\mu</math>L)</u>	<u>Replicates Detected</u>	<u>Detection Rate</u>	<u>Mean Ct (FAM)</u>	<u>Ct SD</u>	<u>Ct % CV</u>
High	400	12	100%	26.5	.086	0.3%
Mid	40	12	100%	29.7	.099	0.3%
Low	4	12	100%	33.1	.463	1.4%

---

### 10.<sup>3.2</sup> Inter-instrument and Operator Reproducibility

Inter-Instrument and Operator reproducibility was measured by analyzing 12 replicates each of the High, Mid and Low RNA copy number samples on a single plate per instrument, with a different operator conducting each test. Results are shown in table 4 below.

Table 4: Instrument/operator Reproducibility

Instrument/Operator Mean Ct (FAM)							
<u>Dilution Level</u>	<u>RNA Concentration (copies/<math>\mu</math>L)</u>	<u>ABI 7500 Operator-1</u>	<u>ABI QS-5 Operator-2</u>	<u>LC480 Operator-3</u>	<u>Detection Rate</u>	<u>Ct (FAM)</u>	
						<u>Mean</u>	<u>% CV</u>
High	400	26.5	27.2	28.0	100%	27.2	2.3%
Mid	40	29.7	29.8	30.7	100%	30.1	1.6%
Low	4	33.1	33.4	33.5	100%	33.3	1.2%

#### 10.4 Limit of Detection (LoD)

Limit of detection (LoD) is defined as the lowest concentration of SARS-CoV-2 RNA at which > 95% of replicates test positive. LoD for the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test was determined from dilutions of synthetic SARS-CoV-2 RNA prepared in nasopharyngeal (NP) swab or sputum sample matrix. Samples were collected prior to 2020 and were considered negative for SARS-CoV-2.

The initial LoD was determined with 3-fold serial dilutions tested in triplicate. Each replicate was extracted using the RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit following the standard protocol. Extracted RNA was tested on the Applied Biosystems® 7500 PCR instrument. To confirm the LoD, 20 replicates of each sample matrix spiked with SARS-CoV-2 RNA at the initial LoD concentration and a further 3-fold dilution were extracted and tested in the same manner as the initial LoD evaluation. The LoD was confirmed to be 1/μL (5 copies per reaction) in both NP swab and sputum sample matrices. Results are shown in Table 5 below.

Additional studies showed comparable LoD results when using the OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit (OPTI Medical Systems 99-58015) and PurePrep Pathogens Extraction Kit (MolGen BV OE00290096) on the Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime with extracted RNA tested on the Applied Biosystems® 7500 FAST PCR instrument. The Manual protocol for the OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit was also shown to have comparable LoD results with the RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit with extracted RNA tested on the Applied Biosystems® 7500 FAST PCR instrument.

Table 5: LoD Testing in NP Swab and Sputum

RNA (copies/μL)	NP Swab Matrix				Sputum Matrix			
	Mean Ct (FAM)	Mean Ct (VIC/HEX)	Detection Rate	% Detection	Mean Ct (FAM)	Mean Ct VIC/HEX)	Detection Rate	% Detection
1	37.6	25	19/20	95%	38.0	20.4	20/20	100%
0.2–0.3	38.5	25.1	12/20	60%	40.1	20.3	2/20	10%

#### 10.5 Additional Instrument LoD Evaluation

An additional study was conducted to determine the LoD for the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test on multiple PCR instruments. Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480, and Bio Molecular Systems Mic PCR instruments were included in this study. The LoD was evaluated by testing 20 replicates of pooled nasopharyngeal (NP) swab and sputum matrix spiked with SARS-CoV-2 synthetic RNA at 1 copy/μL, which had been previously confirmed as the LoD for the ABI 7500 PCR instrument. Detection of 95% of the replicates (19/20) was considered confirmation of the LoD for the instrument. The LoD of 1 copy/μL was confirmed for each of the sample types on all the instruments tested. Sputum samples were not tested on the LC480 or BSM MIC instruments. These results are shown in table 6 below.

Table 6: LoD Confirmation on Multiple PCR Instruments

PCR Instrument	RNA (copies/μL)	NP Swab Matrix				Sputum Matrix			
		Mean Ct (FAM)	Mean Ct (VIC/HEX)	Detection Rate	% Detection	Mean Ct (FAM)	Mean Ct VIC/HEX)	Detection Rate	% Detection
ABI 7500	1	37.6	25	19/20	95%	38.0	20.4	20/20	100%
ABI QS-5	1	36.5	26.1	19/20	95%	37.7	20.2	20/20	100%
Agilent MX3005P	1	33.7	22.5	19/20	95%	35.1	18.7	19/20	95%
Roche LC480	1	36.2	26.3	20/20	100%	Not Tested			
BMS MIC	1	33.7	25.3	20/20	100%	Not Tested			

The Bio-Rad CFX96 instrument was evaluated by testing quantified synthetic nucleic acid representing the SARS-CoV-2 target sequence and comparing Ct values to the Agilent Technologies, Applied Biosystems and Roche instruments. Ct values, for quantified nucleic acid at 10 copy and 100 copy per reaction, were comparable between the instruments. In addition, a set of clinical COVID-19 nasopharyngeal swabs were extracted and tested on the Bio-Rad CFX96 and Roche LC480 PCR instruments. Results for the two instruments were comparable.

**10<sup>6</sup> Contrived Positive Clinical Results**

An initial clinical evaluation was performed with the OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test, using banked nasopharyngeal (NP) swab and sputum specimens. Contrived positive samples were prepared by spiking known concentrations of SARS-CoV-2 RNA relative to the product LoD into confirmed negative clinical specimens. A total of 30 contrived positive and 30 negative samples were tested for each sample type. RNA was extracted with the RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Extraction Kit, and PCR was performed using the Applied Biosystems® 7500 PCR instrument. All the contrived positive samples were detected as positive, and all negative samples yielded negative results. Table 7 below shows the results for each sample type.

**Table 7: Contrived Positive Clinical Results**

		<b>Sample Status</b>		Totals
		Pos	Neg	
<b>OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR</b>	Pos	60	0	60
	Neg	0	60	60
	Totals	60	60	120
<b>95% Confidence Limits</b>				
		Low CL	High CL	
<b>Positive % Agreement (PPA)</b>	100.0%	92.6%	100%	
<b>Negative % Agreement (NPA)</b>	100.0%	92.6%	100%	

**10<sup>7</sup> Diagnostic Sensitivity and Specificity**

Diagnostic sensitivity and specificity of the OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test were assessed by testing NP swab and sputum samples for which the SARS-CoV-2 status was confirmed. The reference test methods used to determine sample status were the CDC test<sup>1</sup> or the Institute Pasteur test<sup>2</sup>. Sixty negative samples were defined as negative because they were collected prior to the COVID-19 pandemic. Available details for the testing are listed in Table 8. One laboratory only shared limited information regarding sample types and extraction method. A total of 133 negative and 75 positive clinical samples were included in analysis. Diagnostic sensitivity is defined as the percentage of confirmed positive samples that yield positive test results. Diagnostic specificity is defined as the percentage of confirmed negative samples that yield negative test results.

The details for each of the sample sets are listed in the table below.

<u>Laboratory</u>	<u>Sample types</u>	<u>Extraction Method</u>	<u>Reference PCR Method</u>	<u>Positive</u>	<u>Negative</u>
A French Laboratory	Respiratory samples	Unknown	Institut Pasteur	8	1
A US Laboratory Maine, USA	NP swabs	Roche MagNA Pure 96	CDC	25	8
IDEXX, Maine, USA	NP swabs	RealPCR DNA/RNA MagBeads	CDC	42	64
IDEXX, Maine, USA	NP swabs and sputum	RealPCR DNA/RNA MagBeads	Collected prior to COVID-19		60
Total				75	133

Table 8: Clinical Evaluation with Diagnostic Samples

		Sample Status		Totals
		Pos	Neg	
<b>OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR</b>	Pos	75	0	75
	Neg	0	133	133
	Totals	75	133	208

		95% Confidence Limits	
		Low CL	High CL
<b>Diagnostic Sensitivity</b>	100.0%	94.0%	100%
<b>Diagnostic Specificity</b>	100.0%	96.5%	100%

<sup>1</sup><https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>

<sup>2</sup>Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020; 25.

**For technical assistance on the OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website.

\*IDEXX are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories or its affiliates in the United States and/or other countries. All other product and company names and logos are trademarks of their respective holders.

Dye compounds in this product are sold under license from Biosearch Technologies, Inc. and protected by U.S. and world-wide patents either issued or in application.

Patent information: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2020 OPTI Medical is an IDEXX Laboratories, Inc. company. All rights reserved.

Made in France



# Índice

(ESPAÑOL)

Uso previsto.....	ES-1
Descripción del producto.....	ES-1
Materiales y almacenamiento.....	ES-2
Materiales necesarios pero no proporcionados.....	ES-3
Advertencias y precauciones.....	ES-4
Recogida de muestras.....	ES-5
Transporte de muestras.....	ES-5
Almacenamiento de muestras.....	ES-5
Reconstitución de componentes secos.....	ES-5
Extracción.....	ES-5
Controles de calidad.....	ES-6
Procedimiento de análisis.....	ES-6
Limitaciones.....	ES-8
Rendimiento del ensayo.....	ES-9



MENU



IMPRIMIR

Versión Española

## OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test

### Uso previsto

El OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa fluorescente en tiempo real para la detección cualitativa de ácido nucleico del SARS-CoV-2 en muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores (como hispos nasales, nasofaríngeos, orofaríngeos, esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal) de los pacientes con sospecha de COVID-19 por parte de su proveedor de atención médica.

Los resultados son para la identificación del ARN de SARS-CoV-2. El ARN SARS-CoV-2 es generalmente detectable en muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos indican una infección activa; es necesario establecer una correlación clínica con la historia clínica del paciente y otra información diagnóstica para determinar el estado de infección del paciente. Los resultados positivos no descartan la infección bacteriana ni la coinfección con otros virus. Los laboratorios de los Estados Unidos y sus territorios deben informar de todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.

Los resultados negativos no excluyen la infección por SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como única base para las decisiones de gestión del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

La OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test está destinada a ser utilizada por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado específicamente instruido y capacitado en las técnicas de amplificación de ácido nucleico en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

### Descripción del producto

La prueba OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) que utiliza el cebador N1 y N2 y secuencias de sonda que son descritas por el diseño de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)<sup>1</sup>. La OPTI SARS-CoV-2 Mix (SARS-CoV-2 Mix) incluye cebadores (primers) y sondas (probes) para la detección del ARN de SARS-CoV-2 cuando se amplifica con la OPTI RNA Master Mix (RNA MMx). Los objetivos de ARN SARS-CoV-2 (N1 y N2) se detectan en el canal FAM. El control interno de la prueba es RNasa P (RP), que se detecta en el canal HEX. El control interno de la prueba se basa en la detección de una secuencia de ácido nucleico conservada presente en muestras humanas. Esta secuencia del hospedador se conoce como el control interno de la muestra (internal sample control, ISC). La detección de ácido nucleico endógeno en las muestras a analizar, sirve de control para la adición, extracción y amplificación de muestras. En la SARS-CoV-2 Mix se incluyen cebadores y sondas para la detección del control interno de la muestra.

Durante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real, el ARN viral se transcribe inversamente en ADNc y posteriormente se amplifica en un protocolo de ciclo de PCR en tiempo real. Durante el proceso, la sonda se une a una secuencia diana específica situada entre los cebadores de avance e inversos. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la actividad de la nucleasa de 5' de Taq polimerasa degrada la sonda, haciendo que el fluoróforo informante se separe del fluoróforo inhibidor, generando una señal fluorescente. Con cada ciclo, las moléculas de fluoróforo informante adicionales se dividen de sus respectivas sondas, lo cual aumenta la intensidad de la fluorescencia exponencialmente. La intensidad de la fluorescencia se monitoriza en cada ciclo de PCR por uno de los instrumentos termocicladores de PCR enumerados en la Sección "Materiales necesarios pero no proporcionados".

Además, la prueba OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR utiliza el control positivo (Positive Control PC) de OPTI y el agua de grado PCR de OPTI (control negativo). El control positivo (Positive Control, PC) de OPTI contiene material sintético de SARS-CoV-2 e ISC y funciona como un control positivo para la reacción. EL agua de grado de PCR OPTI se utiliza como control negativo de RT-PCR, así como para reconstituir la SARS-CoV-2 Mix seca y el PC.

- 1 "Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Real-Time rRT-PCR Panel Primers and Probes." Centers for Disease Control and Prevention, 6 de marzo de 2020, [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html)

## Materiales y almacenamiento

Identificación/ Información general	Color de la tapa	Cantidad		Almacenamiento		Ciclos de congelación/ descongelación
		100 reacciones 99-57003	500 reacciones 99-57004	A la recepción	Después de reconstituido	
<b>OPTI SARS-CoV-2 Mix (SARS-CoV-2 Mix), seca</b>  REF 61-56616-00 Contiene cebadores y sondas N1, N2 e ISC. Reconstituir a 1 ml en el agua de grado PCR. Almacenar la SARS-CoV-2 Mix en la oscuridad. La fecha de caducidad del vial es válida tanto para la forma seca como para la reconstituida.	Rojo	1 x 1,0 ml	5 x 1,0 ml	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<b>OPTI RNA Master Mix (RNA MMx)</b>  REF 61-56618-00 Mezcla maestra concentrada que incluye transcriptasa inversa y polimerasa con arranque en caliente ("hot-start"). La RNA MMx es más viscosa que la mayoría de las mezclas maestras. Consultar la sección Procedimiento de análisis para ver las recomendaciones de manipulación. Se ha añadido un tinte de referencia (ROX) para normalizar las imprecisiones de volumen. Proteger la RNA MMx de la luz.	Negro	1 x 1,0 ml	5 x 1,0 ml	-25 a -15°C (a largo plazo)	N/A	≤6
<b>OPTI Positive Control, seco (PC)</b>  REF 44-56617-00 El PC contiene las secuencias diana para SARS-CoV-2 (región diana N1) y el control interno (RNasa P). Reconstituir a 200 µl en el agua de grado PCR. La fecha de caducidad del vial es válida tanto para la forma seca como para la reconstituida.	Azul	1 x 200 µl	1 x 200 µl	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<b>OPTI PCR Grade Water</b>  REF 61-56619-00 El agua de grado de PCR ha sido cualificada para el uso de la PCR con transcripción inversa (RT-PCR). Se utiliza para la reconstitución de la SARS-CoV-2 Mix y el PC. También se utiliza como control negativo de PCR para cada prueba. No transferir viales de agua de grado PCR entre áreas de trabajo de PCR. Se necesitan viales de agua separados para cada área a fin de evitar el riesgo de contaminación.	Transparente	2 x 1,0 ml	7 x 1,0 ml	-25 a 8°C		N/A

**Nota:** Consultar la tabla al final del folleto para ver una descripción de los símbolos usados en el folleto y las etiquetas.

## Materiales necesarios pero no proporcionados

Instrumento de PCR en tiempo real y consumibles	Fuente y código de producto
<b>Thermo Scientific</b>	
Applied Biosystems® 7500 FAST Applied Biosystems® QuantStudio 5 Placa de PCR de 96 pocillos Cubierta de placa óptica	Instrumento 7500 (4351106) y software 7500 v2.0.6 Instrumento QS5 (A28138) y software QuantStudio Design and Analysis Desktop (v1.5.1) placa: 4346906 cubierta: 4311971
<b>Agilent</b>	
Agilent Mx3005P™ Placa de PCR de 96 pocillos Tiras de tapa óptica	Instrumento 3005P (401449) y software MxPro qPCR v4.10 placa: 401334 tapas: 401425
<b>IDEXX Laboratories</b> (para el uso con muestras de las vías respiratorias superiores)	
Bio Molecular Systems Mic qPCR Tubos y tapas	Instrumento (98-0012758-00) y software micPCR v2.8.10 tubos + tapas: 98-0012759-01
<b>Bio-Rad Laboratories</b>	
Bio-Rad CFX96 Touch placa + cubierta	Instrumento (1855196) y Bio-Rad CFX Manager software v3.1 placa: HSP9601 + cubierta: MSB1001
<b>Roche</b>	
Roche LightCycler® 480 Placa de PCR de 96 pocillos + cubierta	Instrumento (05015278001) y LightCycler 480 SW v1.5.1 placa + cubierta: 04 729 692 081
<b>Equipos de extracción y consumibles</b>	
RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit NucleoMag VET Magnetic Extraction Kit OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit PurePrep Pathogens Extraction Kit	IDEXX 99-56102 (384 muestras) / 99-56106 (96 muestras) Macherey Nagel 744200.4 OPTI Medical Systems 99-58015 MolGen BV OE00290096 (n=96) y OE00290960 (n=960)
<b>Thermo Scientific</b>	
Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex Placa de 96 pocillos profundos Placa de 96 pocillos de elución Peine de 96 puntas para pocillos profundos con imán	Instrumento Flex (5400630) y software v1.0.1.0 Placa de pocillos profundos: 95040460 Placa de elución: 97002540 Peine de puntas: 97002534
Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime Placa de 96 pocillos profundos Tira de elución de 12 puntas para placa de pocillos profundos Peine de 12 puntas para placa de pocillos profundos	Instrumento Duo (5400110) y software v1.02.27.RT18 Placa de pocillos profundos: 95040460 Tira de elución: 97003520  Peine: 97003500
Extracción magnética manual (OPTI) Separador magnético para placas ed 96 pocillos Agitador/calentador de placas Pipeta multicanal	Extracción manual (OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit) MLS MLS MLS
Material de control de extracción que contiene muestras humanas (HSC)	Consultar la sección Controles de calidad

Equipos y consumibles de laboratorio	Fuente y código de producto
Microcentrifuga para microtubos de 2 ml con capacidad máxima de 1500–3000 g	MLS
Mezclador vórtex	MLS
Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml (sin ADNasa/RNasa)	MLS
Pipetas y pipetas multicanales (5–1000 $\mu$ l); pipetas específicas para la preparación de la mezcla de PCR	MLS
Puntas de pipeta sin nucleasa, resistentes a los aerosoles	MLS
Equipo de protección personal coherente con las pautas actuales para la manipulación de las muestras infecciosas	MLS
Opcional: Centrifuga con rotor y adaptadores para placas de múltiples pocillos	MLS

MLS (Major Laboratory Supplier) = Proveedor de laboratorio principal, como vwr.com o fisherscientific.com

## Advertencias y precauciones

### Generalidades

- El ensayo es para uso de diagnóstico *in vitro* (IVD) solo en virtud de la Autorización de Uso de Emergencia de la FDA.
- Solo para uso con receta.
- Manipular todas las muestras como infecciosas mediante procedimientos de laboratorio seguros. Consultar las Pautas provisionales de bioseguridad de laboratorio para la manipulación y el procesamiento de muestras asociadas con SARS-CoV-2: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafetyguidelines.html>.
- Utilizar equipo de protección personal (EPP) coherente con las pautas actuales para la manipulación de las muestras potencialmente infecciosas.
- No comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto en zonas en las que se manipulen los reactivos y las muestras humanas.
- Las modificaciones de los reactivos del ensayo, el protocolo del ensayo o la instrumentación no están permitidas e infringen la Autorización de Uso de Emergencia del producto.
- Desechar los residuos de conformidad con las normativas locales, estatales y federales.
- Los laboratorios de los Estados Unidos y sus territorios deben informar de todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.

### PCR

- Los reactivos deben almacenarse y manipularse según lo especificado en estas instrucciones de uso. No usar con fecha de caducidad vencida.
- Todo el procedimiento debe realizarse en condiciones libres de nucleasas.
- Usar guantes sin polvos de talco o de ningún otro tipo al trabajar con reactivos y ácidos nucleicos.
- Utilizar siempre puntas de pipeta con barreras de aerosol. Las puntas que se utilicen deben ser estériles y libres de ADNasa y RNasa.
- Mantener los reactivos y los tubos de PCR Mix cerrados con el tapón o cubiertos tanto como sea posible.
- Para evitar contaminación cruzada, utilizar puntas de pipeta sin nucleasa, resistentes a los aerosoles para todas las pipetas, y separar físicamente las áreas de trabajo para la extracción/manipulación de ácido nucleico, instalación de la PCR y PCR.

- Las superficies de trabajo, las pipetas y las centrifugas deben limpiarse y descontaminarse con productos de limpieza como lejía al 10%, “DNAZap™” o “RNase AWAY®” para minimizar el riesgo de contaminación por ácido nucleico. La lejía residual debe eliminarse utilizando etanol al 70%.
- El control interno de la prueba detecta el ácido nucleico humano; es importante evitar las fuentes ambientales de contaminación por ácido nucleico humano.

## Recogida de muestras

- El dispositivo de recogida de muestras no forma parte del kit de prueba. La OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test es compatible con los hisopos y medios de transporte recomendados por la FDA. Consultar las Pautas provisionales para recoger, manipular y analizar muestras clínicas de pacientes bajo investigación (Patients Under Investigation, PUI) para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV): <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
- Seguir las instrucciones del fabricante para la recogida de muestras a fin de emplear los métodos de recogida adecuados.
- Las muestras de hisopo deben recogerse utilizando sólo hisopos con una punta sintética, como nylon o Dacron® y un mango de aluminio o plástico. No se deben utilizar hisopos de alginato de calcio y no se recomiendan hisopos de algodón con mangos de madera. Colocar los hisopos inmediatamente en tubos estériles que contengan 2–3 ml de medios de transporte viral.

## Transporte de muestras

- Las muestras deben ser empaquetadas, enviadas y transportadas de acuerdo con la edición actual del Reglamento de Mercancías Peligrosas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA). Seguir las normativas de envío para Sustancias biológicas, Categoría B de la ONU 3373 al enviar muestras de posible 2019-nCoV. Almacenar las muestras a 2–8°C y enviarlas en paquetes con hielo.

## Almacenamiento de muestras

- Las muestras se pueden almacenar a 2–8°C hasta 72 horas después de la recogida.
- Si se prevé un retraso en la extracción, almacenar las muestras a –70°C o menos.

## Reconstitución de componentes secos

Reconstituir la SARS-CoV-2 Mix y el Control positivo mediante el pipeteado del agua de grado PCR al volumen indicado en la etiqueta del componente. Permitir que alcance una temperatura entre 18 y 26°C durante al menos 10 minutos; mezclar y centrifugar brevemente antes de su uso. Una vez que la SARS-CoV-2 Mix y el Control positivo se reconstituyan, dividir en varias alícuotas adecuadamente y almacenar las soluciones congeladas. Al manejar componentes congelados, descongelar a temperaturas entre 18–26°C durante aproximadamente entre 15–30 minutos, mezclar suavemente y después centrifugar brevemente (~1500–3000 × g).

## Extracción

### Kits de extracción de microesferas magnéticas

Para uso automatizado en Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex y Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime El OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit está también validado para su uso con un separador magnético manual.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX, ref. n.º 99-56102 / 99-56106)

NucleoMag VET Magnetic Extraction Kit (Macherey Nagel, ref. n.º 744200.4)

OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit (OPTI Medical System, ref. n.º 99-58015)

También pueden utilizarse otros métodos de extracción o lisis tras su validación en el laboratorio. Almacenar el ARN purificado a <–15°C si no se realizan pruebas inmediatamente después de la extracción de ARN.

## Controles de calidad

El(los) control(es) que se proporciona(n) con la prueba OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test se enumera(n) a continuación:

- Control negativo (OPTI PCR Grade Water): se necesita un control “sin plantilla” (negativo) para confirmar que la placa de PCR es válida. Se utiliza agua de grado PCR y se debe incluir para cada prueba de PCR. El control negativo debe dar negativo para la secuencia del SARS-CoV-2 y el control interno. No se incluye el control sin plantilla durante la extracción.
- Control positivo (OPTI Positive Control): se necesita un control de plantilla positivo para confirmar que la placa de PCR es válida. El ácido nucleico sintético para la región diana N1 se utiliza a 20 copias por  $\mu\text{l}$ . El control positivo se debe incluir en cada prueba de PCR y debe dar positivo para ambos canales, el del control interno y el de la secuencia de SARS-CoV-2. No se incluye el control positivo durante la extracción.
- El control interno de la prueba es una secuencia de ácidos nucleicos endógenos humanos (RNasa P) y controles para la adición y extracción de muestras y la PCR. Se espera que el control interno dé positivo para cada muestra analizada.

El(los) control(es) que es(son) necesario(s) pero no se proporciona(n) con la OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test se enumera(n) a continuación:

- Control de extracción: Se debe extraer y analizar un control de extracción que contenga material de control de muestras humanas (human specimen control, HSC) con cada conjunto de muestras de pacientes. El control de extracción se utiliza para demostrar la recuperación satisfactoria del ARN durante el proceso de extracción y debe dar negativo para la secuencia de SARS-CoV-2 y positivo para el control interno de RNasa P. Los laboratorios pueden utilizar materiales de muestras humanas negativas confirmadas (por ejemplo, una muestra respiratoria negativa). Este material debe prepararse en el volumen suficiente para ser utilizado en múltiples pruebas. El material debe analizarse antes de usarlo como control de extracción para garantizar que genera los resultados previstos.

## Procedimiento de análisis

---

### 1 Preparación de la PCR Mix.

- Mezclar la RNA MMx descongelada mediante inversión o agitación suave en vórtex.
- La RNA MMx es una solución viscosa; siempre debe pipetearla lentamente.
- Para preparar la PCR Mix, añadir 10  $\mu\text{l}$  de SARS-CoV-2 Mix y 10  $\mu\text{l}$  de RNA MMx para cada reacción.
- Cuando se prepare la PCR Mix, primero pipetear la SARS-CoV-2 Mix en el tubo y luego añadir la RNA MMx. Pipetear hacia arriba y hacia abajo unas cuantas veces para enjuagar la punta de la pipeta de MMx.
- Agitar en vórtex suavemente la solución para garantizar que los componentes se mezclen bien.
- Pipetear la PCR Mix lentamente en la placa de PCR.

Cargar la placa de PCR en un plazo de 20 minutos o almacenarla entre 2 y 8°C durante un máximo de 4 horas. La PCR Mix se puede almacenar de -25 a -15°C durante un máximo de 2 semanas. Protegerla de la luz.

---

### 2 Pipetear 20 $\mu\text{l}$ de la PCR Mix en los pocillos requeridos de la placa de múltiples pocillos.

---

### 3 Añadir 5 $\mu\text{l}$ de ARN de muestra a cada pocillo. El volumen de reacción final es de 25 $\mu\text{l}$ .

---

### 4 Incluir el control positivo (5 $\mu\text{l}$ ), el control negativo de PCR (5 $\mu\text{l}$ de agua de grado PCR) y el control de extracción (5 $\mu\text{l}$ ) para cada prueba.

---

### 5 Cubrir la placa y centrifugar brevemente la placa, si es necesario, para asentar el contenido y eliminar las burbujas de aire.

---

**6** Configurar el termociclador con el Programa de ciclo como se indica continuación.

Configuración para el informante e inhibidor (Reporter y Quencher)

<u>Diana</u>	<u>Informante</u>	<u>Inhibidor</u>
SARS-CoV-2	FAM™	BHQ® (ninguno)
Control interno (RNasa P)	HEX™ (VIC)	BHQ (ninguno)
Referencia pasiva	ROX™	N/A

Programa de ciclo (utilizado para todos los instrumentos)

<u>Paso</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ciclos</u>
Transcripción inversa (RT)	50°C	15 min	1
Desnaturalización	95°C	1 min	1
Amplificación**	95°C	15 seg	45
	60°C	30 seg	

\*\*Asegurarse de que el instrumento esté configurado para registrar la fluorescencia siguiendo el paso de amplificación de 60°C.

**7** Analizar los datos

Todos los controles de la prueba deben examinarse antes de interpretar los resultados del paciente. Si los controles no son válidos, no se pueden interpretar los resultados del paciente.

Usando el software del instrumento de PCR, asignar un identificador único para los objetivos de SARS-CoV-2 y control interno en la placa. Para obtener los valores de unidades adecuados, el análisis tanto del objetivo de SARS-CoV-2 como del objetivo de control interno debe realizarse estableciendo manualmente el umbral. Cada umbral objetivo debe establecerse por separado. El umbral debe ajustarse al punto de inflexión para la fase exponencial de la curva y por encima de la señal de fondo. La mejor manera de hacerlo es mientras se visualizan todas las curvas de amplificación, de cada secuencia diana respectiva para una secuencia dada, en una escala logarítmica. Es importante seguir el mismo procedimiento en cada ensayo que se debe ejecutar al establecer el umbral manual.

Consultar el manual del usuario de un instrumento específico para obtener orientación sobre cómo analizar los datos.

Criterios de validez de la placa

Se deben obtener los siguientes resultados de control para cada prueba de PCR a fin de que la prueba se considere válida. Si los controles de las placas no son válidos, no se pueden interpretar los resultados del paciente, no son válidos y se debe repetir la placa.

<u>Control</u>	<u>Valor de unidades Ct de SARS-CoV-2 FAM</u>	<u>Resultado de SARS-CoV-2 FAM</u>	<u>Valor de unidades de control interno HEX</u>	<u>Resultado de unidades Ct de control interno HEX</u>
Control positivo	<40	Positivo	<36	Positivo
Control negativo de PCR	Sin señal	Negativo	≥36	Negativo
Control de extracción	Sin señal	Negativo	<36	Positivo

Validez de la muestra: la validez de cada muestra se determina por el resultado de control interno de la muestra respectiva. La siguiente tabla detalla la interpretación de los resultados de la secuencia de SARS-CoV-2 y control interno para cada muestra.



## 8 Análisis e interpretación de los resultados de las muestras del paciente

La evaluación de los resultados de las pruebas de muestras clínicas debe realizarse después de que se hayan examinado los controles positivos y negativos y se determine que son válidos y aceptables. Si los controles no son válidos, no se pueden interpretar los resultados del paciente.

Resultado de la muestra	Valor de unidades Ct de SARS-CoV-2 FAM	Valor de unidades Ct de control interno HEX	Otras características
ARN DE SARS-CoV-2 POSITIVO	<40	Cualquier valor de unidades	Una curva de amplificación característica en comparación con el control negativo de PCR. Se espera una curva de amplificación de control interno en el canal HEX (VIC). Una muestra que da un resultado claramente positivo de SARS-CoV-2 puede dar lugar a un resultado de control interno negativo.
ARN DE SARS-CoV-2 NEGATIVO	Sin valor de unidades	≤36	Una curva de amplificación en el canal de control interno HEX (VIC).
Muestra no válida**	Sin valor de unidades	>36	La ausencia de curva de amplificación en los canales FAM y HEX (VIC) indica un resultado no válido para la muestra.

\*\*Una muestra no válida puede ser una indicación de adición, extracción y/o PCR de muestras fallida. Se recomienda diluir el ARN cinco veces en agua de grado PCR y volver a analizarlo; incluir el ARN no diluido como muestra. Si la prueba sigue sin ser válida, se recomienda una nueva extracción.

## Limitaciones

### 9 Limitaciones

- La realización de la prueba OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR solo se ha establecido en muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores (como hisopos nasales, nasofaríngeos, orofaríngeos, esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal). No se han evaluado otros tipos de muestras y no deben analizarse con este ensayo.
- Los resultados negativos no excluyen la infección con el virus SARS-CoV-2 y no deben ser la única base para una decisión de gestión del paciente.
- Los laboratorios deben informar de todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.
- Las muestras deben recogerse, transportarse y almacenarse utilizando los procedimientos y condiciones correspondientes. La recogida, el transporte o el almacenamiento inadecuados de muestras pueden afectar a la realización de la prueba.
- La extracción y amplificación del ácido nucleico de las muestras clínicas se debe realizar de acuerdo con los métodos especificados en este procedimiento. No se han validado otros enfoques de extracción y sistemas de procesamiento.
- Puede producirse un resultado falso negativo si la muestra se recoge, transporta o manipula indebidamente. También pueden producirse resultados falsos negativos si los inhibidores de la amplificación están presentes en la muestra o si hay un número insuficiente de organismos presentes en la muestra.
- Si el virus muta en la región diana de la prueba, puede que no se detecte el ARN de SARS-CoV-2 o que se detecte de forma menos predictiva. Los inhibidores u otros tipos de interferencia pueden producir un resultado falso negativo.
- Los resultados falsos positivos pueden surgir por la contaminación cruzada durante la manipulación de las muestras, la preparación, la extracción de ácidos nucleicos, la configuración del ensayo de PCR o la manipulación del producto.
- Esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos víricos o bacterianos.
- No se han evaluado los impactos de vacunas, tratamientos antivirales, antibióticos, quimioterapias, fármacos inmunodepresores o medicamentos para el resfriado.

## Realización del ensayo

### 10 Inclusividad (reactividad analítica)

Para evaluar la inclusividad *in silico* de OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test, se generó una alineación de secuencia múltiple (multiple sequence alignment, MSA) a partir de las secuencias de la base de datos de CoV de GISAID presentadas entre las fechas del 23 de diciembre de 2019 y el 15 de abril de 2020 y se comparó por identidad con los cebadores y las sondas de la prueba. Solo se utilizaron secuencias de alta cobertura de longitud completa, lo que resultó en 6267 secuencias en las regiones de diseño. 6260 secuencias tienen una compatibilidad del 100% con el cebador de avance N1, 6218 tienen una coincidencia del 100% con la sonda N1 y 6224 tienen una coincidencia del 100% con el cebador inverso N1. Esto representa el 99,9%, 99,2% y 99,3% de las secuencias N1 analizadas. Del mismo modo, 6258 secuencias tienen una coincidencia del 100% con el cebador de avance N2, 6257 tienen una coincidencia del 100% con la sonda N2 y 6261 tienen una coincidencia del 100% con el cebador inverso N2. Esto representa el 99,9%, 99,8% y 99,9% de las secuencias N2 analizadas. De las secuencias restantes con discordancias, solo una secuencia tuvo una discordancia en más de una región de unión del diseño N1 (hCoV-19/USA/UN-UW-1407/2020|EPI\_ISL\_422983|2020-03-17). Sin embargo, esta cepa mantiene una coincidencia perfecta con el diseño N2 y, por tanto, se prevé que se amplifique y detecte mediante el ensayo de secuencias diana combinadas. No se identificó ninguna secuencia con una discordancia en ambas regiones objetivo N1 y N2. Por lo tanto, se prevé que RT-PCR OPTI SARS-CoV-2 Test amplifique y detecte todas las secuencias analizadas.

### 10<sup>1</sup> Exclusividad (reactividad cruzada)

Para evaluar la exclusividad *in silico* de OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test, se generó un MSA a partir de varios patógenos de alta prioridad de la misma familia genética que SARS-CoV-2, así como de otros patógenos de alto perfil probablemente en el mismo nicho biológico que SARS-CoV-2. A continuación, se compara esta alineación por identidad con los cebadores y las sondas de la prueba.

Las regiones de diseño N1 y N2 se alinearon con el coronavirus del SARS (NC\_004718), el coronavirus de MERS (NC\_019843) y los coronavirus humanos NL63 (NC\_005831), OC43 (KX344031), 229E (NC\_002645) y HKU1 (NC\_006577). Ninguna secuencia de cebadores o sonda contenía una identidad superior al 80% en la región de diseño.

Para los organismos enumerados en la Tabla 1 a continuación, hubo una identidad insuficiente para alinear cualquiera de los organismos adicionales enumerados. Ningún organismo individual contenía una identidad superior al 80% en la región de diseño.

Se puede concluir razonablemente que los cebadores y las sondas de N1 y N2 no amplificarán ni detectarán ninguna de las secuencias víricas, bacterianas ni de levadura analizadas.

Tabla 1: Lista de organismos analizados *in silico*

Organismo	Cepa	Número de acceso o WGS
Adenovirus humano	A	NC_001460
Metapneumovirus humano (hMPV)	00-1	NC_039199
Virus parainfluenza 1	NM001	KX639498
Virus parainfluenza 2	VIROAF10	KM190939
Virus parainfluenza 3	CFI1849/2012	KJ672618
Virus parainfluenza 4	SC3019/2015	KY986647
Influenza A	8/1934(H1N1)	NC_002016 a NC_002023
Influenza B	2/2012 BX-51C	MT056021 a MT056028
Enterovirus	D68	MN389735
Virus respiratorio sincitial	B/WI/629-Q0190/10	JN032120
Rinovirus humano	14	NC_001490
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL029	AE001363

<i>Haemophilus Influenzae</i>	NCTC8143	LN831035
<i>Legionella pneumophila</i>	Phil. 1	CP015928
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HN-506	AP018036
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCTC7465	LN831051
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NCTC8198	LN831034
<i>Bordetella pertussis</i>	18323	HE965805
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	CP010546
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	E2178	NJFV01000001 a NJFV01000219
<i>Candida albicans</i>	SC5314	CP017623 a CP017630
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	AE004091
<i>Staphylococcus epidermis</i>	ATC 12228	NC_004461
<i>Staphylococcus (Streptococcus) salivarius</i>	NCTC8618	NZ_LR134274

## 10<sup>2</sup> Sensibilidad analítica- SARS-CoV-2 RNA

La sensibilidad analítica se definió como la concentración mínima de analitos que podría detectarse de forma fiable con un 95% de confianza. Esto se evaluó analizando diluciones de la plantilla de ARN que representa la región genómica SARS-CoV-2 de interés. Se analizaron siete diluciones en el instrumento PCR en tiempo real Applied Biosystem® 7500, en tres sesiones de 12 réplicas cada una, dando como resultado 36 réplicas para cada concentración analizada. La tasa de detección media FAM (SARS-CoV-2) Ct, la desviación estándar (standard deviation, SD) de Ct y el coeficiente de variación (%CV) Ct se calcularon para cada nivel de dilución.

En la tabla 2 se resumen los resultados analíticos de la prueba de sensibilidad. Los datos muestran que OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test detecta 1 copia/μl del ARN viral de SARS-CoV-2 con una confianza ≥95%. Esta concentración demuestra el límite de detección del kit.

Tabla 2: Sensibilidad del análisis.

Nivel de dilución	Concentración de ARN (copias/μl)	Resultados del ABI 7500				
		Réplicas detectadas	Tasa de detección	Ct Media (FAM)	Ct SD	Ct %CV
1	400	36	100%	26,5	0,092	0,3%
2	40	36	100%	29,7	0,084	0,3%
3	4	36	100%	33,2	0,361	1,1%
4	2	36	100%	34,6	0,722	2,1%
<b>5</b>	<b>1</b>	<b>35</b>	<b>97%</b>	<b>35,3</b>	<b>0,625</b>	<b>1,8%</b>
6	0,5	31	86%	36,6	0,938	2,6%
7	0,2	18	50%	36,4	0,616	1,7%

### 10.<sup>3</sup> Precisión

La precisión del ensayo se expresa en forma de desviación estándar (standard deviation, SD) Ct y coeficiente de variación (%CV) Ct para varios pocillos. La precisión de la prueba OPTI SARS CoV-2 RT-PCR Test se determinó mediante el análisis repetido de diluciones de plantillas de SARS-CoV-2 RNA preparadas para representar 3 niveles de carga viral:

- Alto: 2000 copias/reacción (400 copias/ $\mu$ l)
- Medio: 200 copias/reacción (40 copias/ $\mu$ l)
- Bajo: 20 copias/reacción (4 copias/ $\mu$ l)

### 10.<sup>31</sup> Repetibilidad

La repetibilidad se midió analizando 12 réplicas de cada una de las diluciones de número de copias de ARN alto, medio y bajo en una única placa. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Repetibilidad

Resultados del ABI 7500						
Nivel de dilución	Concentración de ARN (copias/ $\mu$ l)	Detección de réplicas	Tasa detectada	Ct Media (FAM)	Ct SD	Ct %CV
Alto	400	12	100%	26,5	0,086	0,3%
Medio	40	12	100%	29,7	0,099	0,3%
Bajo	4	12	100%	33,1	0,463	1,4%

### 10.<sup>32</sup> Reproducibilidad entre el instrumento y el operador

La reproducibilidad entre el instrumento y el operador se midió analizando 12 réplicas de cada una de las diluciones de número de copias de ARN alto, medio y bajo en una única placa por instrumento, con un operador diferente realizando cada prueba. Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Reproducibilidad del instrumento/operador

Nivel de dilución	ARN (copias/ $\mu$ l)	Ct Media instrumento/operador (FAM)			Tasa de detección	Ct Media (FAM)	
		Operador-1	Operador-2	Operador-3		Media	%CV
Alto	400	26,5	27,2	28,0	100%	27,2	2,3%
Medio	40	29,7	29,8	30,7	100%	30,1	1,6%
Bajo	4	33,1	33,4	33,5	100%	33,3	1,2%

#### 10<sup>4</sup> Límite de detección (LoD)

El límite de detección (limit of detection, LoD) se define como la concentración más baja del ARN de SARS-CoV-2 en la que >95% de las réplicas dan un resultado positivo. El LoD para OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test se determinó a partir de diluciones de ARN de SARS-CoV-2 sintético preparado en hisopo nasofaríngeo (nasopharyngeal, NP) o matriz de muestra de esputo. Las muestras se habían recogido antes del 2020 y se consideraron negativas para SARS-CoV-2.

El LoD inicial se determinó con diluciones en serie tres veces analizadas por triplicado. Cada réplica se extrajo utilizando el RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit siguiendo el protocolo estándar. El ARN extraído se analizó en el instrumento PCR Applied Biosystems® 7500. Para confirmar el LoD, se extrajeron y probaron 20 réplicas de cada matriz de muestra con ARN SARS-CoV-2 en la concentración inicial de LoD y una dilución adicional de 3 veces de la misma manera que la evaluación inicial de LoD. Se confirmó que el LoD era de 1/μl (5 copias por reacción) tanto en las matrices de hisopo NP como en las de muestra de esputo. Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Un estudio adicional mostró resultados comparables del LoD cuando se usa el OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit (OPTI Medical Systems 99-58015) y PurePrep Pathogens Extraction Kit (MolGen BV OE00290096) en el Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime con ARN extraído analizado en el instrumento PCR Applied Biosystems® 7500 FAST. El protocolo manual para el OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit también mostró tener resultados comparables del LoD con el OPTI DNA/RNA Magnetic Bead Kit con ARN extraído en el instrumento Applied Biosystems® 7500 FAST PCR.

Tabla 5: Análisis de LoD en hisopo NP y esputo

ARN (copias/μl)	Matriz de hisopo NP				Matriz de esputo			
	Ct Media (FAM)	Ct Media (VIC/HEX)	Tasa de detección	% de detección	Ct Media (FAM)	Ct Media (VIC/HEX)	Tasa de detección	% de detección
1	37,6	25	19/20	95%	38,0	20,4	20/20	100%
0,2–0,3	38,5	25,1	12/20	60%	40,1	20,3	2/20	10%

#### 10<sup>5</sup> Evaluación de LoD adicional del instrumento

Se realizó un estudio adicional para determinar el LoD para OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test en múltiples instrumentos de PCR. Los instrumentos Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480 de Bio Molecular Systems Mic se incluyeron en este estudio. El LoD se evaluó analizando 20 réplicas de mezcla de hisopo nasofaríngeo (nasopharyngeal, NP) y matriz de esputo enriquecidos con ARN de SARS-CoV-2 sintético a 1 copia/μl, que se había confirmado previamente como el LoD para el instrumento de PCR ABI 7500. La detección del 95 % de las réplicas (19/20) se consideró como confirmación del LoD para el instrumento. El LoD de 1 copia/μl se confirmó para cada uno de los tipos de muestras en todos los instrumentos analizados. Las muestras de esputo no se analizaron en los instrumentos LC480 o BSM MIC. Estos resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Confirmación del LoD en múltiples instrumentos de PCR

Instrumento de PCR	ARN (copias/μl)	Matriz de hisopo NP				Matriz de esputo			
		Ct Media (FAM)	Ct Media (VIC/HEX)	Tasa de detección	% de detección	Ct Media (FAM)	Ct Media (VIC/HEX)	Tasa de detección	% de detección
ABI 7500	1	37,6	25	19/20	95%	38,0	20,4	20/20	100%
ABI QS-5	1	36,5	26,1	19/20	95%	37,7	20,2	20/20	100%
Agilent MX3005P	1	33,7	22,5	19/20	95%	35,1	18,7	19/20	95%
Roche LC480	1	36,2	26,3	20/20	100%	No se analizó			
BMS MIC	1	33,7	25,3	20/20	100%	No se analizó			

El instrumento Bio-Rad CFX96 fue evaluado analizando ácido nucleico sintético cuantificado que representaba la secuencia diana de SARS-CoV-2 y comparando los valores Ct con los instrumentos de Agilent Technologies, Applied Biosystems y Roche. Los valores Ct para el ácido nucleico cuantificado a 10 copias y 100 copias por reacción, fueron comparables entre los instrumentos. Además, se extrajo y se analizó un conjunto de hisopos nasofaríngeos clínicos de COVID-19 en los instrumentos Bio-Rad CFX96 y Roche LC480 PCR. Los resultados para ambos instrumentos fueron comparables.

## 10.6 Resultados clínicos positivos artificiales

Se realizó una evaluación clínica inicial con OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test, usando muestras de hisopo nasofaríngeo (nasopharyngeal, NP) y muestras de esputo conservadas en bancos. Las muestras positivas artificiales se prepararon reduciendo las concentraciones conocidas de ARN de SARS-CoV-2 en relación con el LoD del producto en muestras clínicas negativas confirmadas. Se analizó un total de 30 muestras negativas y 30 positivas artificiales para cada tipo de muestra. El ARN se extrajo con el RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Extraction Kit, y la PCR se realizó utilizando el instrumento de PCR Applied Biosystems® 7500. Todas las muestras positivas artificiales se detectaron como positivas y todas las muestras negativas dieron resultados negativos. La Tabla 7 muestra los resultados de cada tipo de muestra.

Tabla 7: Resultados clínicos positivos artificiales

		Estado de la muestra		Totales
		Pos.	Neg.	
OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR	Pos.	60	0	60
	Neg.	0	60	60
Totales		60	60	120

Límites de confianza de 95%				
		CL bajo	CL alto	
% de acuerdo positivo (PPA)	100,0%	92,6%	100%	
% de acuerdo negativo (NPA)	100,0%	92,6%	100%	

## 10.7 Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La sensibilidad y especificidad diagnóstica de OPTI SARS-CoV-2 RT PCR Test se evaluaron mediante el análisis de muestras de hisopo NP y esputo para las que se confirmó el estado de SARS-CoV-2. Los métodos de análisis de referencia utilizados para determinar el estado de la muestra fueron la prueba de los CDC<sup>1</sup> o la prueba del Instituto Pasteur<sup>2</sup>. Se definieron como negativas sesenta muestras negativas porque se obtuvieron antes de la pandemia del COVID-19. Los detalles disponibles para el análisis se enumeran en la Tabla 8. Un laboratorio solo compartió información limitada sobre los tipos de muestras y el método de extracción. Se incluyeron en el análisis un total de 133 muestras clínicas negativas y 75 positivas. La sensibilidad diagnóstica se define como el porcentaje de muestras positivas confirmadas que dan resultados positivos en las pruebas. La especificidad diagnóstica se define como el porcentaje de muestras negativas confirmadas que dan resultados negativos en las pruebas.

Los detalles de cada uno de los conjuntos de muestras se enumeran en la siguiente tabla.

Laboratorio	Tipos de muestra	Método de extracción	Método de PCR de referencia	Positivo	Negativo
Un laboratorio francés	Muestras respiratorias	Desconocido	Instituto Pasteur	8	1
Un laboratorio estadounidense en Maine, EE. UU.	Hisopos NP	Roche MagNA Pure 96	CDC	25	8
IDEXX, Maine, EE. UU.	Hisopos NP	RealPCR DNA/RNA MagBeads	CDC	42	64
IDEXX, Maine, EE. UU.	Hisopos NP y esputo	RealPCR DNA/RNA MagBeads	Se obtuvieron antes del COVID-19		60
Total				75	133

Tabla 8: Evaluación clínica con muestras de diagnóstico

		Estado de la muestra		Totales
		Pos.	Neg.	
<b>OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR</b>	Pos.	75	0	75
	Neg.	0	133	133
Totales		75	133	208

		Límite de confianza de 95%	
		CL bajo	CL alto
<b>Sensibilidad diagnóstica</b>	100,0%	94,0%	100%
<b>Especificidad diagnóstica</b>	100,0%	96,5%	100%

<sup>1</sup><https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>

<sup>2</sup>Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detección del novedoso coronavirus de 2019 (2019-nCoV) mediante RT-PCR en tiempo real. Euro Surveill 2020; 25.

**Para obtener asistencia técnica con OPTI SARS-CoV-2 RT-PCR Test:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Comuníquese con su gerente o distribuidor de área de IDEXX o visite nuestro sitio web.













\*IDEXX es una marca comercial o una marca comercial registrada de IDEXX Laboratories o sus filiales en los Estados Unidos o en otros países. Todos los demás nombres de productos y empresas, y logotipos son marcas registradas de sus propietarios correspondientes.

Los componentes colorantes de este producto se venden bajo licencia de Biosearch Technologies, Inc. Y están protegidos por patentes estadounidenses y mundiales ya otorgadas o en fase de aplicación.

Información de la patente: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2020 OPTI Medical es una empresa de IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

## Symbol Descriptions / Descripciones de los símbolos

	Batch Code (Lot) / Código de lote (lote)
	Serial Number / Número de serie
	Catalog Number / Número de catálogo
	Authorized Representative in the European Community Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Use by date / Fecha de caducidad
	Date of manufacture / Fecha de producción
	Manufacturer / Fabricante
	Temperature limitation / Limitación de temperatura
	Consult instructions for use / Consultar las instrucciones de uso
	Major change in the user instructions Cambio importante en las instrucciones del usuario
	<i>In vitro</i> diagnostic / Diagnóstico <i>in vitro</i>
	CE marking - European conformity Marca CE - Conformidad Europea





OPTI Medical Systems, Inc.  
235 Hembree Park Drive  
Roswell, Georgia 30076  
USA



MT Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
66386 St. Ingbert  
Germany  
Tel: +49 6894 581020  
[info@mt-procons.com](mailto:info@mt-procons.com)