

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

El *ampliCube* Coronavirus Panel es una prueba *in vitro*, cualitativa, usada para la identificación específica del ARN del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Próximo Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Próximo (MERS-CoV), el ARN del recién surgido SARS-CoV-2, SARS-CoV, así como el Bat SARS-like CoV (CoV de tipo SARS de murciélago), y el ARN del coronavirus humano (HCoV) (NL63, OC43, 229E, HKU1) en el esputo, frotis, LBA (lavado broncoalveolar), secreción traqueal o heces humanos.

2 Campo de aplicación

El Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Próximo (MERS-CoV), y los coronavirus humanos (HCoV), junto con las especies NL63, OC43, 229E y HKU1, pertenecen a la familia de los *Coronaviridae* y son agentes patógenos que pueden causar desde leves infecciones respiratorias infecciones respiratorias hasta graves y agudos síndromes de las vías respiratorias síndromes respiratorios agudos graves. El HCoV causa aproximadamente un tercio de los catarros agudos y un síntoma accesorio frecuente es la diarrea. El MERS-CoV provoca el síndrome respiratorio de Oriente Próximo. Los síntomas son parecidos a los de una enfermedad gripal respiratoria, presentando a menudo una evolución grave, acompañada de inflamación pulmonar y disnea. Es importante plantear un diagnóstico diferencial del MERS-CoV, especialmente cuando el afectado ha tenido contacto con personas infectadas por el MERS-CoV durante las dos últimas semanas antes del comienzo de la enfermedad, en un país de la península arábiga.

Los coronavirus del SARG, como el SARS-CoV-2 (causa etiológica de la pandemia de COVID-19), se propagan principalmente mediante la transmisión de persona a persona, por medio de gotitas en el aire que respiramos. Los síntomas pueden variar desde fiebre, tos y dificultad para respirar, hasta neumonía y síndrome de dificultad respiratoria aguda, y finalmente la muerte en las personas que padecen alguna comorbilidad.

El *ampliCube* Coronavirus Panel se utiliza para detectar y diferenciar entre MERS-CoV, SARS-CoV (en particular, SARS-CoV-2) y HCoV.

3 Principio de la prueba

La prueba es un sistema PCR real time (en tiempo real) RT (retrotranscriptasa). Utiliza primers (iniciadores) específicos y sondas marcadas para la delimitación del ARN en el ADNc, amplificación y detección del ARN de los MERS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV y HCoV (NL63, OC43, 229E, HKU1).

Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la muestra del paciente no contengan sustancias inhibitoras de la RCP-RT, se somete la muestra a un control interno (IC) durante el aislamiento del ácido nucleico. Este control interno se delimita, amplifica y detecta en la misma mezcla reactiva de la RCP-RT en el ADNc. De esta manera es posible excluir resultados negativos incorrectos de la prueba debidos a una inhibición de la reacción de RCP-RT. El control interno se usa al mismo tiempo para la identificación de la extracción del ácido nucleico de la muestra del paciente.

Las sondas para la detección específica del agente patógeno específico del ácido nucleico están marcadas con los colorantes informadores FAM (MERS-CoV), HEX (SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV) y ATTO Rho 12 (HCoV) marcados. Las sondas para la detección del control interno están marcadas con ATTO 647N. De este modo es posible la detección simultánea de todas las secuencias de interés en una mezcla de reacción.

El valor Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) describe la parte de la curva en la cual la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente, sobrepasando el valor de fondo.

4 Reactivos

4.1 Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 50 comprobaciones. Cada juego de reactivos contiene:

P&P MIX	150 µl de mezcla de Primer y sonda para MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV y control interno (tapón verde)
ENZYME	600 µl de mezcla de enzimas (tapón blanco) Contiene transcriptasa inversa y ADN polimerasa. (El componente está coloreado de azul)

CONTROL INT	250 µl de control interno (tapón incoloro)
CONTROL +	170 µl de control positivo (tapón rojo)
CONTROL -	2 x 1800 µl de control negativo (tapón azul)
INSTRU	1 instrucciones de uso

4.2 Otros reactivos, materiales y aparatos necesarios

- Según el termociclador de PCR en tiempo real utilizado, MIKROGEN proporciona reactivos para la calibración de colorantes: MIKROGEN *ampliCube* Color Compensation (LightCycler® 480 II (Roche) ref. 50502), MIKROGEN *ampliCube* Color Compensation (cobas z 480 Analyzer (Roche) ref. 50503), o el juego de calibración de colorante para el CFX96 (Bio-Rad, ref. 50505). MIKROGEN proporciona plantillas de análisis mic para su procesamiento en el termociclador de PCR Mic (bms).
- Extracción de ácidos nucleicos: Se recomiendan los siguientes sistemas de extracción de ácidos nucleicos: MagNA Pure® System, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) or *alpha*Clean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN) con procesamiento en el extractor M32, M48 o M96 (Biomomma).
- Real-Time Cycler: LightCycler® 480 II (Roche), cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms), Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Placas de PCR de 96 pocillos y portaobjetos: siga las recomendaciones del fabricante del termociclador de PCR en tiempo real.
- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl.
- Mezclador vorticial de alta velocidad (recomendado: 3200 rpm).
- Minicentrífugadora.
- En caso dado, centrifugadoras de placas.
- PBS o H₂O (*calidad para PCR*) para el uso de un hisopo de fibra de floculación de nylon sin medio de transporte.
- Guantes protectores desechables, sin talco.
- Bloque de refrigeración.

5 Durabilidad y manipulación

- Conserve los reactivos antes y después de su uso, a una temperatura entre -25 °C y -18 °C.
- Es preciso evitar que los componentes se descongelen y vuelvan a congelar repetidas veces (no más de diez veces). Recomendamos llevar a cabo un cálculo alícuota de los componentes de la prueba después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2 °C a +8 °C).
- Se deben proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución del análisis.
- Antes de iniciar la prueba, es necesario descongelar completamente todos los reactivos, mezclarlos brevemente con el vórtice y luego centrifugarlos.
- Los envases llevan una fecha de caducidad. A partir de esta fecha, rechazaremos todo reclamo por garantía de calidad.
- Solo el personal profesional autorizado debe llevar a cabo exclusivamente el análisis.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones considerables del producto o bien de la prescripción de uso, es posible que la aplicación esté fuera del propósito especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede provocar resultados incorrectos de la prueba. Añada cuidadosamente las muestras de los pacientes y los controles. Tenga cuidado de evitar que las mezclas de reactivos se depositen en otras concavidades.

6 Advertencias y medidas de seguridad

- Utilice el producto exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras de los pacientes deben manejarse como si fueran potencialmente infecciosas.
- Durante todo el procedimiento de análisis es necesario usar guantes desechables adecuados.
- Todos los reactivos y materiales que entran en contacto con las muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o deben eliminarse de acuerdo con las normas de higiene vigentes en el lugar de aplicación. Es necesario

observar las concentraciones y los tiempos de incubación especificados por el fabricante.

- ⚠ No reemplace nunca ni mezcle los reactivos con reactivos de otros lotes de kits, con otros kits de RCP de MIKROGEN ni con reactivos de otros fabricantes.
- ⚠ Lea detenidamente y observe las instrucciones de uso, antes de empezar el análisis. Si no se observa el protocolo indicado en las instrucciones de uso, se pueden obtener resultados incorrectos.

7 Obtención de muestras y preparación de los reactivos

7.1 Material de muestra

El material inicial para el ampliCube Coronavirus Panel es el ARN extraído del esputo, frotis, LBA, secreción traqueal o material fecal de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado de la prueba. Es necesario garantizar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología de RCP en tiempo real.

7.1.1 Preparación de muestras

Para el uso de un hisopo de fibra de floculación de nylon sin medio de transporte:

1. Incube el hisopo en 0,5 ml de PBS (si se extrajo con MagNA Pure® System) o en 0,5 ml de H₂O (si se extrajo con alphaClean Mag RNA/DNA) durante 5 minutos a la temperatura ambiental.
2. Deseche el hisopo y utilice la suspensión de PBS o de H₂O para la extracción del ácido nucleico.

7.2 Extracción de los ácidos nucleicos

Extraiga los ácidos nucleicos de la muestra del paciente y del control negativo (NC). Para la extracción recomendamos un volumen inicial de 200 µl, y para la elución, un volumen de 50 µl o 100 µl, según el sistema de extracción. Las extracciones (MagNA Pure® System (Roche) de 400 µl de material inicial eluidas en 100 µl mostraron unos resultados parecidos. Siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

1. Descongele el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).
Asegúrese de que el IC y el NC estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle el IC y el NC un momento con el agitador de vórtice; luego, centrifúgelos durante un tiempo breve.
2. Durante la extracción, agregue a cada muestra del paciente y al NC 5 µl de IC. El IC debe añadirse a la mezcla de la solución amortiguadora para lisis de las muestras y no directamente al material de muestra.
3. Extraiga las muestras del paciente y el NC. (Nota: No es posible aplicar el NC a la RCP sin llevar a cabo la extracción.)
4. El control positivo no se extrae.

Se recomienda el siguiente sistema de extracción de ácido nucleico y se ha utilizado para la evaluación del rendimiento:

Sistema de extracción	Volumen de la muestra	Volumen de elución
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction System (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Si desea utilizar otros métodos de extracción, comuníquese con el fabricante para aclarar la compatibilidad.

7.3 Preparación de la mezcla maestra

1. Descongele la mezcla de Primer y sonda (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteja los reactivos de la luz.
Asegúrese de que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con el agitador de vórtice y luego centrifúgelos durante un tiempo breve.
2. Prepare la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Componente	Mezcla maestra para 1 reacción
Mezcla de Primer (iniciador) y sonda	3 µl
Mezcla de enzimas	12 µl
Volumen total	15 µl

3. Mezcle la mezcla maestra con el agitador de vórtice y luego centrifúguela durante un tiempo breve.
4. Prepare 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de RCP.

7.4 Preparación de la reacción de RCP de RT

1. Descongele el control positivo (PC) (tapón rojo).
Asegúrese de que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con el agitador de vórtice y luego centrifúgelos durante un tiempo breve.

Componente	1 reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluido de muestra o eluido de NC o bien PC	10 µl

2. Pipetee 10 µl de eluido de muestra en 15 µl de mezcla maestra.
3. Pipetee 10 µl del control positivo (no preparado) en 15 µl de mezcla maestra.
4. Pipetee 10 µl de eluido del control negativo en 15 µl de mezcla maestra.

Cada ejecución debe contener un control positivo y un control negativo.

Selle la placa de RCP con un adhesivo, una película óptica o los tubos de reacción con las tapas proporcionadas.

 **Las placas de RCP o los tubos de reacción se deben agitar en vórtice a máxima velocidad durante al menos 5 segundos y luego se deben centrifugar brevemente.**

 **Los tubos de reacción de PCR para el termociclador de PCR Mic deben agitarse a máxima velocidad durante al menos 10 segundos.**

8 Programación del termociclador en tiempo real

El ampliCube Coronavirus Panel se evaluó con LightCycler® 480 Instrument II (Roche) y se validó en el cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms) y Rotor-Gene Q (Qiagen).

8.1 Ajuste de los canales de detección

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo
Colorante informador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Estimulación	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emisión	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm

Para el LightCycler® 480 Instrument II (Roche) es necesario utilizar previamente una compensación de color (ref. 50502) provista por MIKROGEN.

cobas z 480 Analyzer (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo
Colorante informador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Estimulación	465 nm	540 nm	540 nm	610 nm
Emisión	510 nm	580 nm	610 nm	670 nm

Con el cobas z 480 Analyzer (Roche) es necesario utilizar previamente una compensación de color (ref. 50503) provista por MIKROGEN.

CFX96 (Bio-Rad)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo
Colorante infor- mador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Modo	All channels			

La adquisición y evaluación de datos en el CFX96 se llevan a cabo mediante el método *calc / data acquisition mode: all channels*. Antes, se debe efectuar una calibración del CFX96 (Bio-Rad) para ATTO Rho12 y ATTO 647N. Se puede adquirir obtener el conjunto de calibración de colorante necesario (CFX96 (Bio-Rad), ref. 50505) de MIKROGEN.

QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo
Colorante infor- mador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Estimulación	X1 / 470 nm	X2 / 520 nm	X4 / 580 nm	X5 / 640 nm
Emisión	M1 / 520 nm	M2 / 558 nm	M4 / 623 nm	M5 / 682 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

En Settings (Ajustes), seleccione 1. Run mode "standard", 2. Reference dye "none", 3. Experiment type "custom".

Mic (bms)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo

MIKROGEN le proporciona plantillas de análisis Mic validadas para su procesamiento. Use únicamente las plantillas Mic-Assay de MIKROGEN. Las plantillas actuales de MIKROGEN Mic-Assay se pueden descargar gratuitamente en la página de inicio de MIKROGEN (www.mikrogen.de).

Rotor-Gene Q (Qiagen)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo
Colorante infor- mador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Estimulación	470 nm	530 nm	585 nm	625 nm
Emisión	510 nm	555 nm	610 nm	660 nm
Gain	5	5	5	5

8.2 Programa de RCP

Retrotranscripción	50 °C	8 min.
Desnaturalización	95 °C	3 min.
Amplificación	45 ciclos	
• Desnaturalización	95 °C	10 seg.
• Hibridación/Alargamiento	60 °C	45 seg.

Para informaciones básicas sobre la programación de los diferentes termocicladores en tiempo real, véase el manual de instrucciones del termociclador respectivo. Si desea información específica sobre la programación del termociclador de RCP en tiempo real, utilizando el ampliCube Coronavirus Panel, sírvase contactar al fabricante.

9 Resultados

La evaluación de los datos tuvo lugar en el LightCycler® 480 II, con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validación

- El control negativo debe estar por debajo del *threshold* (umbral). El control interno (IC) en el control negativo debe mostrar una curva positiva. Si el control negativo muestra una curva positiva (contaminación) o si el IC en el control negativo no es válido, no podrá evaluarse la prueba.
- El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor de Ct del control positivo debe ser <33. Si el control positivo se encuentra fuera de esta tolerancia, significa que hay un problema con la amplificación.
- El control interno (IC) de muestras negativas debe mostrar una curva positiva. Es necesario comparar la señal del IC de una muestra del paciente con la señal del IC en el control negativo extraído. Una diferencia de >+3 en el valor de Ct del IC del control negativo o bien una falta de la señal del IC en la muestra pueden indicar que hay una inhibición significativa de la reacción de RCP de la RT. En estos casos, no es válido un resultado negativo de la prueba.

9.2 Evaluación

Se puede llevar a cabo la evaluación de los datos con el correspondiente software de termociclador RCP o con una solución de software admitida específicamente por MIKROGEN para la evaluación automatizada de la RCP. Al utilizar un LightCycler® 480 II, se puede efectuar la evaluación con la modalidad *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recomendado) o con la modalidad *Abs Quant/Fit Points*. Solicite a MIKROGEN más información y las instrucciones correspondientes.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)	
Color	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo	
Colorante informador	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N	
Evaluación con	LightCycler 480 II	465 - 510	533 - 580	533 - 610	618 - 660
	cobas z 480	465 - 510	540 - 580	540 - 610	610 - 670
	CFX96	FAM	HEX	ROX	Cy5
	QuantStudio 5	FAM	VIC	ROX	ATTO 647N
	Mic	FAM	HEX	ROX	Cy5
Rotor-Gene Q	Verde	Amarillo	Anaranjado	Rojo	

Las señales de un valor superior al *umbral* se consideran resultados positivos. Los campos vacíos en la tabla se consideran un resultado negativo.

Color	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Control interno (IC)
Verde	Positivo	---	---	---
Amarillo	---	Positivo	---	---
Anaranjado	---	---	Positivo	---
Rojo	---	---	---	Positivo*

* En el caso de señales positivas en los canales de detección de patógenos, no es necesaria la señal del control interno para la interpretación de la prueba. Una carga alta de patógenos en la muestra del paciente puede conducir a una disminución o a la ausencia de señal para el control interno.

10 Límites del método, restricciones

- Los resultados de las pruebas siempre se deben ver en relación con el cuadro clínico. Las consecuencias terapéuticas del diagnóstico deben establecerse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo de la prueba de MERS-CoV, SARS-CoV-2 / SARS-CoV / Bat SARS-like CoV o HCoV no significa que se puede excluir una infección por los respectivos agentes patógenos.

11 Características del desempeño

11.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

Se determinaron la sensibilidad y la especificidad mediante pruebas definidas como positivas y pruebas definidas como negativas.

Tabla 1. Definición de muestras positivas.

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n = 4)	SARS-CoV-2 (n = 126)	HCoV (n = 17)
Negativos	0	3	0
Positivos	4	123	17
Sensibilidad [%]	100	97,62	100
IC [%] Intervalo de confianza (ingl. 'confidence interval')	51,01 – 100	93,23 – 99,19	81,57 – 100

Tabla 2. Definición de muestras negativas.

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n = 24)	SARS-CoV-2 (n = 490)	HCoV (n = 24)
Negativos	24	486	24
Positivos	0	4	0
Especificidad [%]	100	99,18	100
IC [%] Intervalo de confianza (ingl. 'confidence interval')	86,20 – 100	97,92 – 99,68	86,20 – 100

11.2 Sensibilidad analítica

11.2.1 Límite de detección (LoD) en copias/PCR

Se determinó el índice de detección (LoD) del ampliCube Coronavirus Panel mediante series de diluciones de ADN gBlock de concentración conocida en un sistema LightCycler® 480 II System (Roche). Se determinó el límite de detección del 95 % mediante un análisis de regresión Probit con el software CombiStats™, versión 5.0 (Consejo de Europa). Se confirmó el límite de detección con 20 repeticiones en el LoD.

Tabla 3a. Límite de detección (LoD) de MERS y HCoV en copias/PCR.

	MERS-CoV	HCoV
LoD [copias/PCR] Límite de detección del 95 %	4,14	12,41*
IC 95 % [copias/PCR] Intervalo de confianza (ingl. 'confidence interval')	2,75 – 9,43	8,93 – 22,59

* Los datos se refieren al HCoV OC43; además, se analizaron los HCoV 229E, NL63 y HKU1. Los límites de detección variaron entre 20,54 y 89,48.

Tabla 3b. Límite de detección (LoD) de SARS-CoV-2/SARS-CoV/Bat SARS-like CoV en copias/PCR.

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV
LoD [copias/PCR] Límite de detección del 95 %	2,9	6,74	6,35
IC 95 % [copias/PCR] Intervalo de confianza (ingl. 'confidence interval')	1,9 – 6,4	4,12 – 14,68	4,14 – 14,43

11.2.2 Límite de detección (LoD) de SARS-CoV-2 en unidades internacionales

Además, se determinó el LoD correspondiente a las regiones destinatarias del SARS-CoV-2 con tres series de dilución independientes (cada una con 7 niveles de dilución), utilizando el estándar de la OMS (First WHO International Standard para ARN del SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/146)), incluida la extracción de ácido nucleico (kit *alpha*-Clean Mag RNA/DNA en M96 Biocomma) en un LightCycler® 480 II System (Roche) y posterior análisis de regresión Probit (software (CombiStats™, versión 6.0 (Consejo de Europa)). El límite de detección del ampliCube Coronavirus Panel se proporciona en unidades internacionales (UI) por µl del patrón de la OMS utilizado.

Tabla 3c. Límite de detección (LoD) de SARS-CoV-2 en UI/µl del patrón de la OMS.

	SARS-CoV-2
LoD [UI/µl] Límite de detección del 95 %	2,72
IC 95 % [UI/µl] Intervalo de confianza (ingl. 'confidence interval')	1,53 – 6,55

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los cebadores y sondas relacionados del ampliCube Coronavirus Panel detectan específicamente los patógenos seleccionados. Además, se determinó la especificidad mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus patógenos humanos.

Tabla 4. Bacterias y virus analizados para indicar la especificidad analítica del ampliCube Coronavirus Panel.

Bacterias	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Citomegalovirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Enterovirus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Virus de Epstein-Barr
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A
	Influenza B
	Virus del sarampión
	Virus de paperas
	Virus Parainfluenza
	Virus sincicial respiratorio (VSR) A
	Rhinovirus 58 (A)

Ninguna de estas muestras presentó una señal positiva. Los iniciadores y sondas utilizados en el ampliCube Coronavirus Panel no mostraron ninguna reacción cruzada con los agentes patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) era válido en todos los análisis.

11.4 Equivalencia de diferentes materiales de las muestras

Se determinó el coeficiente de variación (CV) del valor de Ct entre el agua y el extracto del respectivo material de la muestra después de añadir ADN de plasmidio de una concentración conocida.

Tabla 5. Equivalencia de diferentes materiales de las muestras.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV	HCoV
CV [%] (LBA, H ₂ O)	1,37	2,11	1,62	2,21	0,58
CV [%] (esputo, H ₂ O)	2,42	2,32	1,54	3,42	1,91
CV [%] (frotis, H ₂ O)	1,51	1,28	1,47	1,50	1,08
CV [%] (heces, H ₂ O)	1,94	1,33	1,28	1,98	0,85

El coeficiente de variación (CV), basado en el valor de Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) entre el agua y los extractos de ácido nucleico (obtenidos de los diversos materiales de muestra), fue ≤ 3,42% para todos los genes destinatarios.

12 Bibliografía

- L.-Y. Chang et al. (2006): Lack of Association between Infection with a Novel Human Coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki Disease in Taiwan. *The Journal of Infectious Diseases*, Jan. 2006, 193:283-6, 0022-1899/2006/19302-0015\$15.00
- L. Louie et al. (2006): Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Stool Specimens by Commercially Available Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2006, Vol. 44, No. 11, p. 4193-4193, doi:10.1128/JCM.01202-06
- F. Esper et al. (2005): Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, Feb. 2005, 191:492-8, 0022-1899/2005/19104-0002\$15.00
- F. Esper et al. (2010): Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Virology*, March 2010, Vol. 48, p. 131-133, doi:10.1016/j.jcv.2010.03.007
- M. Jevšnik et al. (2013): Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology Journal*, 2013, 10:46, doi:10.1186/1743-422X-10-46
- I. M. Mackay et al. (2015): MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, Dec. 2015, 12:222, DOI 10.1186/s12985-015-0439-5
- M. C. Nunes et al. (2014): Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, Feb. 2014, Vol. 9, Issue 2, e86448
- L. A. Sipulwa (2016): Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009–2012. *Virology Journal*, 13:18, DOI 10.1186/s12985-016-0474-x
- I. Wilhelmi (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, April 2003, Vol. 9, No. 4, p. 247-262
- F. Wu et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3

11. R. Ralph et. al. (2020): 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. J Infect Dev Ctries 2020; 14(1):3-17
12. W. G. Carlos et. al. (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. Am J Respir Crit Care Med 2020 Vol. 201, P7-P8
13. S.-Q. Deng et H.-J. Peng (2020): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. J. Clin. Med. 2020, 9, 575-584
14. Muenchhoff Maximilian, Mairhofer Helga, Nitschko Hans, Grzimek-Koschewa Natascha, Hoffmann Dieter, Berger Annemarie, Rabenau Holger, Widera Marek, Ackermann Nikolaus, Konrad Regina, Zange Sabine, Graf Alexander, Krebs Stefan, Blum Helmut, Sing Andreas, Liebl Bernhard, Wölfel Roman, Ciesek Sandra, Drosten Christian, Protzer Ulrike, Boehm Stephan, Keppler Oliver T. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. Euro Surveill. 2020;25(24):pii=2001057.https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.24.001057
15. Ute Eberle, Clara Wimmer, Ingrid Huber, Antonie Neubauer-Juric, Giuseppe Valenza, Nikolaus Ackermann, Andreas Sing (for the Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team), Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Springer, published online: 29 January 2021, https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9

Si lo desea, le enviaremos con mucho gusto bibliografía más detallada.

13 Explicación de los símbolos

	El contenido es suficiente para <n> análisis Cantidad de análisis
P&P MIX	Mezcla de Primer (iniciador) y sonda
ENZYME	Mezcla de enzimas
CONTROL INT	Control interno
CONTROL +	Control positivo
CONTROL -	Control negativo
INSTRU	Instrucciones de uso
	Observe las instrucciones de uso
CONT	Contenido, contiene
IND	Medio de diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	Número de lote/versión
REF	Número de pedido
	Utilizable hasta Fecha de caducidad
	Conservación entre x °C y y °C
	Fabricante

14 Datos del fabricante y de la versión

ampliCube Coronavirus Panel		Ref. 50142
Instrucciones de uso Válido a partir de		GAACCV004ES 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Alemania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 Correo electrónico mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
		



GAACCV004