



Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit
K1180A



Instrucciones de uso

Para uso diagnóstico in vitro

Solo para la exportación. No se vende en Estados Unidos.

Revisión B3, mayo de 2022

Tabla de símbolos

	Conformidad europea		Precaución
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Número o código de catálogo
	Fabricante		Consulte las instrucciones de uso
	Fecha de caducidad		Contiene suficiente para <N> ensayos
	Código del lote		No reutilizar
	Limitación de temperatura		Identificador único del dispositivo
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		

Aviso para el comprador: Licencia limitada

Este producto se vende en virtud de los acuerdos de licencia entre Agilent y Life Technologies Corporation. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados e intransferibles propiedad de Life Technologies Corporation para utilizar únicamente esta cantidad del producto para su uso en pruebas *in vitro* de SARS-CoV-2 en seres humanos de acuerdo con las instrucciones de uso que acompañan a este producto. No se transmite ningún otro derecho. Para obtener más información sobre la adquisición de licencias de la patente mencionada, póngase en contacto con Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, EE. UU. Correo electrónico: outlicensing@lifetech.com.

1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Información del producto

Uso previsto	6
Descripción del producto	7
Descripción del producto y principio de la prueba	7
Descripción de los pasos de la prueba	7
Materiales de control para utilizar con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit	7
Flujo de trabajo del ensayo	9

2 Materiales, seguridad y manipulación

Material suministrado	11
Reactivos, materiales, equipo y software necesarios pero no suministrados	12
Precauciones de seguridad	15
Almacenamiento y manipulación	17
Embalaje del producto	17
Almacenamiento, manipulación y estabilidad de los reactivos	17
Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras	17

3 Instrucciones para la extracción de ácidos nucleicos

Extraer ácidos nucleicos	19
--------------------------	----

4 Instrucciones para preparar las reacciones de PCR qRT

Preparar el experimento de PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real	21
Crear y preparar el experimento AriaMx/AriaDx (necesario si aún no se ha creado una plantilla)	21
Crear el experimento AriaMx/AriaDx a partir de la plantilla guardada	27
Crear y preparar el experimento ABI 7500 Fast (necesario si aún no se ha creado una plantilla)	27
Crear el experimento ABI 7500 Fast a partir de la plantilla guardada	33
Crear y preparar el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necesario si aún no se han creado los archivos de protocolo y de placa guardados)	34
Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados	40
Preparar las reacciones de PCR qRT	41

5 Instrucciones para llevar a cabo la PCR qRT

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx	46
Ejecutar el programa de PCR qRT en el sistema AriaMx/AriaDx	46
Asignar ajustes de análisis de datos para el experimento AriaMx/AriaDx	47
Exportar los datos del software Aria	51
Llevar a cabo la PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast	54
Ejecutar el programa PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast	54
Asignar ajustes de análisis de datos para el experimento ABI 7500 Fast	54
Exportar los datos de la tabla Well del software Design & Analysis a un archivo CSV	59

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch	61
Ejecutar el programa de PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch	61
Asignar los ajustes de análisis de datos para el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch	61
Exportar los datos del software CFX Maestro	66

6 Análisis y resultados

Interpretación de los resultados	69
Resultados e interpretación de las muestras de control	69
Resultados e interpretación de muestras clínicas	70

7 Control de calidad

Control de calidad	74
--------------------	----

8 Limitaciones del ensayo

Limitaciones	76
--------------	----

9 Características de rendimiento

Características de rendimiento	78
Sensibilidad analítica (límite de detección)	78
Inclusión analítica	79
Reactividad cruzada	79
Evaluación clínica	80

10 Referencia

Etiquetas del producto	82
------------------------	----

1

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Información del producto

Uso previsto **6**

Descripción del producto **7**

Flujo de trabajo del ensayo **9**

Este capítulo contiene información introductoria sobre el ensayo.

Uso previsto

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit es una prueba de diagnóstico in vitro por RT-PCR en tiempo real destinada a la detección cualitativa del ARN del SARS-CoV-2 aislado y purificado a partir de muestras de hisopos nasofaríngeos (NP), nasales y orofaríngeos (OP) obtenidos de pacientes que cumplen los criterios clínicos o epidemiológicos de COVID-19.*

Los resultados son para la identificación del ARN del SARS-CoV-2. El ARN del SARS-CoV-2 suele ser detectable en las muestras de las vías respiratorias superiores durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia del ARN del SARS-CoV-2; es necesario establecer una correlación clínica con los antecedentes del paciente y otra información diagnóstica para determinar el estado de la infección del paciente. Los resultados positivos no descartan una infección bacteriana o una coinfección con otros virus. El microorganismo detectado puede no ser la causa definitiva de la enfermedad.

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

El Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y formado específicamente en el manejo del sistema Agilent y en los procedimientos de diagnóstico in vitro.

* El rendimiento del ensayo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit se estableció utilizando muestras de hisopo nasofaríngeo recogidas en medios de transporte UTM o VCM. Los hisopos orofaríngeos, los hisopos nasales y los hisopos nasales de los cornetes medios se consideran tipos de muestras aceptables para su uso con el ensayo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, pero no se ha establecido el rendimiento con estos tipos de muestras. Las pruebas de los hisopos orofaríngeos, los hisopos nasales y los hisopos nasales de los cornetes medios (recogidos por uno mismo bajo la supervisión de un profesional sanitario o recogidos por él) se limitan a los pacientes con síntomas de COVID-19.

Descripción del producto

Descripción del producto y principio de la prueba

El Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (PCR qRT) en tiempo real. El conjunto de cebadores y sondas para el SARS-CoV-2 está diseñado para detectar el ARN del SARS-CoV-2 en muestras de hisopos nasofaríngeos (NP), nasales y orofaríngeos (OP) procedentes de pacientes con sospecha de COVID-19 por parte de los profesionales sanitarios.

Descripción de los pasos de la prueba

Los ácidos nucleicos se aíslan y purifican a partir de ~140-200 µl (dependiendo del método de extracción) de muestras de hisopos nasofaríngeos (NP) utilizando un sistema de extracción automatizado (Qiagen QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit con QIAAsymphony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit con KingFisher Flex). El ácido nucleico purificado (5 µl) se transcribe de forma inversa en ADNc y posteriormente se amplifica en una reacción de PCR qRT de un solo paso utilizando reactivos de PCR qRT Agilent Brilliant III en instrumentos de PCR en tiempo real compatibles. En el proceso, la sonda se adhiere a una secuencia blanco específica situada entre el cebador directo y el cebador inverso. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' de la *Taq* polimerasa degrada la sonda, haciendo que el colorante reportero se separe del colorante supresor, generando una señal fluorescente. Con cada ciclo, se escinden moléculas adicionales de colorante reportero de sus respectivas sondas, aumentando la intensidad de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se controla en cada ciclo de PCR mediante instrumentos de PCR en tiempo real compatibles (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast o Bio-Rad CFX96).

Materiales de control para utilizar con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Se necesita un control «sin plantilla» (negativo) para comprobar si hay contaminación en el proceso de ensayo que pueda dar lugar a resultados falsos positivos y debe utilizarse al menos una vez por placa de PCR. El usuario añade agua en lugar del ARN extraído para utilizarlo como control sin plantilla.
- Se necesita un control de plantilla positivo para garantizar que el mecanismo de detección del ARN del SARS-CoV-2 diana no se vea comprometido y debe utilizarse al menos una vez por placa de PCR (50 copias/reacción). El control positivo del kit es un ARN sintético correspondiente a las secuencias blanco virales.
- Se necesita un control de extracción (control de muestras humanas o HSC, por su sigla en inglés) para garantizar que el ARN de la muestra original se conserve bien durante la extracción y debe utilizarse al menos una vez por lote de extracción.

- Se necesita un control interno (gen de la ribonucleasa P humana) para garantizar que el ARN de la muestra original sea detectable en la reacción de PCR qRT. Se espera que se detecte en el HSC, así como en la mayoría de las muestras humanas con suficiente ARN celular. En las muestras humanas, el control interno puede no detectarse si el ARN viral del SARS-CoV-2 está presente en altas concentraciones.

Controles suministrados con el kit

Tabla 1 Control suministrado con el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Tipo de control	Nombre del control	Nombre del proveedor	N.º ref. del proveedor
Positivo	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Controles necesarios pero no suministrados con el kit

- Agua libre de nucleasas de grado molecular, que se utilizará como control «sin plantilla» (negativo)
- Control de la extracción: el cliente dispone de varias opciones basadas en las recomendaciones de los CDC
 - Control de muestras humanas, fabricado por los CDC, KT0189
 - Material de muestras humanas negativas: Los laboratorios pueden preparar un volumen de material de muestras humanas (por ejemplo, sueros humanos o muestras respiratorias negativas sobrantes combinadas) para extraerlo y analizarlo junto con las muestras clínicas como control de extracción. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para utilizarse en varias ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para garantizar que produce los resultados esperados para el HSC que se indica en estas instrucciones de uso.
 - Material de muestras humanas artificiales: Los laboratorios pueden preparar materiales de muestras humanas artificiales suspendiendo cualquier estirpe celular humana (por ejemplo, A549, Hela o 293) en PBS. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para utilizarse en varias ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para garantizar que produce los resultados esperados para el HSC que se indica en estas instrucciones de uso.

Flujo de trabajo del ensayo

Para comenzar el ensayo, extraiga el ácido nucleico de las muestras de pruebas nasofaríngeas junto con un control de muestras humanas adecuado.

A continuación, ejecute un experimento de PCR qRT múltiple utilizando las muestras de ARN extraídas y el control positivo de ARN proporcionado. Incluye un control sin plantilla (NTC).

Una vez finalizada la ejecución de la PCR qRT, analice los datos para la amplificación de las dianas virales N1 y N2 y la diana del gen de la ribonucleasa P humana.

Por último, informe de los resultados de las muestras de la prueba.

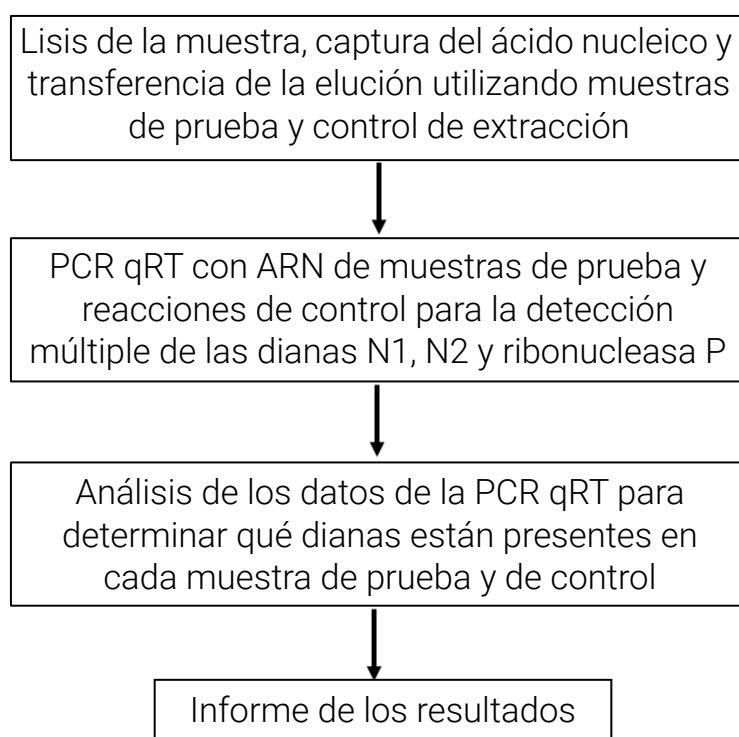


Figura 1 Flujo de trabajo del ensayo para el diagnóstico del SARS-CoV2 mediante PCR qRT

2 Materiales, seguridad y manipulación

Material suministrado	11
Reactivos, materiales, equipo y software necesarios pero no suministrados	12
Precauciones de seguridad	15
Almacenamiento y manipulación	17

Este capítulo describe los reactivos y demás materiales usados en el ensayo, y proporciona información para realizarlo con seguridad.

Material suministrado

La **Tabla 2** enumera los materiales suministrados con el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit y sus requisitos de temperatura. Consulte **“Almacenamiento y manipulación”** en la página 17 para ver las instrucciones adicionales de almacenamiento de los materiales.

Tabla 2 Materiales suministrados con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, p/n K1180A

Materiales	Cantidad	Componentes	Temperatura de almacenamiento
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, p/n K1180-64100*	Suficiente para 400 reacciones de PCR qRT (muestras para prueba y controles) <i>Tenga en cuenta que cada placa de reacción de PCR qRT debe incluir al menos 3 pocillos para las reacciones de control.</i>	2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Almacenar a –20 °C en el momento de la recepción.
		RT/RNase Block Dx	Almacenar a –20 °C en el momento de la recepción.
		Reference Dye Dx†	Almacenar a –20 °C en el momento de la recepción.
		100 mM DTT Dx	Almacenar a –20 °C en el momento de la recepción.
		10 SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx†	Almacenar a –20 °C en el momento de la recepción.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, p/n K1180-64200‡	Suficiente para 8 pruebas de ensayo	Control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 Dx	Almacenar a –80 °C en el momento de la recepción.

* SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents kit también se vende por separado como Agilent p/n K1180B.

† Este reactivo es sensible a la luz y debe mantenerse alejado de esta siempre que sea posible.

‡ El SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx también se vende por separado como Agilent p/n K1180C.

Reactivos, materiales, equipo y software necesarios pero no suministrados

La **Tabla 3** enumera las opciones para el paso de extracción de ARN del protocolo, que se realiza en un instrumento para la automatización. El procedimiento de extracción de ARN se describe en “**Instrucciones para la extracción de ácidos nucleicos**” en la página 18.

Tabla 3 Opciones de extracción de ARN: requerido pero no proporcionado

Kit de extracción de ARN	Instrumento
QIAGEN QIAasympy DSP Virus/Pathogen Midi Kit, p/n 937055	QIAGEN QIAasympy SP, p/n 9001297 (automatización)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher p/n A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, p/n 5400630 (automatización)

La **Tabla 4** enumera las opciones para el control de muestras humanas. Esta muestra de control es una preparación de cultivo de células humanas utilizada como control del procedimiento de extracción para demostrar la recuperación satisfactoria del ácido nucleico, así como la integridad del reactivo de extracción.

Tabla 4 Opciones de control de muestras humanas: obligatorio pero no proporcionado

Control de muestras humanas	Descripción
Control de muestras humanas (HSC), 10 viales × 500 µl, CDC p/n KT0189	Fabricado y vendido por los CDC. El HSC de CDC consiste en material celular humano cultivado no infeccioso (tratado con betapropiolactona) suministrado como líquido suspendido en PBS 0,01 M a pH 7,2-7,4.
Material de muestras humanas negativas	Preparado por el laboratorio. Este tipo de control de muestras humanas es un volumen de material de muestras humanas (por ejemplo, sueros humanos o muestras respiratorias negativas sobrantes combinadas) para extraerlo y analizarlo junto con las muestras clínicas como control de extracción. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para utilizarse en varias ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para garantizar que produce los resultados esperados para el HSC que se indica en estas instrucciones de uso.
Material de muestras humanas artificiales	Preparado por el laboratorio. Este tipo de control de muestras humanas es un material de muestras humanas artificiales, que se prepara suspendiendo cualquier estirpe celular humana (por ejemplo, A549, Hela o 293) en PBS. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para utilizarse en varias ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para garantizar que produce los resultados esperados para el control de muestras humanas que se indica en estas instrucciones de uso.

De la **Tabla 5** a la **Tabla 6** se indican reactivos, materiales, el equipo y el instrumento adicionales que son necesarios pero que no se suministran con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Tabla 5 Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados

Reactivo o material	Forma
Agua de grado molecular, libre de nucleasas	Reactivo
Solución de lejía al 10 % (dilución 1:10 de lejía de hipoclorito al 5,25-6 %)	Material
DNAZap, Ambion p/n AM9890, o una sustancia descontaminante equivalente	Material
RNase AWAY, Fisher Scientific p/n 21-236-21, o una sustancia descontaminante equivalente	Material
Guantes sin polvos desechables y batas quirúrgicas	Material
Puntas de pipeta de barrera de aerosol libre de nucleasas y estériles	Material
Tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml libre de nucleasas	Material
Tubos de microcentrifugadora de 2 ml libre de nucleasas	Material
Placas de 96 pocillos libres de nucleasas, 200 µl <i>Utilizar placas compatibles con el sistema de PCR en tiempo real seleccionado</i>	Material
8 tiras de tubos libres de nucleasas	Material
Sellos adhesivos para placas libres de nucleasas, u 8 tiras de tapas ópticas libres de nucleasas para placas para PCR de 96 pocillos <i>Utilizar sellos o tiras compatibles con el sistema de PCR en tiempo real seleccionado</i>	Material
Almohadillas de compresión de película óptica MicroAmp, Thermo Fisher Scientific, p/n 4312639*	Material

* Las almohadillas de compresión solo son necesarias cuando se utilizan sellos adhesivos para sellar placas para el sistema de PCR en tiempo real AriaMx/AriaDx

Tabla 6 Instrumentos, software y otros equipos necesarios pero no suministrados

Instrumento, software o equipo	Forma
<p>Sistema de PCR en tiempo real</p> <ul style="list-style-type: none"> Sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx (p/n G8830A) o Sistema de PCR en tiempo real AriaDx (p/n K8930AA) Software: Software Aria versión 1.71 o 1.8, y software de seguimiento electrónico (incluido con el p/n K8930AA o disponible por separado como p/n G5380AA) Instrumento ABI 7500 Fast Real Time PCR con ordenador portátil (p/n 4351106) o de sobremesa (p/n 4351107) Software: Software 7500 versión 2.3 y software Design & Analysis versión 2.4.3 Sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch (p/n 1855195) o Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch con Paquete inicial (p/n 1855196) Software: Software CFX Maestro 2.0 versión 4.1.2 (incluido con el p/n 1855196 o disponible por separado como p/n 12004110) 	Instrumento con ordenador y software
Software para visualizar los datos exportados desde el software de PCR en tiempo real, por ejemplo, Microsoft Excel	Software

Tabla 6 Instrumentos, software y otros equipos necesarios pero no suministrados (continued)

Instrumento, software o equipo	Forma
Mezclador con vórtex	Equipo
Microcentrifugadora	Equipo
Centrifugadora de placas para placas de 96 pocillos	Equipo
Micropipetas P10, P20, P200 y P1000	Equipo
Pipeta multicanal (5-50 µl)	Equipo
Gradillas para tubos de microcentrifugadora	Equipo
Dos (2) gradillas frías de 96 pocillos	Equipo
Cubitera de hielo	Equipo

Precauciones de seguridad

- 1 El flujo de trabajo de Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit debe llevarlo a cabo personal cualificado y formado para evitar el riesgo de resultados erróneos. Utilice áreas separadas para la preparación de las muestras de los pacientes y los controles para evitar resultados falsos positivos.
- 2 Esta prueba ha sido autorizada únicamente para la detección del ácido nucleico del SARS-CoV-2, no para otros virus o patógenos.
- 3 Lea atentamente todas las instrucciones de uso.
- 4 Las muestras y los controles deben tratarse siempre como si fueran infecciosos o de riesgo biológico, de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio. Consulte las Directrices provisionales de bioseguridad en el laboratorio para la manipulación y el procesamiento de muestras relacionadas con el 2019-nCoV.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Tome las precauciones necesarias al manipular las muestras. Utilice el equipo de protección individual (EPI) de acuerdo con las directrices vigentes para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Si se produce un derrame, desinfecte inmediatamente.
- 6 Las muestras pueden ser infecciosas. Utilice las precauciones universales cuando realice este ensayo. El director del laboratorio debe establecer los métodos adecuados de manipulación y eliminación. Solo el personal adecuadamente formado en el manejo de materiales infecciosos debe estar autorizado a realizar este procedimiento de diagnóstico.
- 7 Si se sospecha de una infección por el 2019-nCoV en base a los criterios actuales de cribado clínico recomendados por las autoridades de salud pública, las muestras deben recogerse con las precauciones adecuadas de control de la infección.
- 8 Utilice únicamente el material de laboratorio desechable suministrado o especificado.
- 9 Utilice siempre puntas de pipeta con barreras de aerosol. Las puntas que se utilicen deben ser estériles y estar libres de desoxirribonucleasas y ribonucleasas.
- 10 Los ensayos basados en la PCR son sensibles a la introducción accidental de productos de amplificación procedentes de reacciones de PCR anteriores. Cualquier contaminación de las muestras de pruebas o de los reactivos puede dar lugar a un resultado incorrecto. El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder de forma unidireccional. Utilice las siguientes prácticas óptimas para evitar que el producto de la PCR se contamine de las muestras a lo largo del flujo de trabajo:
 - Asigne estaciones de trabajo pre-PCR y pos-PCR separadas, y utilice suministros y reactivos específicos en cada área. En particular, nunca utilice materiales designados para el trabajo pos-PCR para los segmentos pre-PCR del flujo de trabajo. Utilice siempre pipetas específicas para la pre-PCR con puntas resistentes a los aerosoles libres de nucleasas para pipetear soluciones específicas para la pre-PCR.
 - Mantenga limpias las zonas de trabajo. Limpie las superficies de pre-PCR diariamente y, entre cada ensayo, con una solución de lejía al 10 % o un producto como DNAZap o RNase AWAY. Elimine los restos de lejía con etanol al 70 %.
 - Lleve una bata de laboratorio limpia y guantes sin polvos y limpios. Utilice una buena higiene de laboratorio, incluyendo el cambio de guantes después del contacto con cualquier superficie potencialmente contaminada.
 - Cambie las puntas de pipeta con barrera de aerosol entre todas las transferencias manuales de líquidos.

- Al extraer el ácido nucleico de las muestras, utilice una técnica aséptica adecuada para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y evitar la introducción inadvertida de nucleasas en estas.
 - Cuando sea posible, mantenga los tubos de reactivos y de reacción tapados o cubiertos.
- 11** No coma, beba, fume ni se aplique productos cosméticos en las zonas de trabajo.
 - 12** No se permite modificar los reactivos del ensayo, el protocolo del ensayo o la instrumentación.
 - 13** Los reactivos deben almacenarse y manipularse como se especifica en la **Tabla 2** en la página 11 y en **“Almacenamiento y manipulación”** en la página 17.
 - 14** No utilice el kit después de la fecha de caducidad indicada.
 - 15** La eliminación de residuos debe cumplir con las normativas locales, estatales y federales.
 - 16** Las fichas de datos de seguridad están disponibles en www.agilent.com.
 - 17** No utilice material que pueda contener tiocianato de guanidinio o cualquier material que contenga guanidina en el instrumento de PCR en tiempo real. Pueden formarse compuestos altamente reactivos o tóxicos si se combinan con hipoclorito de sodio (lejía).
 - 18** Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2.

Almacenamiento y manipulación

Embalaje del producto

Al recibir Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, inspeccione detenidamente la caja del producto para detectar posibles señales de daños. Si se detectan daños en la caja del producto, póngase en contacto con Soporte técnico de Agilent.

Almacenamiento, manipulación y estabilidad de los reactivos

- Compruebe siempre la fecha de caducidad antes de utilizarlos. No use reactivos caducados.
- Proteja las sondas fluorogénicas de la luz.
- Los cebadores, las sondas (incluidas las alícuotas) y la mezcla maestra de enzimas deben descongelarse y mantenerse en hielo o en una gradilla fría en todo momento durante su preparación y uso.
- Los controles deben descongelarse y mantenerse en hielo o en una gradilla fría en todo momento durante su preparación y uso.
- Consulte la **Tabla 2** en la página 11 para obtener información sobre las temperaturas de almacenamiento de los reactivos de Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras

La recogida, el almacenamiento y el transporte inadecuados y deficientes de las muestras pueden producir resultados falsos. La formación en la recogida de muestras es muy recomendable debido a la importancia de su calidad. Se puede hacer referencia a la norma CLSI MM13-A como recurso adecuado.

- Recogida de la muestra
 - Consulte las Directrices provisionales para la recogida, la manipulación y el análisis de muestras clínicas de pacientes en investigación (PUI) para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Siga las instrucciones del fabricante del dispositivo de recogida de muestras para ver los métodos de recogida adecuados.
- Transporte de muestras
 - Material clínico recogido del paciente colocado en un sistema de transporte adecuado. En el caso de Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, esto incluye muestras NP en medio de transporte viral (VTM), medio de transporte universal (UTM), solución salina, Amies líquido o medio de transporte de muestras (STM).

3 Instrucciones para la extracción de ácidos nucleicos

Extraer ácidos nucleicos 19

Este capítulo contiene instrucciones para la extracción de ARN de muestras de pruebas clínicas y del control de muestras humanas.

Extraer ácidos nucleicos

El rendimiento de Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit depende de la cantidad y la calidad del ARN mensajero purificado a partir de muestras humanas. Los siguientes kits y procedimientos de extracción de ARN disponibles en el mercado han sido calificados y validados para la recuperación y pureza del ARN para usar con el kit.

Para la extracción de la muestra deben seguirse los procedimientos recomendados por el fabricante (salvo lo indicado en las recomendaciones siguientes). El control de muestras humanas debe incluirse en cada lote de extracción.

QIAGEN QIAasympyphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, protocolo de automatización

Recomendación: Utilizar 140 µl de muestra y eluir con 60 µl de tampón.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, protocolo de automatización

Recomendación: Utilizar 200 µl de muestra y eluir con 50 µl de tampón.

4

Instrucciones para preparar las reacciones de PCR qRT

Preparar el experimento de PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real **21**

Preparar las reacciones de PCR qRT **41**

Este capítulo contiene instrucciones para la preparación de las reacciones de PCR de transcripción inversa cuantitativa (PCR qRT) para las muestras de prueba y las muestras de control.

Preparar el experimento de PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real

Antes de preparar la placa de reacción PCR qRT, configure el experimento en el sistema de PCR en tiempo real para que el instrumento esté listo para ejecutarse en cuanto se prepare la placa de reacción.

Siga las instrucciones de su sistema específico de PCR en tiempo real.

Sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx

- Consulte **“Crear y preparar el experimento AriaMx/AriaDx (necesario si aún no se ha creado una plantilla)”** en la página 21 si no tiene un archivo de plantilla con los ajustes necesarios.
- Si tiene un archivo de plantilla para utilizar, consulte **“Crear el experimento AriaMx/AriaDx a partir de la plantilla guardada”** en la página 27.

NOTA

Encienda el instrumento AriaMx o AriaDx al menos 3 horas antes de su uso. El instrumento puede dejarse encendido en todo momento para que esté siempre preparado para su uso.

Según las especificaciones del instrumento, las condiciones de funcionamiento son 20-30 °C, 20-80 % de humedad y ≤ 2000 metros de altitud.

Instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast

- Consulte **“Crear y preparar el experimento ABI 7500 Fast (necesario si aún no se ha creado una plantilla)”** en la página 27 si no tiene un archivo de plantilla con los ajustes necesarios.
- Si tiene un archivo de plantilla para utilizar, consulte **“Crear el experimento ABI 7500 Fast a partir de la plantilla guardada”** en la página 33.

Sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch

- Consulte **“Crear y preparar el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necesario si aún no se han creado los archivos de protocolo y de placa guardados)”** en la página 34 si no tiene archivos de protocolos y placas guardados con los ajustes necesarios.
- Si tiene archivos de protocolos y placas guardados, consulte **“Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados”** en la página 40.

Crear y preparar el experimento AriaMx/AriaDx (necesario si aún no se ha creado una plantilla)

Si ya existe una plantilla para el experimento, vaya a **“Crear el experimento AriaMx/AriaDx a partir de la plantilla guardada”** en la página 27.

Paso 1. Crear el experimento

- 1 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación de software Aria en la pantalla Getting Started.
- 2 En **New Experiment**, haga clic en **Experiment Types** (si no se ha seleccionado aún).
- 3 En el centro de la pantalla, seleccione **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**, como se muestra en **Figura 2**.

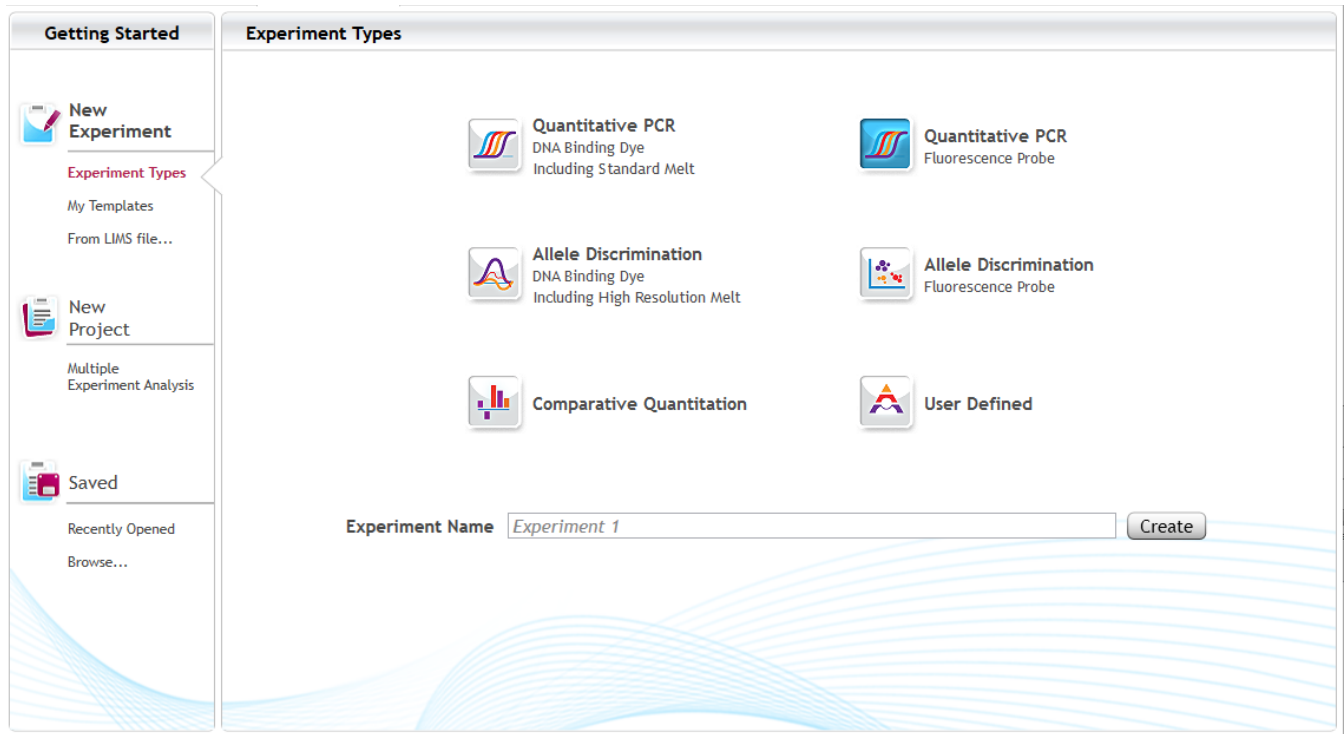


Figura 2 Pantalla Getting Started de Aria: se ha seleccionado **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**

- 4 Escriba un nombre para el experimento en el campo Experiment Name y haga clic en **Create**.

El nuevo experimento se abre en la pantalla Plate Setup. Todos los pocillos del mapa de la placa están seleccionados de forma predeterminada.

La selección de los 96 pocillos es adecuada si todos los pocillos de la placa van a incluir una reacción de PCR qRT. Si va a haber pocillos vacíos, entonces desmarque esos pocillos en este paso.

Paso 2. Asignar los tipos de pocillos y los nombres de los pocillos

- 5 En el panel Properties de la derecha de la pantalla, amplíe la lista desplegable **Well type** y seleccione **Unknown**.

Todos los pocillos están marcados como Unknown en el mapa de la placa.

- 6 Asigne el pocillo A12 como control sin plantilla (No Template Control, NTC).
 - a Haga clic en el pocillo A12 en el mapa de la placa para seleccionar ese pocillo concreto.
 - b En el panel Properties de la derecha de la pantalla, amplíe la lista desplegable **Well type** y seleccione **NTC**.

El pocillo A12 está marcado como NTC en el mapa de la placa, mientras que todos los demás pocillos siguen asignados al tipo de pocillo Unknown.

- 7 En el mapa de la placa, vuelva a seleccionar todos los pocillos.

Al hacer clic en la casilla de verificación situada en la esquina superior izquierda del mapa de la placa, se seleccionan todos los pocillos.

La configuración de la placa aparece ahora como se muestra en **Figura 3**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
D	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
E	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
F	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
G	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
H	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown

Figura 3 Asignaciones de tipos de pocillos en la pantalla Aria Plate Setup

- 8 Asigne nombres de pocillos a los pocillos de control y, si lo desea, a los pocillos utilizados para las muestras de prueba. Los nombres de los pocillos que se asignarán a los pocillos de control se muestran en **Tabla 7**. Puede asignar los nombres de los pocillos manualmente o importando una hoja de cálculo de Excel o un archivo de texto delimitado por comas que enumere las identificaciones de los pocillos junto con los nombres de los pocillos que deben asignarse.
 - Para asignar los nombres de los pocillos manualmente, cambie el ajuste Show de **Type** a **Name**. Seleccione los pocillos de la placa y, a continuación, escriba el nombre de los pocillos seleccionados en el campo Well Name.
 - Para asignar nombres de pocillos desde un archivo de Excel o de texto, haga clic con el botón derecho del ratón en el mapa de la placa y seleccione **Import Well**. En el cuadro de diálogo que se abre, seleccione el archivo de Excel o de texto. Consulte el sistema de ayuda de Aria para conocer los requisitos de formato de los archivos.

Tabla 7 Asignaciones de nombres de pocillos para los pocillos de control

ID pocillo	Nombre del pocillo
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Si tiene más de una muestra de Control de muestras humanas que debe incluirse en la placa, utilice pocillos adicionales en la columna 12 para esas reacciones y nombre los pocillos en consecuencia (por ejemplo, HSC1, HSC2, etc.).

Paso 3. Asignar colorantes y dianas

- 9 En el panel Properties, en **Add Dyes**, marque las casillas de verificación de FAM, HEX y Cy5.

En todos los pocillos del mapa de la placa aparecen puntos codificados por colores para cada uno de los colorantes marcados.

- 10 En la lista desplegable Reference Dye, seleccione **ROX**.

En todos los pocillos del mapa de la placa aparece un punto de codificado por color etiquetado como «R».

- 11 Haga clic en la punta de flecha ► junto a **Targets**.

- 12 En los campos Target Name que aparecen, escriba los nombres de las dianas según **Figura 4**.

The screenshot shows the 'Add Dyes' and 'Targets' sections of the Aria Plate Setup software. In the 'Add Dyes' section, there are checkboxes for FAM, ROX, HEX, CY5, CY3, and ATTO425. FAM, ROX, and HEX are checked. Below these is a 'Reference Dye' dropdown menu set to ROX. In the 'Targets' section, there are four rows, each with a 'Target Name' field and a colored circle icon. The first row has 'N1' and a blue circle. The second row has 'N2' and a green circle. The third row has 'RP' and a purple circle. The fourth row has an empty field and a yellow circle. There are also two more empty rows with empty fields and grey circles.

Figura 4 Asignaciones de colorantes y dianas en la pantalla Aria Plate Setup

Paso 4. Configurar el perfil térmico

- 13 En la parte izquierda de la pantalla, en **Set Up**, haga clic en **Thermal Profile**.

Se abre la pantalla Thermal Profile mostrando el perfil térmico predeterminado.

- 14 Añada un segmento RT al inicio del programa de ciclado.

- a En la pantalla, sitúe el cursor sobre el segmento de arranque en caliente. Haga clic en el icono + (como se muestra en **Figura 5**) que aparece en la parte izquierda del segmento de arranque en caliente.

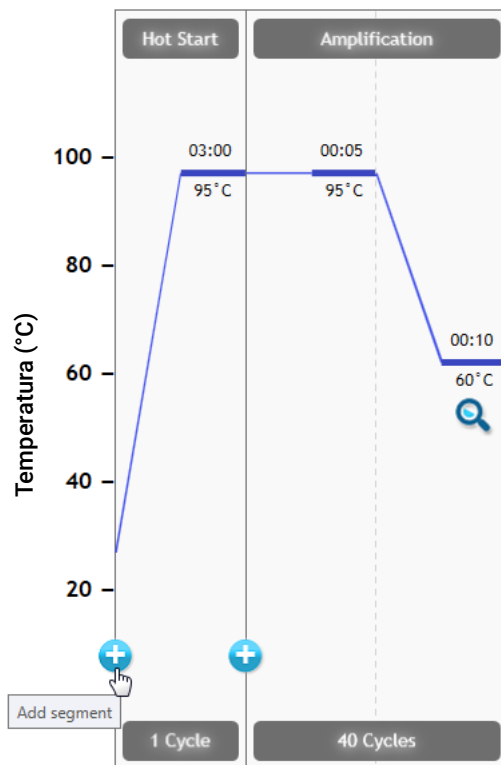


Figura 5 Añadir un nuevo segmento en la pantalla Aria Thermal Profile

El programa abre un marcador de posición para el nuevo segmento con una lista de los tipos de segmento disponibles.

- b** En el segmento del marcador de posición, haga clic en **RT**.

El perfil térmico aparece ahora como se muestra en **Figura 6**.

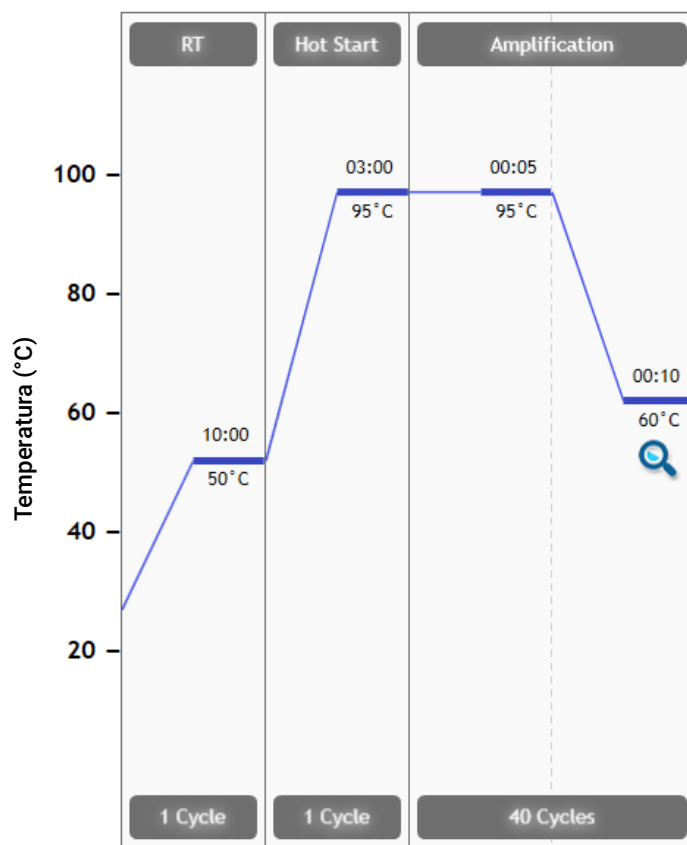


Figura 6 Perfil térmico en la pantalla Aria Thermal Profile

15 Asegúrese de que el perfil térmico de su pantalla coincida con el programa de ciclado térmico que se muestra en **Tabla 8**.

Tabla 8 Programa de ciclado térmico para el sistema de PCR en tiempo real AriaMx/AriaDx

Número de segmento	Número de ciclos	Duración	Temperatura
1	1	10 minutos	50 °C
2	1	3 minutos	95 °C
3	40	5 segundos	95 °C
		10 segundos	60 °C

Paso 5. Guardar el experimento como una plantilla

16 Haga clic en **File > Save As Template**.

Se abre el cuadro de diálogo Save As. El tipo de archivo se establece como **AriaMx Template Files** (extensión de archivo *amxt*) o **AriaDx Template Files** (extensión de archivo *adxt*).

17 Seleccione una carpeta para la nueva plantilla.

18 En el campo File name, escriba **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

19 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el nuevo archivo de plantilla en la carpeta designada.

Para futuros ensayos, utilice la plantilla guardada para crear y configurar el experimento de PCR qRT como se describe en **“Crear el experimento AriaMx/AriaDx a partir de la plantilla guardada”**.

En este momento, pase directamente a **“Preparar las reacciones de PCR qRT”** en la página 41.

Crear el experimento AriaMx/AriaDx a partir de la plantilla guardada

Si no se ha creado una plantilla del experimento con la configuración de la placa y el perfil térmico necesarios, consulte **“Crear y preparar el experimento AriaMx/AriaDx (necesario si aún no se ha creado una plantilla)”** en la página 21.

- 1 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación de software Aria en la pantalla Getting Started.
- 2 En **New Experiment**, haga clic en **My Templates**.
- 3 En el campo Experiment Name, escriba un nombre para el nuevo experimento.
- 4 Seleccione la plantilla **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** y cree el experimento.
 - Si la plantilla está en la carpeta predeterminada, haga clic directamente en la plantilla para seleccionarla y luego haga clic en **Create** (o haga doble clic directamente en la plantilla). El programa crea el nuevo experimento y abre el experimento en la pantalla Plate Setup.
 - Si la plantilla no se encuentra en la carpeta seleccionada actualmente, haga clic en el icono **Browse to Template** (mostrado a continuación) para abrir la ventana del navegador. Busque la carpeta que contiene el archivo de plantilla **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**. Seleccione el archivo y haga clic en **Open**. El programa crea el nuevo experimento y abre el experimento en la pantalla Plate Setup.



En este momento, pase directamente a **“Preparar las reacciones de PCR qRT”** en la página 41.

Crear y preparar el experimento ABI 7500 Fast (necesario si aún no se ha creado una plantilla)

Si ya existe una plantilla para el experimento, vaya a **“Crear el experimento ABI 7500 Fast a partir de la plantilla guardada”** en la página 33.

Paso 1. Crear el experimento

- 1 Encienda el instrumento ABI 7500 Fast.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación 7500 System Software.
- 3 En la pantalla de inicio, en **Set Up**, haga clic en **Advanced Setup**.

Se abrirá la pantalla Experiment.

- 4 En el **menú Experiment**, a la izquierda de la pantalla, en **Setup**, haga clic en **Experiment Properties** (si no está ya seleccionado).

Los ajustes de las propiedades del experimento se muestran en el centro de la pantalla.

- 5 Responda a las preguntas de la pantalla utilizando las selecciones y entradas que se muestran en **Tabla 9**.

Tabla 9 Ajustes de las propiedades del experimento

Pregunta	Selecciones/entradas
How do you want to identify this experiment? (¿Cómo quiere identificar este experimento?)	<ul style="list-style-type: none">Experiment Name (Nombre del experimento): escriba un nombre único para el experimentoBarcode (Código de barras): déjelo en blancoUser Name (Nombre de usuario): escriba su nombreComments (Comentarios): escriba los comentarios que desee o déjelo en blanco
Which instrument are you using to run the experiment? (¿Qué instrumento está utilizando para ejecutar el experimento?)	7500 Fast (96 pocillos)
What type of experiment do you want to set up? (¿Qué tipo de experimento quiere preparar?)	Cuantificación: curva estándar
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (¿Qué reactivos quiere utilizar para detectar la secuencia blanco?)	Reactivos TaqMan®
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (¿Qué velocidad de rampa quiere utilizar en la ejecución del instrumento?)	Rápida

Paso 2. Definir las dianas y las muestras

- 6 En el **menú Experiment**, a la izquierda de la pantalla, en **Setup**, haga clic en **Plate Setup**. Asegúrese de que la pestaña **Define Targets and Samples** esté seleccionada en la parte superior.

Las herramientas para definir las dianas y las muestras se muestran en el centro de la pantalla.

- 7 En la tabla Define Targets, cree dianas para N1, N2 y RP como se muestra en **Figura 7**. Haga clic en **Add New Target** para añadir una fila a la tabla según sea necesario.

Para la selección de **Quencher**, seleccione **NFQ-MGB** para todas las dianas. Para la selección de **Color**, utilice el color predeterminado o seleccione el que desee.




Define Targets			
<div> Add New Target Add Saved Target Save Target Delete Target </div>			
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	
N2	VIC	NFQ-MGB	
RP	CY5	NFQ-MGB	

Figura 7 Definiciones de dianas en la pantalla 7500 Software Plate Setup

- En la tabla Define Samples, cree los nombres de las muestras como se muestra en **Figura 8**. Haga clic en **Add New Sample** para añadir una fila a la tabla según sea necesario.

Las tres muestras son el control de muestras humanas (**HSC**), el control sin plantilla (**NTC**) y el control positivo (**Pos**) con el control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2. Tenga en cuenta que a las muestras de prueba no se les asigna un nombre de muestra.

Para la selección de **Color**, utilice el color predeterminado o seleccione el que desee.




Define Samples	
<div> Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample </div>	
Sample Name	Color
HSC	
NTC	
Pos	

Figura 8 Definiciones de muestras en la pantalla 7500 Software Plate Setup

Paso 3. Asignar dianas y tareas

- En la parte superior de la pantalla, haga clic en la pestaña **Assign Targets and Samples**. Asegúrese de que la pestaña **View Plate Layout** esté seleccionada.

La pantalla muestra un mapa de la placa de pocillos.

- En el mapa de la placa, seleccione todos los 96 pocillos.

Los pocillos seleccionados se resaltan en azul con un óvalo blanco en el centro.

La selección de los 96 pocillos es adecuada si todos los pocillos de la placa van a incluir una reacción de PCR qRT. Si va a haber pocillos vacíos, entonces no seleccione esos pocillos en este paso.

- En la tabla en **Assign target(s) to the selected wells**, marque las tres casillas de verificación en la columna Assign para indicar que las tres dianas serán monitorizadas y reportadas en todos los pocillos. En la columna Task, asegúrese de que la opción «U» esté seleccionada para las tres dianas. Consulte **Figura 9**.

El mapa de la placa muestra un símbolo para cada diana en todos los 96 pocillos.










Assign target(s) to the selected wells.			
Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	N1	  	
<input checked="" type="checkbox"/>	N2	  	
<input checked="" type="checkbox"/>	RP	  	

Figura 9 Asignaciones de dianas en la pestaña 7500 Software View Plate Layout

12 Cambie la tarea asignada para el pocillo de control sin plantilla.

- En el mapa de la placa, seleccione el pocillo A12.
- En la tabla en **Assign target(s) to the selected wells**, cambie la selección en la columna Task a «N» para todas las tres dianas. Asegúrese de que las casillas de verificación de la columna Assign permanezcan marcadas.

El mapa de la placa ahora aparece como se muestra en **Figura 10**.

































































































































































































































	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
B	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
C	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
D	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
E	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
F	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
G	  	  	  	  	  	  	  	  	  			
H	  	  	  	  	  	  	  	  	  			

Figura 10 Mapa de la placa en la pantalla 7500 Sistema Plate Setup

Paso 4. Asignar muestras de control

13 Asigne el control sin plantilla al pocillo A12.

- Seleccione el pocillo A12 en el mapa de la placa.
- En la tabla en **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **NTC**.

El nombre de la muestra NTC se muestra en el pocillo seleccionado.

14 Asigne la muestra del control de muestras humanas al pocillo B12.

- a** Seleccione el pocillo B12 en el mapa de la placa.

Si tiene más de una muestra de control de muestras humanas que debe incluirse en la placa, seleccione el número necesario de pocillos adicionales en la columna 12 del mapa de la placa.

- b** En la tabla en **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **HSC**.

El nombre de la muestra HSC se muestra en los pocillos seleccionados.

15 Asigne la muestra de control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 al pocillo H12.

- a** Seleccione el pocillo H12 en el mapa de la placa.

- b** En la tabla en **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **Pos**.

El nombre de muestra Pos se muestra en el pocillo seleccionado.

Paso 5. Asignar el colorante de referencia

16 En la tabla en **Select the dye to use as the passive reference**, seleccione **ROX**.

Paso 6. Configurar el método de ejecución

17 En el **menú Experiment**, a la izquierda de la pantalla, en **Setup**, haga clic en **Run Method**.

Haga clic en la pestaña **Tabular View** de la parte superior.

Las herramientas para definir el volumen de reacción y el perfil térmico se muestran en el centro de la pantalla.

18 Asegúrese de que el campo **Reaction Volume Per Well** esté ajustado a 20 µl. Si no es así, escriba **20** en el campo.

19 Ajuste el perfil térmico para que coincida con el mostrado en **Figura 11**. Los ajustes también se resumen en **Tabla 10**.

Si necesita añadir una nueva etapa de retención al principio del perfil térmico para el paso de transcripción inversa a 50 °C, siga los pasos siguientes.

- a** Seleccione la etapa más a la izquierda en la imagen del perfil térmico.

- b** Haga clic en **Add Stage > Holding**.

Se añade una nueva etapa de retención al principio del perfil térmico. Ajuste la temperatura y la duración para que coincidan con las de **Figura 11**.

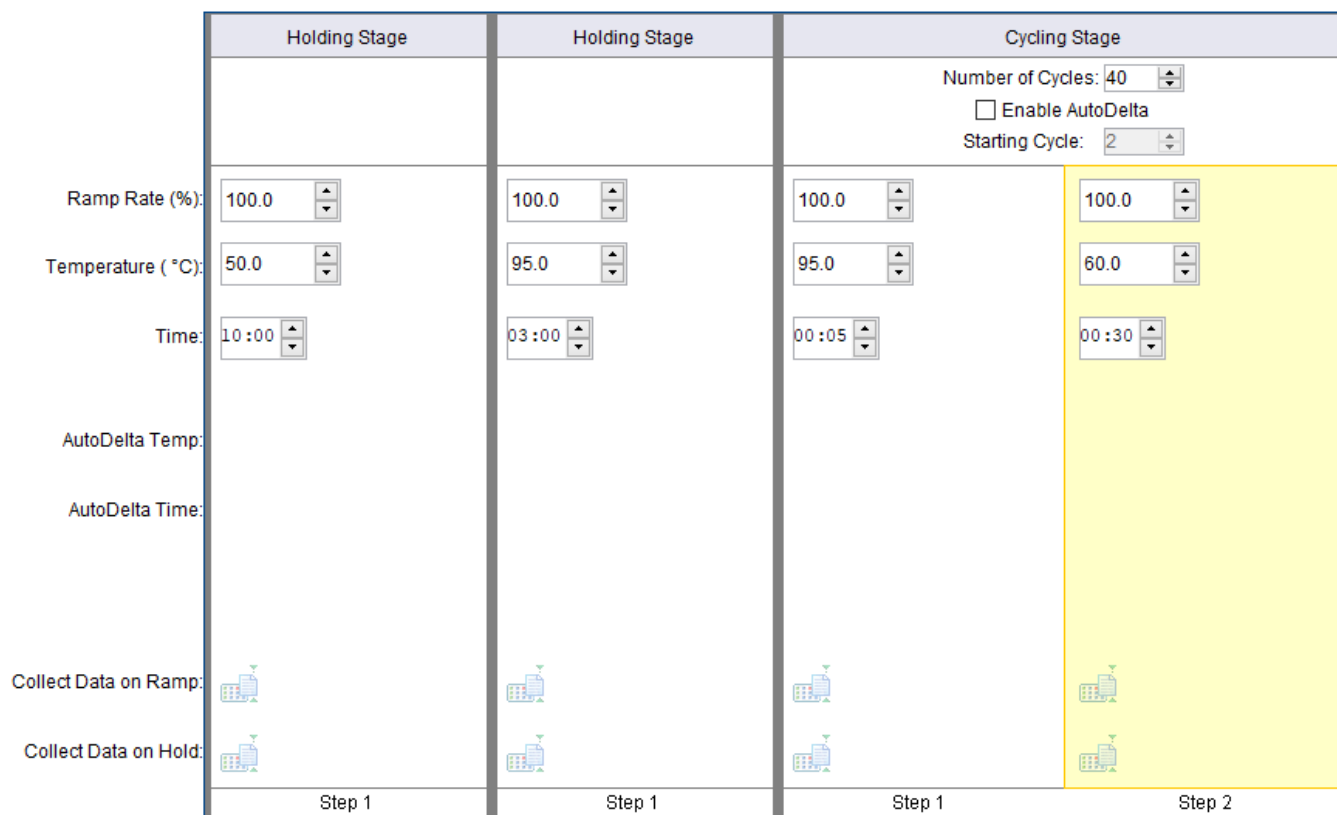


Figura 11 Perfil térmico en la pantalla 7500 Software Run Method

Tabla 10 Ajustes del perfil térmico para el instrumento 7500 Fast Real Time PCR

Número de segmento	Número de ciclos	Duración	Temperatura
1	1	10 minutos	50 °C
2	1	3 minutos	95 °C
3	40	5 segundos	95 °C
		30 segundos	60 °C

Paso 7. Guardar el experimento

20 En la parte superior de la pantalla, haga clic en la punta de la flecha hacia abajo que se encuentra junto al botón **Save** para ampliar el menú de opciones de guardado.

21 Seleccione **Save As** en el menú.

Se abre el cuadro de diálogo Save As.

22 Seleccione una carpeta para el nuevo archivo de experimento.

23 En el campo File name, escriba el nombre del experimento.

24 Asegúrese de que el tipo de archivo esté establecido en **Experiment Document Single files (*.eds)**.

25 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el archivo de experimento en la carpeta designada.

Paso 8. Guardar el experimento como una plantilla para utilizarla en el futuro

26 Haga clic en la punta de la flecha hacia abajo que se encuentra junto al botón **Save** para ampliar el menú de opciones de guardado.

27 Seleccione **Save As Template** en el menú.

Se abre el cuadro de diálogo Save As Template.

28 Seleccione una carpeta para la nueva plantilla.

29 En el campo File name, escriba **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Asegúrese de que el tipo de archivo esté establecido en **Experiment Document Template files (*.edt)**.

31 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el nuevo archivo de plantilla en la carpeta designada.

Para futuros ensayos, utilice la plantilla guardada para crear y configurar el experimento de qRT-PCR como se describe en **“Crear el experimento ABI 7500 Fast a partir de la plantilla guardada”**.

En este momento, pase directamente a **“Preparar las reacciones de PCR qRT”** en la página 41.

Crear el experimento ABI 7500 Fast a partir de la plantilla guardada

Si no se ha creado una plantilla del experimento con la configuración de la placa y el perfil térmico necesarios, consulte **“Crear y preparar el experimento ABI 7500 Fast (necesario si aún no se ha creado una plantilla)”** en la página 27.

Paso 1. Crear el experimento

1 Encienda el instrumento ABI 7500 Fast.

2 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación 7500 System Software.

3 En la pantalla de inicio, en **Set Up**, haga clic en **Template**.

Se abrirá el cuadro de diálogo Open.

4 En el cuadro de diálogo, vaya a la carpeta donde la plantilla está guardada.

5 Haga doble clic directamente en el archivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.

El instrumento se inicializa.

El 7500 System Software se abre en la pantalla Experiment mostrando la configuración de la placa.

Paso 2. Guardar el experimento

- 6 En la parte superior de la pantalla, haga clic en la punta de la flecha hacia abajo que se encuentra junto al botón **Save** para ampliar el menú de opciones de guardado.
- 7 Seleccione **Save As** en el menú.
Se abre el cuadro de diálogo Save As.
- 8 Seleccione una carpeta para el nuevo archivo de experimento.
- 9 En el campo File name, escriba el nombre del experimento.
- 10 Asegúrese de que el tipo de archivo esté establecido en **Experiment Document Single files (*.eds)**.
- 11 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el archivo de experimento en la carpeta designada.

En este momento, pase directamente a “**Preparar las reacciones de PCR qRT**” en la página 41.

Crear y preparar el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necesario si aún no se han creado los archivos de protocolo y de placa guardados)

Si ya existen los archivos de protocolo y de placa adecuados, vaya a “**Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados**” en la página 40.

Paso 1. Crear el experimento

- 1 Encienda el instrumento CFX96 Touch Real-Time PCR.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación de software Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 En el asistente de inicio, establezca la lista desplegable **Select instrument** en **CFX96** y luego haga clic en **User-defined**.

La pantalla Run Setup se abre en la pestaña Protocol. El perfil térmico predeterminado se muestra en el centro de la pantalla.

Paso 2. Configurar el perfil térmico

- 4 En la lista desplegable Express Load, seleccione **2-Step_Amp.prc1**.

El perfil térmico se actualiza con los ajustes predeterminados para un protocolo de amplificación de 2 pasos adecuado para el uso de sondas fluorescentes.

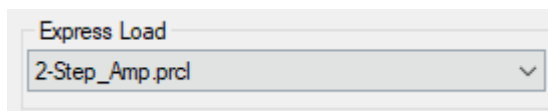


Figura 12 Express Load ajustado a **2-Step_Amp.prc1** en la pestaña CFX Maestro Protocol

5 Haga clic en **Edit Selected**.

Se abre la ventana del Protocol Editor.

6 En la ventana del Protocol Editor, añada un paso al principio del perfil térmico para la transcripción inversa.

- a Seleccione el paso 1 en la imagen del perfil térmico.
- b En la lista desplegable Insert Step, seleccione **Before**.
- c Haga clic en **Insert Step**.

Se añade un nuevo paso 1 antes del paso seleccionado.

- d Edite los ajustes para el nuevo paso a 50 °C durante 10 minutos.

7 Ajuste los demás pasos del perfil térmico para que coincidan con **Figura 13**. Los ajustes también se resumen en **Tabla 11**. Asegúrese de que el paso GOTO (paso 5) está establecido para repetirse 39 veces.

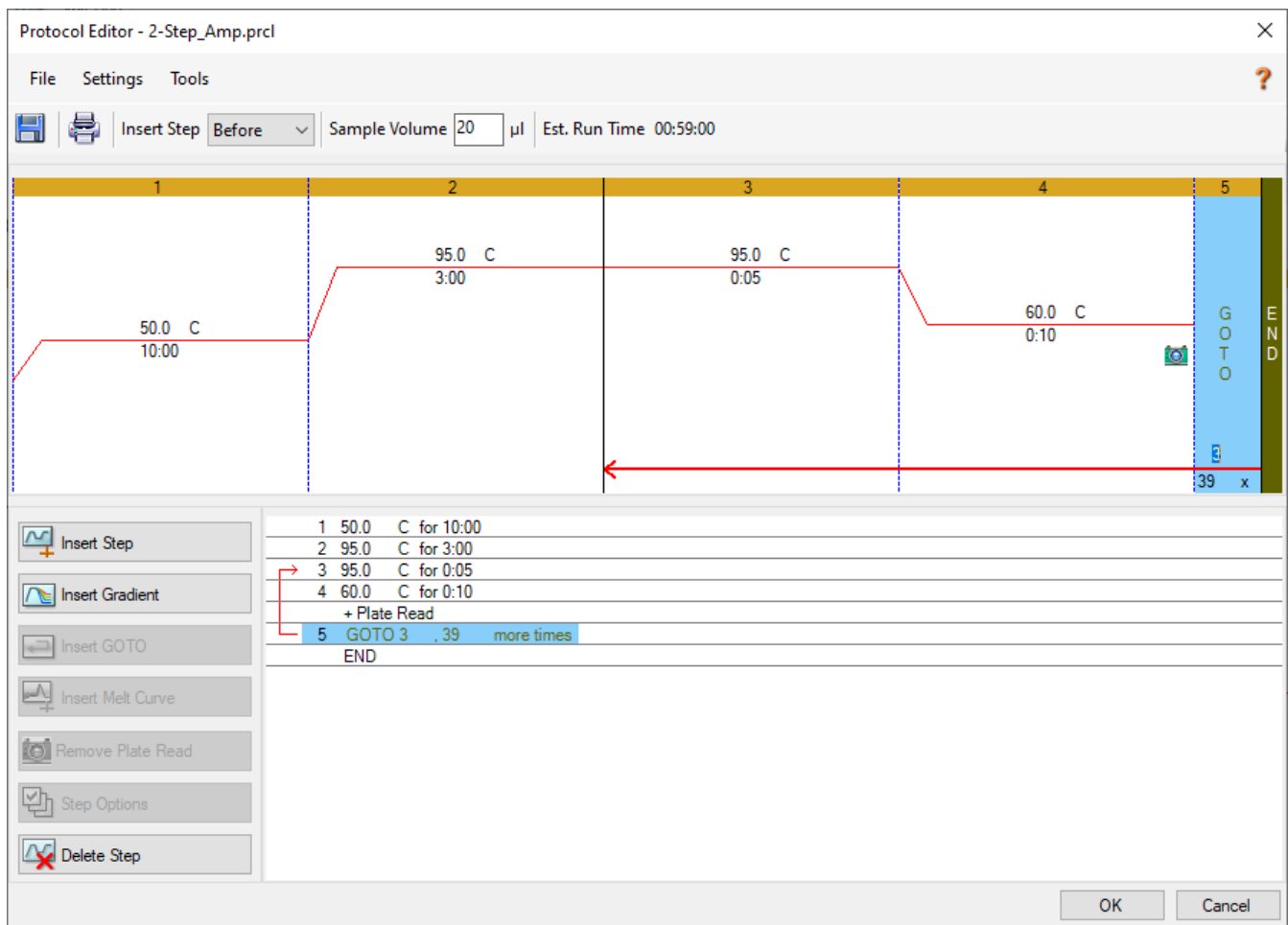


Figura 13 Perfil térmico en la ventana CFX Maestro Protocol Editor

Tabla 11 Programa de ciclado térmico para el instrumento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch

Número de segmento	Número de ciclos	Duración	Temperatura
1	1	10 minutos	50 °C
2	1	3 minutos	95 °C
3	40	5 segundos	95 °C
		10 segundos	60 °C

Paso 3. Guardar el archivo de protocolo.

- 8 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo Save as se abre y le pide que guarde el archivo de protocolo para el experimento. El archivo de protocolo contiene los ajustes de la pestaña Protocol de la pantalla Run Setup.

- 9 Seleccione una carpeta para el archivo de protocolo.

- 10 En el campo File name, escriba **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

- 11 Asegúrese de que el tipo de archivo esté establecido en **Protocol File (*.prcl)**.

- 12 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el archivo de protocolo en la carpeta designada.

- 13 Haga clic en **OK** para cerrar la ventana Protocol Editor.

Para futuros ensayos, utilice el archivo de protocolo guardado para configurar la pestaña Protocol como se describe en “**Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados**”.

Paso 4. Seleccionar los fluoróforos y asignar los nombres de dianas

- 14 En la parte inferior de la pantalla Run Setup, haga clic en **Next**.

La pantalla Run Setup se avanza a la pestaña Plate. Se muestra una imagen del mapa de la placa en el centro de la pantalla.

- 15 Asegúrese de que la lista desplegable Scan Mode esté establecida en **All Channels**.

- 16 Haga clic en **Edit Selected**.

Se abre la ventana Plate Editor.

- 17 En la ventana Plate Editor, haga clic en **Select Fluorophores**.

Se abre el cuadro de diálogo Select Fluorophores.

- 18 En el cuadro de diálogo, marque las casillas de verificación de los fluoróforos **FAM**, **HEX** y **Cy5**. Desactive las casillas de verificación de todos los demás fluoróforos. Consulte **Figura 14**.

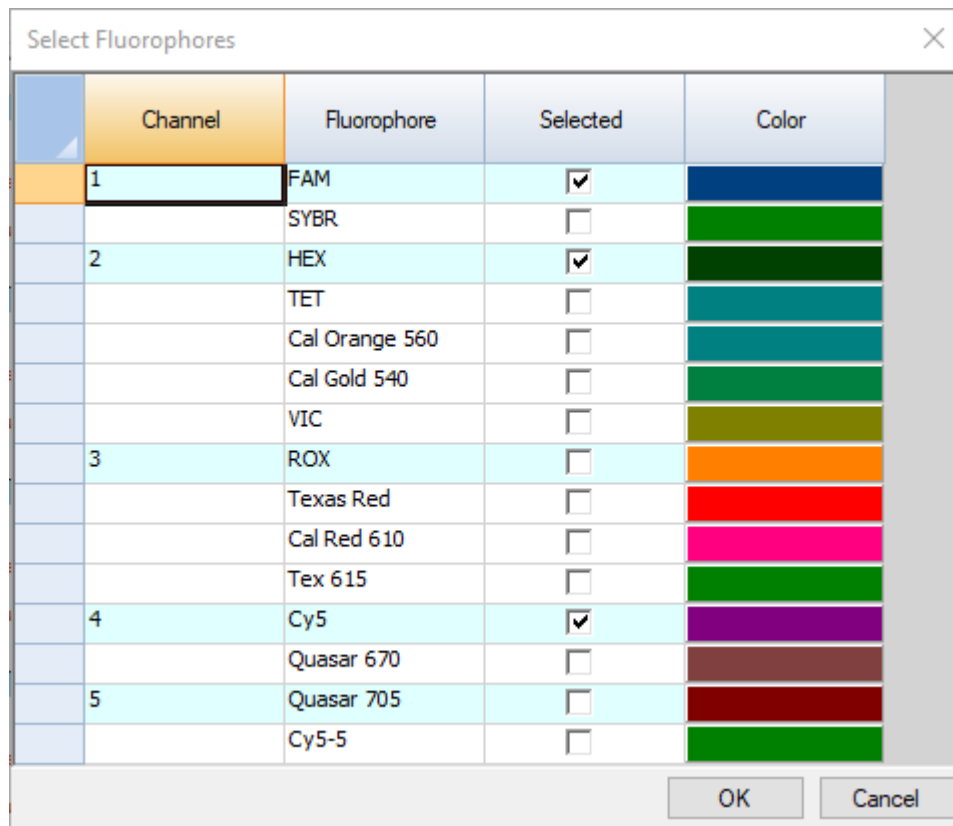


Figura 14 Selecciones de fluoróforos en el cuadro de diálogo Select Fluorophores del CFX Maestro

19 Haga clic en **OK**.

Se cierra el cuadro de diálogo Select Fluorophores. Los tres fluoróforos seleccionados se enumeran en la parte derecha de la ventana Plate Editor en **Target Names**.

20 Seleccione todos los pocillos en el mapa de la placa.

Los pocillos seleccionados están resaltados en azul.

La selección de los 96 pocillos es adecuada si todos los pocillos de la placa van a incluir una reacción de PCR qRT. Si va a haber pocillos vacíos, entonces no seleccione esos pocillos en este paso.

21 En **Target Names** asegúrese de que los tres fluoróforos estén marcados y que todos los pocillos muestren los nombres de los tres fluoróforos.

22 En los campos junto a los nombres de los fluoróforos, escriba los nombres de las dianas para los fluoróforos como se muestra en **Figura 15**. Pulse **Enter** después de escribir cada nombre para aplicar el nombre a los pocillos de la placa.

Target Names

Load ☒ FAM N1 +

Load ☒ HEX N2 +

Load ☒ Cy5 RP +

Figura 15 Asignaciones de nombres de dianas en la ventana CFX Maestro Plate Editor

Paso 5. Asignar tipos y nombres de muestras

23 Asigne el tipo de muestra de control sin plantilla.

- Seleccione el pocillo A12 en el mapa de la placa.
- En la lista desplegable Sample Type, seleccione **NTC**.

La etiqueta **NTC** se muestra en la parte superior del pozo A12.

24 Asegúrese de que los pocillos restantes se asignen al tipo de muestra Unknown, tal como indica la etiqueta **Unk** en la parte superior de los pocillos, como se muestra en **Figura 16**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

Figura 16 Asignaciones de tipos de muestras en la ventana CFX Maestro Plate Editor

25 Asigne un nombre de muestra para la muestra de control de muestras humanas en el pocillo B12.

a Seleccione el pocillo B12 en el mapa de la placa.

Si tiene más de una muestra de control de muestras humanas que debe incluirse en la placa, seleccione el número necesario de pocillos adicionales en la columna 12 del mapa de la placa.

b En el campo en **Sample Names**, escriba **HSC**, como se muestra en **Figura 17**. Pulse **Enter**.

El nombre de la muestra HSC se muestra en los pocillos seleccionados.



Figura 17 Adición del nombre de la muestra HSC en la ventana CFX Maestro Plate Editor

26 Asigne el nombre de muestra para la muestra de control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 en el pocillo H12.

a Seleccione el pocillo H12 en el mapa de la placa.

b En el campo en **Sample Names**, escriba **Pos**. Pulse **Enter**.

El nombre de muestra Pos se muestra en el pocillo H12.

Paso 6. Guardar el archivo de placa

27 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo Save as se abre y le pide que guarde el archivo de placa para el experimento. El archivo de placa contiene los ajustes de la pestaña Plate de la pantalla Run Setup.

28 Seleccione una carpeta para el archivo de placa.

29 En el campo File name, escriba el nombre **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

30 Asegúrese de que el tipo de archivo esté establecido en **Plate File (*.pltd)**.

31 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa guarda el archivo de placa en la carpeta designada.

32 Haga clic en **OK** para cerrar la ventana Plate Editor.

33 En la parte inferior de la pantalla Run Setup, haga clic en **Next**.

La pantalla Run Setup avanza a la pestaña Start Run.

Para futuros ensayos, utilice el archivo de placa guardado para configurar la pestaña Plate como se describe en **“Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados”**.

En este momento, pase directamente a **“Preparar las reacciones de PCR qRT”** en la página 41.

Crear el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de los archivos de protocolo y placas guardados

Si no se ha creado un experimento con la configuración de la placa y el perfil térmico necesarios, consulte “**Crear y preparar el experimento de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necesario si aún no se han creado los archivos de protocolo y de placa guardados)**” en la página 34.

Paso 1. Crear el experimento

- 1 Encienda el instrumento CFX96 Touch Real-Time PCR.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra la aplicación de software Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 En el asistente de inicio, establezca la lista desplegable **Select instrument** en **CFX96** y luego haga clic en **User-defined**.

La pantalla Run Setup se abre en la pestaña Protocol. El perfil térmico predeterminado se muestra en el centro de la pantalla.

Paso 2. Cargar el archivo de protocolo

- 4 Haga clic en **Select Existing**.
Se abre el cuadro de diálogo Select Protocol.
- 5 En el cuadro de diálogo, vaya a la carpeta donde el archivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl** está guardado.
- 6 Haga doble clic directamente en el archivo de protocolo.
Los ajustes del archivo de protocolo se cargan en el experimento.

Paso 3. Cargar el archivo de placa

- 7 En la parte inferior de la pantalla Run Setup, haga clic en **Next**.
La pantalla Run Setup se avanza a la pestaña Plate. Se muestra una imagen del mapa de la placa en el centro de la pantalla.
- 8 Haga clic en **Select Existing**.
Se abre el cuadro de diálogo Select Plate.
- 9 En el cuadro de diálogo, vaya a la carpeta donde el archivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd** está guardado.
- 10 Haga doble clic directamente en el archivo de placa.
Los ajustes del archivo de placa se cargan en el experimento.
- 11 En la parte inferior de la pantalla Run Setup, haga clic en **Next**.
La pantalla Run Setup avanza a la pestaña Start Run.
En este momento, pase directamente a “**Preparar las reacciones de PCR qRT**” en la página 41.

Preparar las reacciones de PCR qRT

PRECAUCIÓN

Prepare la placa de PCR qRT inmediatamente antes de usarla y manténgala en hielo o en una gradilla fría en todo momento hasta que se cargue en el instrumento de PCR en tiempo real.

Paso 1. Preparar la mezcla de reactivos de la PCR qRT y la placa en la estación de trabajo de pre-PCR

- 1 Descongele los reactivos de PCR qRT congelados. Consulte en **Tabla 12** la lista de reactivos necesarios. Mantenga el 10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx y el Reference Dye Dx protegidos de la luz.
- 2 Prepare una dilución 1:500 del Reference Dye Dx suministrado con agua libre de nucleasas (para una concentración final de 30 nM en las reacciones). Mantenga todas las soluciones que contengan el colorante de referencia protegidas de la luz.

El Reference Dye Dx diluido, si se almacena en un tubo protegido contra la luz a una temperatura de 4 °C, se puede usar el mismo día para preparar ensayos adicionales.

- 3 Prepare la mezcla de reactivos combinando los componentes de **Tabla 12** en el orden indicado. Prepare una única mezcla de reactivos para todas las muestras (3 controles y hasta 93 muestras de prueba) con múltiplos de todos los componentes enumerados a continuación. Mantenga la mezcla de reactivos en hielo y protegida de la luz. Prepare la mezcla de reactivos justo antes de su uso.
 - Si se preparan 96 reacciones, prepare la mezcla de reactivos en un tubo de 2 ml.
 - Si se preparan 48 reacciones, prepare la mezcla de reactivos en un tubo de 1,5 ml.

Para su comodidad, **Tabla 12** incluye volúmenes para la preparación de 1 reacción, 48 reacciones y 96 reacciones.

Tabla 12 Mezcla de reactivos PCR qRT

Componente	Volumen para 1 reacción	Volumen para 48 reacciones (incluido el exceso)	Volumen para 96 reacciones (incluido el exceso)
Nuclease-free water (Agua libre de nucleasas)	1,5 µl	81 µl	162 µl
2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Diluted Reference Dye Dx (de paso 2)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Mezcle suavemente la mezcla de reactivos en un mezclador con vórtex sin crear burbujas, y luego haga girar el tubo en una microcentrifugadora durante 5 segundos.

- 5 Distribuya 15 µl de mezcla de reactivos en los pocillos de la placa de 96 pocillos siguiendo el siguiente procedimiento.
 - a Coloque una tira de 8 tubos limpios en una gradilla fría de 96 pocillos.
 - b Dispense 190 µl de mezcla de reactivos (si se ejecutan 96 reacciones) o 100 µl de mezcla de reactivos (si se ejecutan 48 reacciones) en cada uno de los 8 tubos de la tira. Si es necesario, desaloje las burbujas grandes que puedan existir en el fondo de los tubos.
 - c Con una pipeta multicanal, transfiera 15 µl de mezcla de reactivos del tubo de tiras de 8 pocillos a las columnas de la placa de 96 pocillos. Mantenga la placa en hielo o en una gradilla fría de 96 pocillos, y protegida de la luz, durante todo el proceso.

NOTA

Si solo va a ejecutar 48 reacciones, deje vacías las columnas de la 1 a la 6.

- 6 Con la placa cubierta, lleve la placa a la zona de la estación de trabajo de Pre-PCR designada para la adición de muestras. Mantenga las placas en hielo o en una gradilla fría.

Paso 2. Añadir las muestras de control y de prueba a la placa de PCR qRT en la estación de trabajo de Pre-PCR (área de adición de muestras)

- 7 Diluya el control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 hasta una reserva de trabajo de 10 copias/µl.
 - a Añada 99 µl de agua libre de nucleasas a un tubo limpio de 1,5 ml. A este tubo, añada 1 µl de control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 sin diluir. Mezcle bien en un mezclador con vórtex, centrifúguelo brevemente en una microcentrifugadora.
 - b Añada 99 µl de agua libre de nucleasas a otro tubo limpio de 1,5 ml. A este tubo, añada 1 µl de control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 diluido preparado en **paso a**. Mezcle bien en un mezclador con vórtex, centrifúguelo brevemente en una microcentrifugadora.

Este tubo contiene la reserva de trabajo del control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2, con una concentración de 10 copias/µl.

La reserva de trabajo, si se ha almacenado a 4 °C, se puede usar el mismo día para preparar ensayos adicionales. Devuelva la reserva original del control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 a -80 °C.

8 Prepare las reacciones de control como se muestra en **Figura 18**.

- Para el control sin plantilla (NTC), añada 5 µl de agua libre de nucleasas al pocillo A12.
- Para el control de muestras humanas (HSC), mezcle brevemente con vórtex el ARN preparado a partir del control de muestras humanas. A continuación, añada 5 µl del ARN al pocillo B12.

Si tiene más de una muestra de HSC que debe incluirse en la placa, utilice pocillos adicionales en la columna 12 como se indica al configurar la placa en el software del instrumento de PCR qRT.

- Para el control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 (Pos), añada 5 µl del control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 diluido en el pocillo H12.

9 Prepare las reacciones para las muestras de prueba (S1 a S93) como se muestra en **Figura 18**. Cámbiese los guantes con frecuencia para evitar la contaminación.

- Vuelva a mezclar brevemente con vórtex las muestras de ARN preparadas a partir de las muestras de prueba. A continuación, centrifúguelas en una microcentrífugadora durante 5 segundos.
- Para cada muestra, añada 5 µl a un pocillo de la placa de PCR qRT. Haga un seguimiento de qué muestra se ha añadido a cada pocillo. Cambie las puntas después de cada adición.
- Si la placa PCR qRT debe sellarse con un sello adhesivo, mezcle las reacciones antes de sellarlas pipeteando brevemente las mezclas hacia arriba y hacia abajo sin crear burbujas.

NOTA

Si solo va a ejecutar 48 reacciones, deje vacíos los pocillos de la placa etiquetados de S1 a S48.

10 Selle la placa con un sello adhesivo o con tiras de tapón para tubos.

11 Si la placa está sellada con tiras de tapón para tubos, mezcle brevemente con vórtex un mezclador con vórtex. (No utilice un mezclador con vórtex para las placas selladas con sello adhesivo.)

12 Centrifugue brevemente la placa en una centrífugadora de placas.

13 Si está utilizando el sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx y ha sellado la placa con un sello adhesivo, añada una almohadilla de compresión sobre la placa.

14 Pase directamente a realizar la PCR qRT en su sistema de PCR en tiempo real.

- Consulte **"Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx"** en la página 46
- Consulte **"Llevar a cabo la PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast"** en la página 54
- Consulte **"Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch"** en la página 61

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	NTC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	HSC
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S89
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S90
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S91
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S92
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S93
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	Pos

Figura 18 Configuración de la placa para las muestras de prueba 1-93 y las muestras de control (control sin plantilla [NTC], control de muestras humanas [HSC] y control positivo de ARN sintético Dx [Pos])

5

Instrucciones para llevar a cabo la PCR qRT

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx **46**

Llevar a cabo la PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast **54**

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch **61**

Este capítulo contiene instrucciones para realizar el programa de ciclado de PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real seleccionado.

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx/AriaDx

Esta sección describe el procedimiento para llevar a cabo la PCR qRT en un sistema de PCR en tiempo real Agilent AriaMx o AriaDx.

Ejecutar el programa de PCR qRT en el sistema AriaMx/AriaDx

- 1 Asegúrese de que el instrumento AriaMx/AriaDx esté encendido.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra el experimento que creó anteriormente en la aplicación Aria.
- 3 Vaya a la pantalla Thermal Profile, a la pantalla Run Status o a la pantalla Raw Data Plots.
- 4 Haga clic en **Run**.
Se abre el cuadro de diálogo Instrument Explorer.
- 5 Localice el instrumento que va a utilizar para la ejecución y haga clic en **Send Config**.
(Consulte la Guía de configuración y del usuario de AriaMx o AriaDx para obtener instrucciones sobre cómo buscar y añadir instrumentos.)
 - Si es la primera vez que se conecta a un instrumento desde la última vez que inició el programa Aria, se abrirá el cuadro de diálogo Login. Seleccione su nombre de usuario en la lista desplegable, escriba su contraseña de inicio de sesión en el campo Password y haga clic en **Login**. Para iniciar la sesión con una cuenta de usuario diferente, haga clic con el botón derecho del ratón en el nombre del instrumento y haga clic en **Log off current user**. A continuación, puede iniciar la sesión con la cuenta de usuario deseada.
 - Si el experimento aún no está guardado, se le pedirá que lo guarde antes de continuar.
- 6 Lleve su placa de reacción al instrumento y cárguela en el bloque térmico.
- 7 En la pantalla táctil del instrumento, abra el experimento cebado en la pantalla Thermal Profile y pulse **Run Experiment**.
El instrumento comienza a ejecutar el experimento.
- 8 Vuelve al programa del PC. El programa le dirige a la pantalla de Run Status, donde puede supervisar el progreso de la ejecución.

No es necesario supervisar la ejecución. Si cierra el software Aria antes de finalizar la ejecución, anote dónde se guardará el archivo del experimento posterior a la ejecución.

Asignar ajustes de análisis de datos para el experimento AriaMx/AriaDx

Paso 1. Ver los gráficos de amplificación para todas las dianas en todos los pocillos

- 1 Una vez finalizada la ejecución, abra el archivo del experimento en el software Aria.
- 2 Haga clic en **Analysis Criteria** en la parte izquierda de la pantalla.

Se abre la pantalla Analysis Criteria, con los ajustes para especificar los ajustes del análisis.

- 3 Asegúrese de que todos los pocillos, tipos de pocillos y dianas estén seleccionados para el análisis, como se muestra en **Figura 19**.

NOTA

Si la placa contiene pocillos vacíos, asegúrese de que estén asignados al pocillo en blanco en la pestaña Plate Setup.

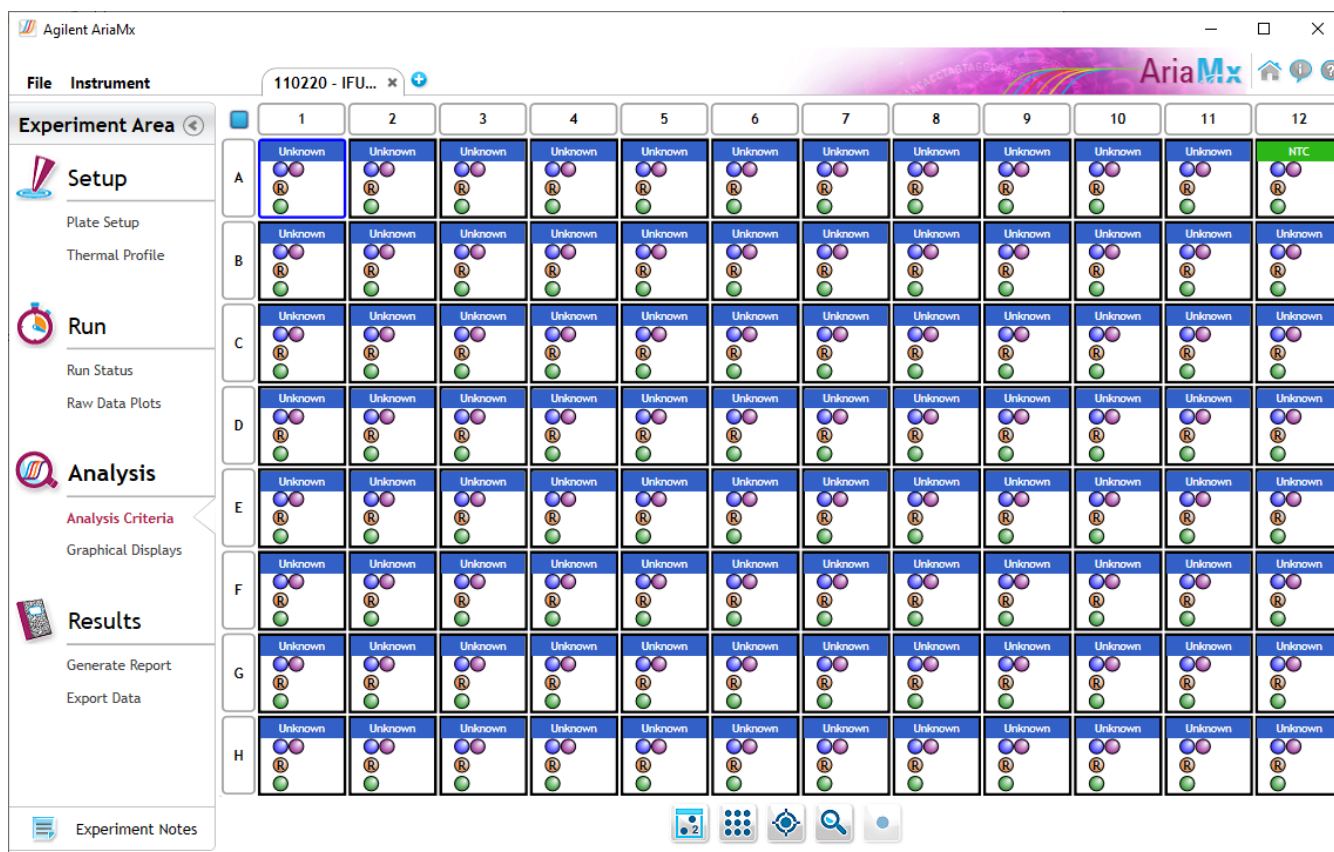


Figura 19 Pantalla Aria Analysis Criteria

- 4 Haga clic en **Graphical Displays** en la parte izquierda de la pantalla.

Se abre la pantalla Graphical Displays, que muestra los datos con herramientas para ajustar los parámetros de análisis.

- 5 Asegúrese de que la pantalla esté mostrando el gráfico Amplification Plots y que los parámetros de análisis predeterminados coincidan con los mostrados en **Figura 20**.

Si no ve el panel completo de parámetros de análisis que se muestra en **Figura 20**, haga clic en la punta de la flecha hacia abajo, justo debajo del ajuste **Smoothing**, para ampliar el panel.

Tenga en cuenta que los valores predeterminados del umbral de fluorescencia en su experimento probablemente diferirán de los mostrados en **Figura 20**. El software calcula los valores predeterminados basándose en el nivel de ruido de fluorescencia en el intervalo de ciclos de fondo. En consecuencia, los valores predeterminados variarán entre los experimentos.

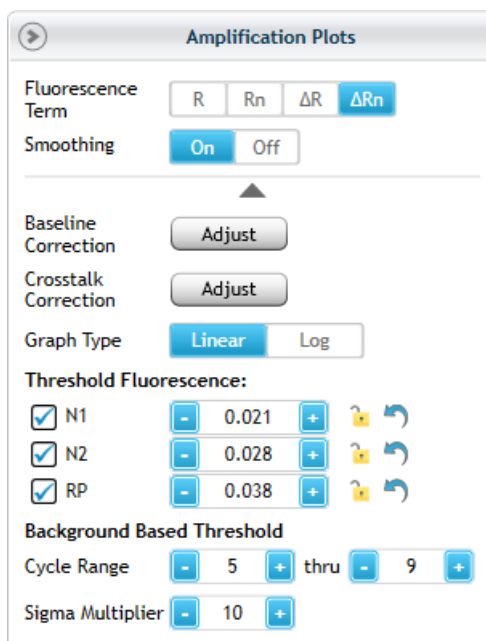


Figura 20 Ajustes predeterminados para los gráficos de amplificación en el software Aria (los valores del umbral de fluorescencia variarán entre los experimentos)

- 6 En **Background Based Threshold**, asegúrese de que el intervalo de ciclos predeterminado sea de 5 a 9.
- 7 Compruebe los gráficos de amplificación con amplificación temprana (es decir, antes del ciclo 9). Excluya del análisis cualquier muestra de prueba con amplificación temprana y vuelva a realizar la prueba con una concentración más baja.

En las muestras de prueba con concentraciones inusualmente altas de ARN vírico, la amplificación de las dianas víricas puede alcanzar niveles detectables en un número de ciclo muy temprano (< 9). Como parte de los cálculos de corrección de valores de referencia, el software puede interpretar esas señales de amplificación temprana como ruido de fondo y no asignar un valor Cq a las dianas víricas en esas muestras.

Supervise la presencia de estas muestras de prueba viendo los gráficos de amplificación sin corrección de valores de referencia (término de fluorescencia R o Rn). Si alguna de las muestras de prueba muestra signos de amplificación antes del ciclo 9, elimine esos pocillos del análisis deseleccionándolos en la pantalla Analysis Criteria. Vuelva a ejecutar la reacción de PCR qRT para la muestra diluyendo el ácido nucleico 1:100 con el tampón de elución adecuado.

Paso 2. Evaluar los valores umbral

- 8 En el ajuste Graph Type, cambie la selección de **Linear** a **Log**. Asegúrese de que el término de fluorescencia esté ajustado a ΔRn .

La visualización de los gráficos de amplificación en valores logarítmicos proporciona una mejor visión del ruido de fondo de la señal. Un ejemplo se muestra en **Figura 21**. La línea de umbral para cada diana se muestra como una línea horizontal.

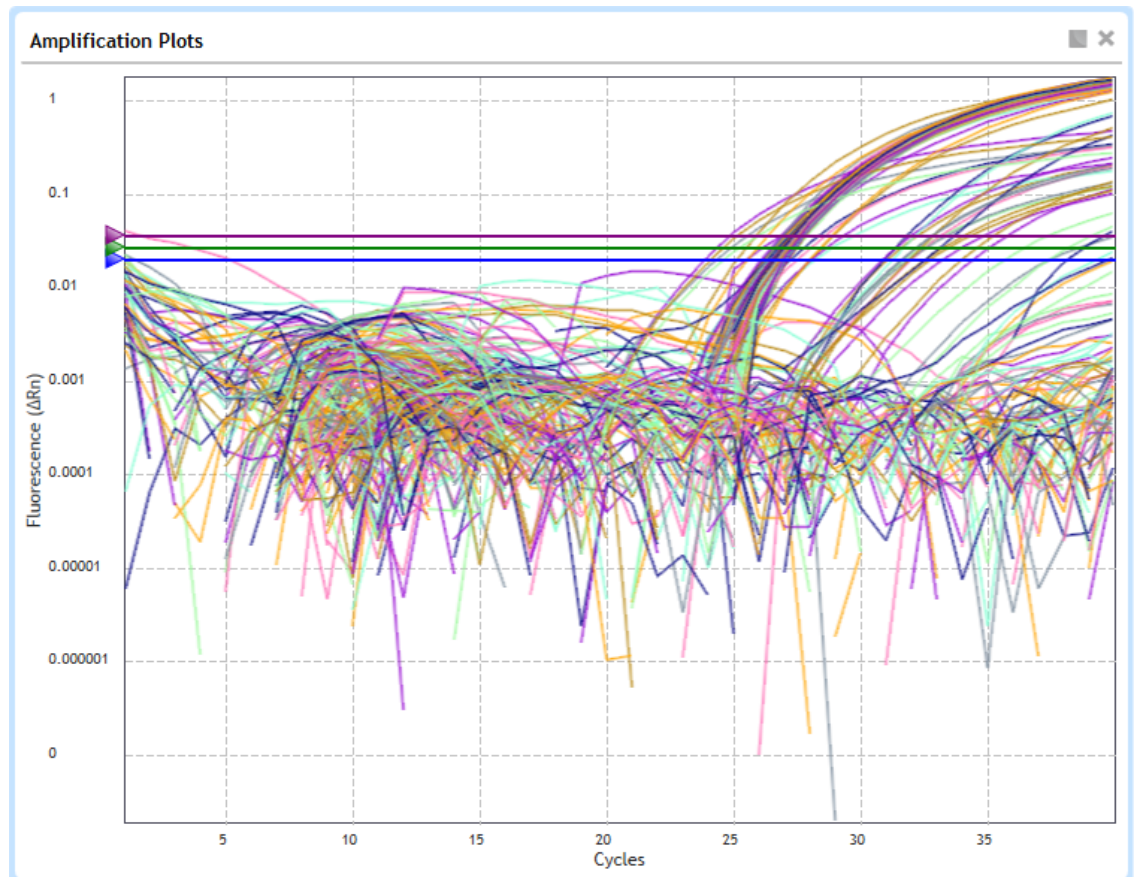




Figura 21 Gráficos de amplificación de Aria en escala logarítmica: los umbrales diana se muestran como líneas horizontales

- 9 Evalúe visualmente los gráficos de amplificación y el umbral predeterminado para la diana N1.
- Haga clic en el icono de visualización de dianas situado debajo del gráfico. 
 - En el menú que se abre, desactive las casillas de todas las demás dianas para que solo se muestre la diana N1 en el gráfico Amplification Plots.
 - Determine si el umbral es lo suficientemente alto como para estar por encima del ruido de fondo y lo suficientemente bajo como para incluir gráficos en la fase de amplificación exponencial (consulte **Figura 23**). A partir de esta determinación, proceda como se indica en **Tabla 13**.
- 10 Repita **paso 9** para la diana N2 y de nuevo para la diana RP.
- 11 En **Threshold Fluorescence**, asegúrese de que las tres dianas estén marcadas y que los tres valores del umbral de fluorescencia estén bloqueados, como se muestra en **Figura 22**.

12 Haga clic en el icono de visualización de dianas situado debajo del gráfico.  Asegúrese de que todas las dianas estén seleccionadas.

Threshold Fluorescence:







<input checked="" type="checkbox"/> N1	-	0.021	+		
<input checked="" type="checkbox"/> N2	-	0.028	+		
<input checked="" type="checkbox"/> RP	-	0.038	+		

Figura 22 Dianas seleccionadas y valores del umbral de fluorescencia bloqueados

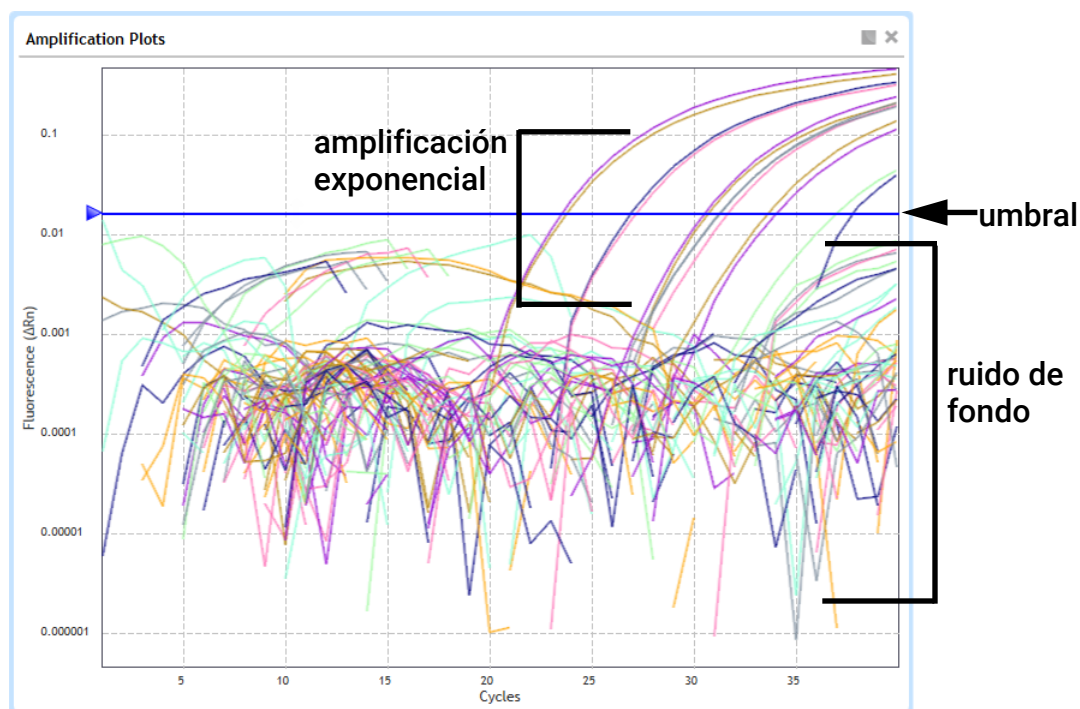


Figura 23 Gráficos de amplificación de Aria para la diana N1

Tabla 13 Verificación del ajuste óptimo del umbral en el software Aria

Posición del umbral	Descripción	Acción
Optimal position (Posición óptima)	Por encima del ruido de fondo e incluye todos los gráficos en fase de amplificación exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Bloquee el valor Threshold Fluorescence en la parte derecha de la pantalla haciendo clic en el icono de bloqueo. <p>Cuando el valor está bloqueado, el icono del candado está en posición cerrada. El bloqueo del valor impide que este cambie si se modifica alguno de los criterios de análisis.</p>
Too high (Demasiado alto)	Algunos gráficos en la fase de amplificación exponencial no pasan el umbral	<ul style="list-style-type: none"> Busque pocillos con un ruido de fondo excepcionalmente alto. Estos pocillos atípicos pueden hacer que el software fije el umbral demasiado alto. Vuelva a la pantalla Analysis Criteria para excluir ese pocillo del análisis. El software volverá a calcular el umbral una vez excluido el pocillo atípico. Alternativamente, utilice el ratón para arrastrar manualmente la línea de umbral en el gráfico a una nueva posición. Verifique que el nuevo umbral esté en una posición óptima y bloquee el valor Threshold Fluorescence como se ha descrito anteriormente. Una vez bloqueado el nuevo valor, vuelva a la pantalla Analysis Criteria para volver a incluir el pocillo atípico en el análisis.* <p>* Si el gráfico de amplificación del pocillo atípico no muestra una amplificación exponencial en ningún número de ciclo, asegúrese de que el umbral reducido no haga que el software asigne un valor Cq al pocillo (debido al ruido de fondo de la señal que cruza el umbral). Si lo hace, intente modificar otros ajustes de análisis para ese pocillo, por ejemplo, adaptando el ajuste Baseline Correction.</p>
Too low (Demasiado bajo)	Algunos gráficos no están por encima del ruido de fondo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente el umbral justo por encima del nivel de ruido de fondo.

Paso 3. Verificar los resultados en el pocillo NTC

13 En la tabla Results, localice la reacción de control sin plantilla (NTC), situada en el pocillo A12.

14 Asegúrese de que la columna Cq para las tres dianas diga «No Cq» o tenga un valor $Cq > 37,00$.

Si la reacción NTC tiene un valor $Cq \leq 37,00$ para cualquiera de las dianas, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Invalide la ejecución y repita el ensayo respetando estrictamente las pautas.

Exportar los datos del software Aria

Paso 1. Definir y guardar los ajustes de exportación

Si los ajustes de exportación ya se han guardado, vaya directamente a **“Paso 2. Exportar los datos”** en la página 53.

1 En la parte izquierda de la pantalla, en **Results**, haga clic en **Export Data**.

Se abre la pantalla Export Data.

2 En el panel Export Configuration, seleccione un tipo de archivo para los datos exportados, por ejemplo, **Excel**.

- 3 En **Items**, asegúrese de que la casilla de verificación **Tabular Results** esté marcada. Desactive las casillas de verificación de todos los demás elementos. Consulte **Figura 24**.

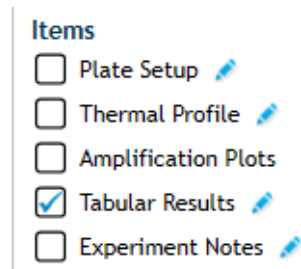
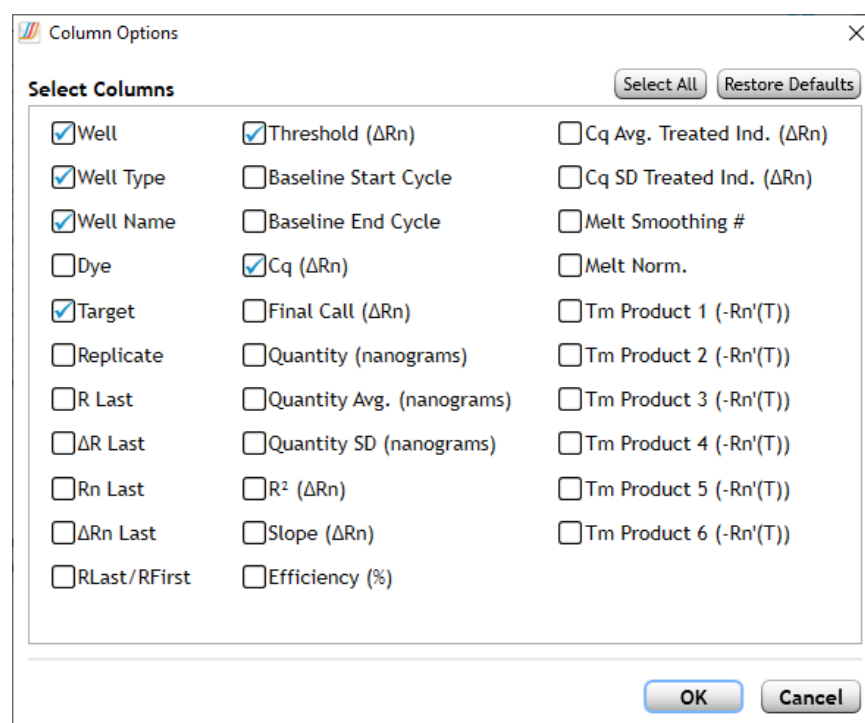


Figura 24 Pantalla Export Data del software Aria: elementos para exportar

- 4 Haga clic en el icono del lápiz junto a **Tabular Results** para personalizar las columnas de datos que se incluirán.

Se abre el cuadro de diálogo Column Options.

- 5 Adapte los ajustes para que las únicas columnas marcadas para su inclusión sean las que se muestran en **Figura 25**.



Columnas
marcadas:

Well (Pocillo)

Well Type (Tipo de pocillo)

Well Name
(Nombre del pocillo)

Target (Diana)

Threshold
(Umbral)

Cq (Cq)

Figura 25 Cuadro de diálogo Column Options de Aria

- 6 Haga clic en **OK** para guardar los cambios y cerrar el cuadro de diálogo.
- 7 Guarde los ajustes de exportación como una nueva definición.
 - a En el panel Export Configuration, amplíe la lista desplegable Definition.
 - b Haga clic en **Add New**.

Se abre el cuadro de diálogo Add New Definition.

- c En el campo Definition Name, escriba **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Consulte **Figura 26**.
- d Asegúrese de que la casilla de verificación Use Current Settings esté marcada.
- e Haga clic en **Add**.

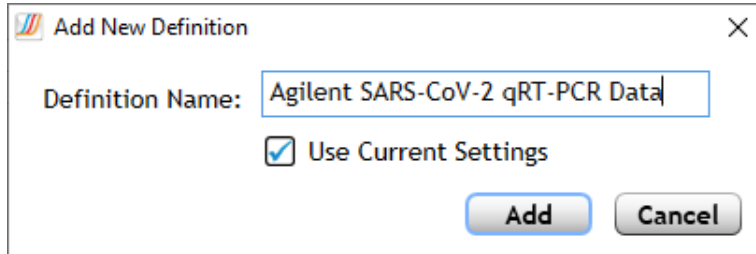


Figura 26 Cuadro de diálogo Add New Definition de Aria

Paso 2. Exportar los datos

- 8 En el panel Export Configuration, asegúrese de que la lista desplegable Definition esté establecida en **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Haga clic en **Export Data**.
El informe se abre en la aplicación predeterminada para el tipo de archivo seleccionado.
- 10 Revise los datos Cq de cada una de las muestras de prueba y de los controles para interpretar los resultados. Consulte [Capítulo 6](#), "Análisis y resultados".

Llevar a cabo la PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast

Esta sección describe el procedimiento para llevar a cabo la PCR qRT en un Instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast.

Ejecutar el programa PCR qRT en el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast

- 1 Asegúrese de que el instrumento ABI 7500 Fast esté encendido.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra el experimento que creó anteriormente en el software 7500.
- 3 En el instrumento, empuje la puerta de la bandeja para abrir la tapa. Cargue la placa de reacción en el bloque térmico del instrumento.
- 4 Empuje la puerta de la bandeja para cerrar la tapa.
- 5 En el PC, haga clic en **START RUN**.

El instrumento comienza a ejecutar el experimento.

Asignar ajustes de análisis de datos para el experimento ABI 7500 Fast

Paso 1. Ver los gráficos de amplificación para todas las dianas en todos los pocillos

- 1 Una vez finalizada la ejecución, abra el experimento en la aplicación del software Design & Analysis.
- 2 En la parte superior de la pantalla, haga clic en la pestaña Quality Check, si no está seleccionada. En la lista desplegable, asegúrese de que **Amplification Plot** está seleccionado.

La pantalla muestra los gráficos de amplificación, una tabla de los resultados en cada pocillo y un diagrama del mapa de la placa.

NOTA

Si la placa contiene pocillos vacíos, omita todas las dianas de esos pocillos del análisis y vuelva a analizarlos.

- 3 Haga clic en **Actions > Primary Analysis Setting**.

Se abre el cuadro de diálogo Primary Analysis Settings. Los ajustes predeterminados de este cuadro de diálogo se muestran en **Figura 27**.

- 4 Asegúrese de que los ajustes coincidan con los mostrados en **Figura 27**. Si es necesario, haga clic en **Reset to Default**.

Primary Analysis Setting ✕

General Well Cq QC Alerts

PCR Stage/Step: Stage 3, Step 2 Algorithm Settings: Baseline Threshold

Target	Use Default	Auto Threshold	Threshold	Auto Baseline	Baseline Start	Baseline End
Default Setting		<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
N1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
N2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
RP	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO

Reset to Default Cancel Save

Figura 27 Ajustes predeterminados en el cuadro de diálogo Design & Analysis Primary Analysis Setting

5 Haga clic en **Save**.

Se cierra el cuadro de diálogo Primary Analysis Settings.

6 Asegúrese de que el botón Analyze tenga una marca de verificación verde en la esquina. Si no es así, haga clic en **Analyze**.

7 Compruebe los gráficos de amplificación con amplificación temprana (es decir, antes del ciclo 9). Omita del análisis cualquier muestra de prueba con amplificación temprana y vuelva a realizar la prueba con una concentración más baja.

En las muestras de prueba con concentraciones inusualmente altas de ARN vírico, la amplificación de las dianas víricas puede alcanzar niveles detectables en un número de ciclo muy temprano (< 9). Como parte de los cálculos de corrección de valores de referencia, el software puede interpretar esas señales de amplificación temprana como ruido de fondo y no asignar un valor Cq a las dianas víricas en esas muestras.

Supervise la presencia de estas muestras de prueba viendo los gráficos de amplificación sin corrección de valores de referencia (establezca el **Y Value** a **Rn**). Si alguna de las muestras de prueba muestra signos de amplificación antes del ciclo 9, elimine esos pocillos del análisis omitiéndolos en la pantalla Quality Check. Vuelva a ejecutar la reacción de PCR qRT para la muestra diluyendo el ácido nucleico 1:100 con el tampón de elución adecuado.

Paso 2. Evaluar los valores umbral

8 Haga clic en el icono Settings que se encuentra justo encima del gráfico Amplification Plot

El cuadro de diálogo Settings se abre en la pestaña General.

9 Asegúrese de que el ajuste Y Value esté establecido a **ΔRn**.

10 En la lista desplegable Y Scale, cambie la selección de **Linear** a **Log**, como se muestra en **Figura 28**.

La visualización de los gráficos de amplificación en valores logarítmicos proporciona una mejor visión del ruido de fondo de la señal. Un ejemplo se muestra en **Figura 29**. La línea de umbral para cada diana se muestra como una línea horizontal.

General X Axis Y Axis

Plot Title Amplification Plot

Color By Target

Y Value ☒ ΔRn ☐ Rn

Y Scale Log

Show ☒ Legend ☐ Cq Mark
☐ Unselected ☐ Tooltip
☐ Replicates of selected
☒ Threshold ☐ Baseline

[Reset Setting](#)

Figura 28 Ajustes generales de Design & Analysis para el gráfico de amplificación

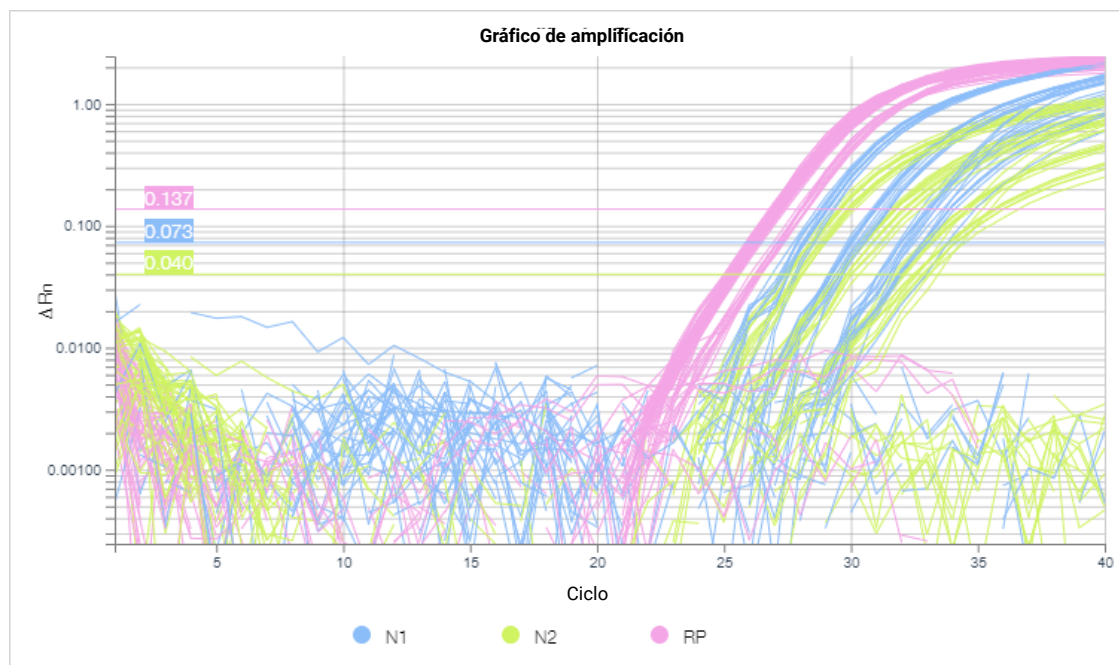


Figura 29 Gráficos de amplificación de Design & Analysis en escala logarítmica: los umbrales diana se muestran como líneas horizontales

- 11 Evalúe visualmente los gráficos de amplificación y el umbral predeterminado para la diana N1.
 - a En la parte izquierda de la pantalla, amplíe la lista desplegable Targets.
 - b Seleccione solo la diana N1 y luego contraiga la lista desplegable.
 - c Determine si el umbral es lo suficientemente alto como para estar por encima del ruido de fondo y lo suficientemente bajo como para incluir gráficos en la fase de amplificación exponencial (consulte **Figura 30**). A partir de esta determinación, proceda como se indica en **Tabla 14**.
- 12 Repita **paso 11** para la diana N2 y de nuevo para la diana RP.
- 13 En la parte izquierda de la pantalla, en **Targets**, haga clic en **Clear all** para eliminar el filtrado por diana.

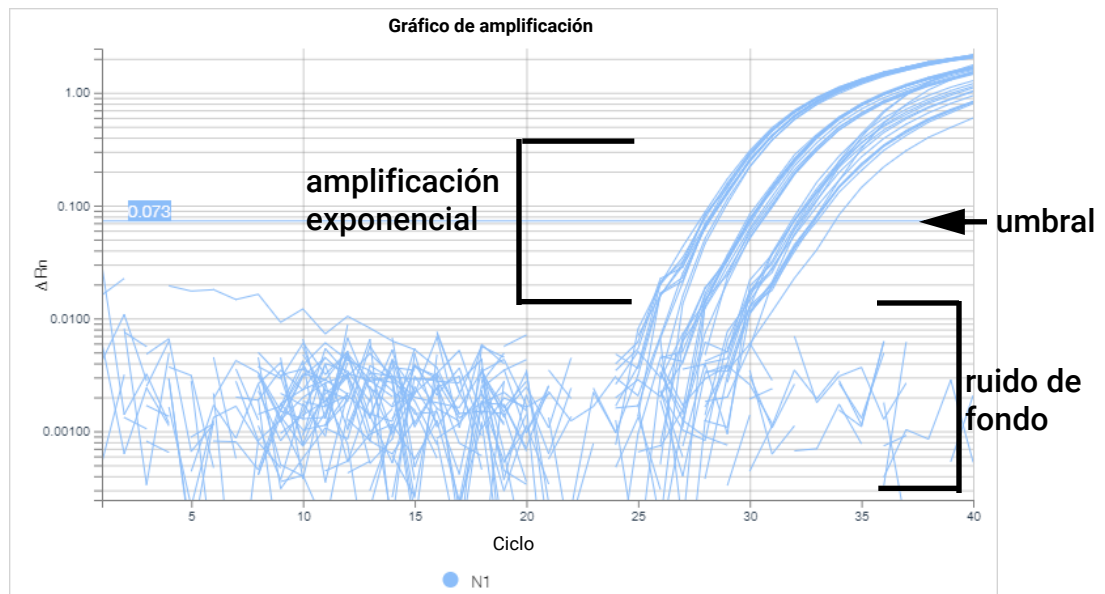


Figura 30 Gráficos de amplificación de Design & Analysis para la diana N1

Tabla 14 Verificación del ajuste óptimo del umbral en el software Design & Analysis

Posición del umbral	Descripción	Acción
Optimal position (Posición óptima)	Por encima del ruido de fondo e incluye todos los gráficos en fase de amplificación exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Deje los umbrales en sus valores actuales.
Too high (Demasiado alto)	Algunos gráficos en la fase de amplificación exponencial no pasan el umbral	<ul style="list-style-type: none"> Busque pocillos con un ruido de fondo excepcionalmente alto. Estos pocillos atípicos pueden hacer que el software fije el umbral demasiado alto. Seleccione el pocillo atípico en el mapa de la placa. En la barra de herramientas situada justo encima del mapa de la placa, haga clic en el botón con tres puntos. En el menú que se abre, haga clic en Omit Wells. Haga clic en Analyze. El software volverá a calcular el umbral una vez excluido el pocillo atípico. Alternativamente, utilice el ratón para arrastrar manualmente la línea de umbral en el gráfico a una nueva posición. Seleccione todos los pocillos en el mapa de la placa para ver todos los gráficos de amplificación. Verifique que el nuevo umbral esté en una posición óptima. Vuelva a pulsar el botón con tres puntos. En el menú que se abre, haga clic en Unomit Wells para volver a incluir el pocillo atípico en el análisis.* <p>* Si el gráfico de amplificación del pocillo atípico no muestra una amplificación exponencial en ningún número de ciclo, asegúrese de que el umbral reducido no haga que el software asigne un valor Cq al pocillo (debido al ruido de fondo de la señal que cruza el umbral). Si lo hace, intente modificar otros ajustes de análisis para ese pocillo, por ejemplo, ajustando los números de ciclo Baseline Start o Baseline End.</p>
Too low (Demasiado bajo)	Algunos gráficos no están por encima del ruido de fondo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente el umbral justo por encima del nivel de ruido de fondo.

Paso 3. Verificar los resultados en el pocillo NTC

14 En la tabla Well, localice la reacción de control sin plantilla (NTC), situada en el pocillo A12.

15 Asegúrese de que la columna Cq para las tres dianas diga «Undetermined» o tenga un valor Cq > 37,00.

Si la reacción NTC tiene un valor $Cq \leq 37,00$ para cualquiera de las dianas, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Invalide la ejecución y repita el ensayo respetando estrictamente las pautas.

Exportar los datos de la tabla Well del software Design & Analysis a un archivo CSV

Paso 1. Personalizar las columnas incluidas en la tabla Well

- 1 En la barra de herramientas situada inmediatamente encima de la tabla Well, haga clic en **View**.

Se abre un menú, como el que se muestra en **Figura 31**, con una lista de todas las columnas de la tabla disponibles.

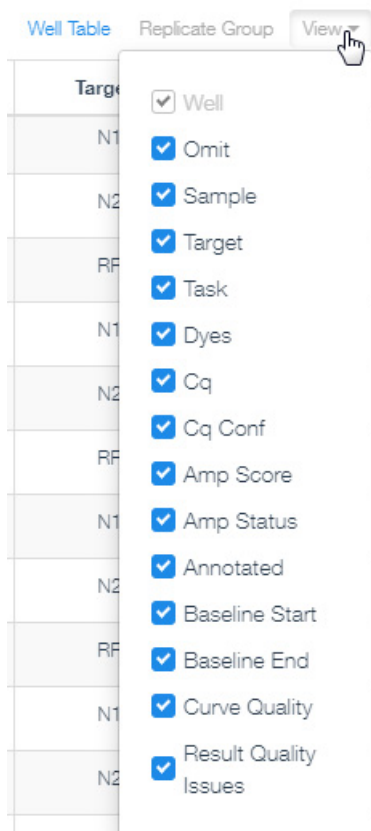
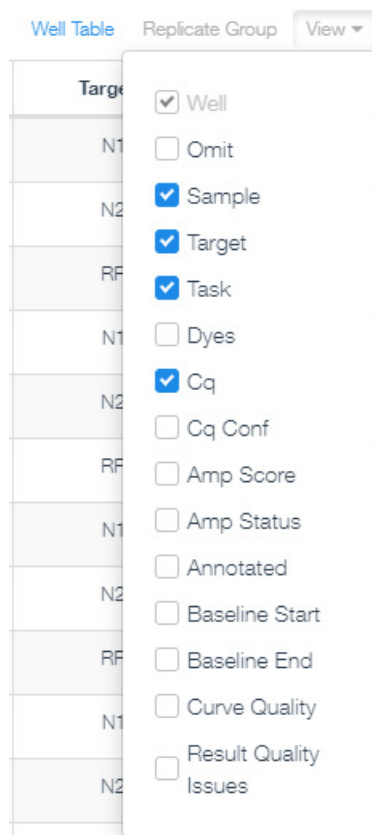


Figura 31 Menú View de la tabla Well de Design & Analysis: selección de columnas predeterminadas

- 2 Adapte los ajustes para que las únicas columnas marcadas para su inclusión sean Well, Sample, Target, Task y Cq. Consulte **Figura 32**.



Columnas marcadas:

Sample (Muestra)

Target (Diana)

Task (Tarea)

Cq (Cq)

Figura 32 Menú View de la tabla Well de Design & Analysis: selección de columnas personalizadas

3 Haga clic en **View** para contraer el menú.

Paso 2. Exportar los datos

4 En la barra de herramientas situada justo encima de la tabla Well, haga clic en el botón de la barra de herramientas con tres puntos. ...

5 En el menú que se abre, haga clic en **Export**.

Se abre un cuadro de diálogo para guardar el archivo CSV.

6 Seleccione una carpeta para el archivo.

7 En el campo File name, escriba un nombre para el archivo.

8 Haga clic en **Save**.

El cuadro de diálogo se cierra y el programa exporta los datos al tipo de archivo CSV y lo guarda en la carpeta designada.

9 Abra el archivo y revise los datos Cq de cada una de las muestras de prueba y de los controles para interpretar los resultados. Consulte [Capítulo 6](#), "Análisis y resultados".

Llevar a cabo la PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch

Esta sección describe el procedimiento para llevar a cabo la PCR qRT en un sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch.

Ejecutar el programa de PCR qRT en el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch

- 1 Asegúrese de que el instrumento CFX96 Touch esté encendido.
- 2 Desde el PC conectado al instrumento, abra el experimento que creó anteriormente en la aplicación de software CFX Maestro.
- 3 Vaya a la pestaña Start Run de la pantalla Run Setup.
Si el instrumento está encendido pero no aparece en **Block Name**, haga clic en **Detect Instrument(s)** en la esquina superior izquierda de la pantalla.
- 4 En la tabla, seleccione el instrumento que se utilizará para ejecutar el experimento.
- 5 Haga clic en **Open Lid**.
La tapa del instrumento se abre.
- 6 Cargue la placa de reacción en el bloque térmico del instrumento.
- 7 En el PC, haga clic en **Close Lid**.
La tapa del instrumento se cierra.
- 8 Haga clic en **Start Run**.
- 9 Guarde el archivo de ejecución en la carpeta deseada. Introduzca un nombre de archivo y haga clic en **Save**.
El instrumento comienza a ejecutar el experimento.

Asignar los ajustes de análisis de datos para el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch

Paso 1. Ver los gráficos de amplificación para todas las dianas en todos los pocillos

- 1 Una vez finalizada la ejecución, abra el experimento en la aplicación de software CFX Maestro.
El experimento se abre en la ventana Data Analysis.
- 2 En la parte superior de la pantalla, haga clic en la pestaña Quantification, si no está seleccionada.
La ventana muestra los gráficos de amplificación, una tabla de los resultados en cada pocillo y un diagrama del mapa de la placa.

3 Aplique la función Fluorescence Drift Correction.

- En la parte superior de la ventana Data Analysis, haga clic en **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

El software corrige automáticamente cualquier desviación de la señal de fluorescencia que pueda estar presente en el intervalo del ciclo de valores de referencia.

4 Compruebe los gráficos de amplificación con amplificación temprana (es decir, antes del ciclo 9). Excluya del análisis cualquier muestra de prueba con amplificación temprana y vuelva a realizar la prueba con una concentración más baja.

En las muestras de prueba con concentraciones inusualmente altas de ARN vírico, la amplificación de las dianas víricas puede alcanzar niveles detectables en un número de ciclo muy temprano (<9). Como parte de los cálculos de corrección de valores de referencia, el software puede interpretar esas señales de amplificación temprana como ruido de fondo y no asignar un valor C_q a las dianas víricas en esas muestras.

Supervise la presencia de estas muestras de prueba viendo los gráficos de amplificación sin corrección de los valores de referencia (establezca **Baseline Setting** a **No Baseline Subtraction**). Si alguna de las muestras de prueba muestra signos de amplificación antes del ciclo 9, elimine esos pocillos del análisis de la ventana Plate Editor. Vuelva a ejecutar la reacción de qRT-PCR para la muestra diluyendo el ácido nucleico 1:100 con el tampón de elución adecuado.

Paso 2. Evaluar los valores umbral

5 Compruebe la selección en **Settings > Baseline Setting** para asegurarse de que está ajustada a **Baseline Subtracted Curve Fit**.


6 Haga clic con el botón derecho del ratón en el gráfico Amplification y seleccione **Show Threshold Values** (si no está ya marcado).

La línea de umbral para cada diana se muestra como una línea horizontal.

7 Cerca de la esquina inferior derecha del gráfico Amplification, marque la casilla de verificación Log.

La visualización de los gráficos de amplificación en valores logarítmicos proporciona una mejor visión del ruido de fondo de la señal.

8 Establezca el valor mínimo del eje Y en 0,0.

- a A la derecha del gráfico Amplification, haga clic en el icono Chart Settings. 

Se abre el cuadro de diálogo Chart Settings.

- b Haga clic en la pestaña Axes Scale.

- c Desactive la casilla de verificación Auto Scale.

- d En la columna **Min** para **Y-Axis (log 10)**, escriba **0.0**, como se muestra en **Figura 33**.

- e Haga clic en **OK**.

El cuadro de diálogo se cierra y la escala del eje Y comienza en 0,0, lo que permite mostrar el ruido de la señal en los gráficos. Un ejemplo se muestra en **Figura 34**.

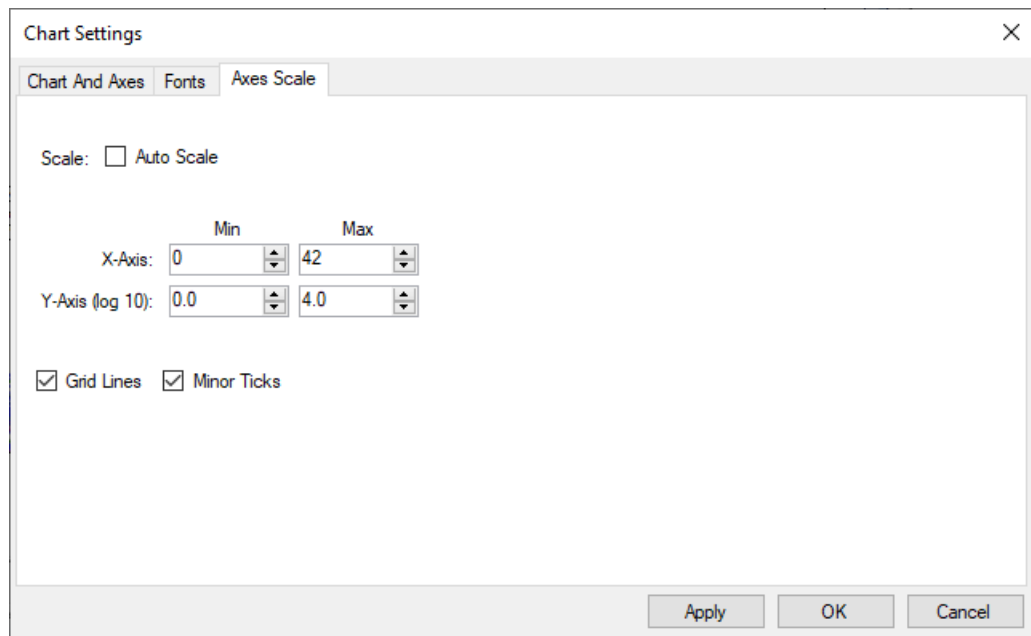


Figura 33 Cuadro de diálogo Maestro Chart Settings: pestaña Axes Scale

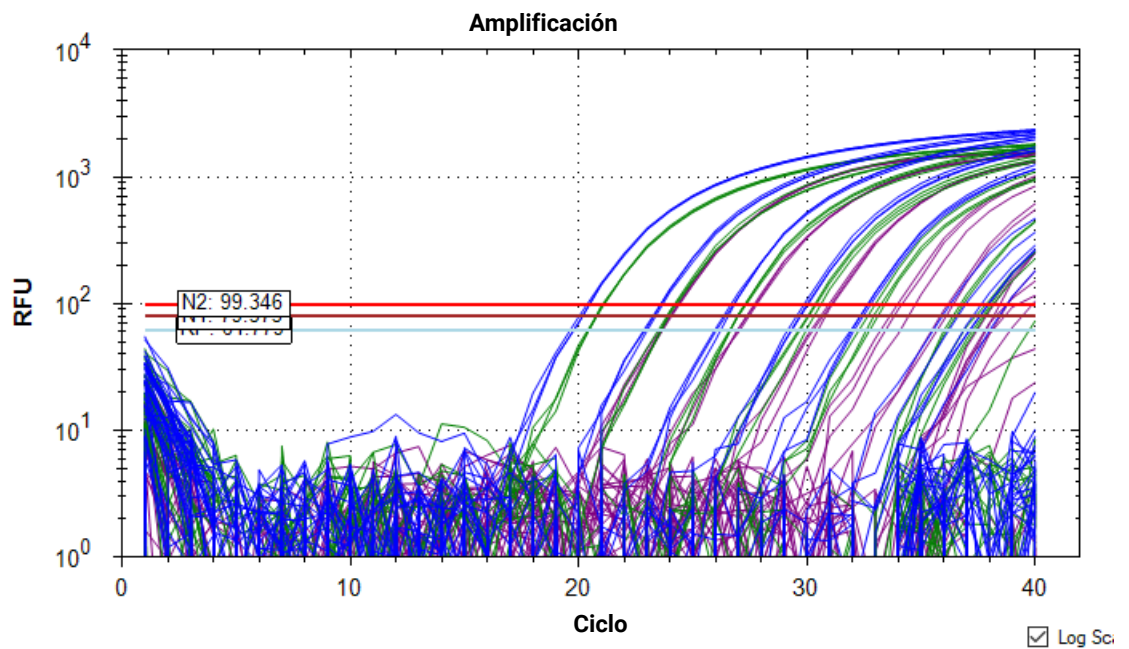


Figura 34 Gráfico de amplificación de Maestro en escala logarítmica: los umbrales diana se muestran como líneas horizontales

- 9 Evalúe visualmente los gráficos de amplificación y el umbral predeterminado para la diana N1.
 - a Debajo del gráfico Amplification, utilice las casillas de verificación para seleccionar solo la diana FAM (N1) para su visualización.
 - b Determine si el umbral es lo suficientemente alto como para estar por encima del ruido de fondo y lo suficientemente bajo como para incluir gráficos en la fase de amplificación exponencial (consulte **Figura 35**). A partir de esta determinación, proceda como se indica en **Tabla 15**.
- 10 Repita **paso 11** para la diana N2 y de nuevo para la diana RP.

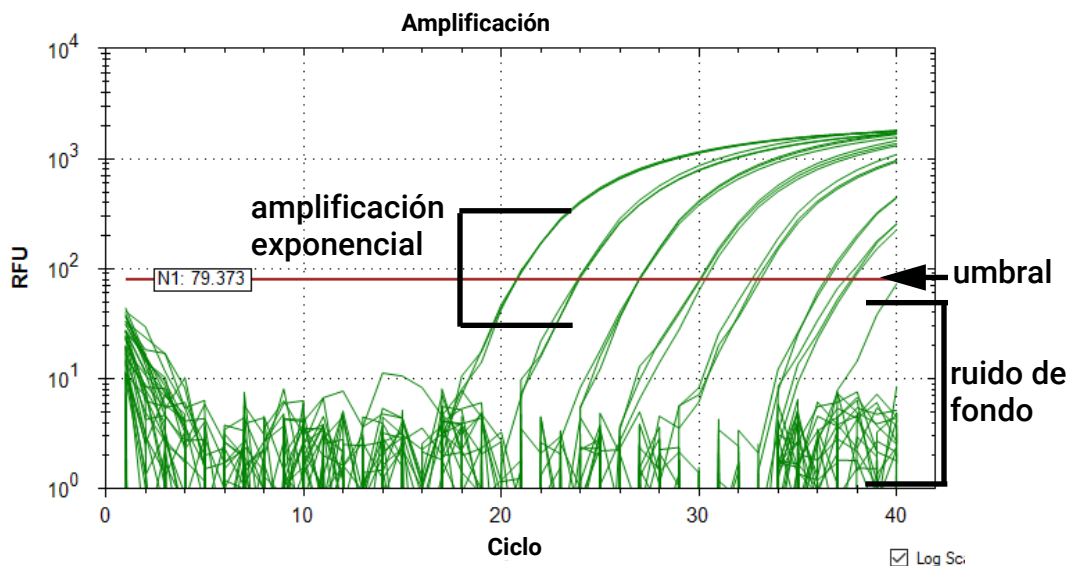


Figura 35 Gráfico de amplificación de Maestro para la diana N1

Tabla 15 Verificación del ajuste óptimo del umbral en el software Design & Analysis

Posición del umbral	Descripción	Acción
Optimal position (Posición óptima)	Por encima del ruido de fondo e incluye todos los gráficos en fase de amplificación exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Deje los umbrales en sus valores actuales.
Too high (Demasiado alto)	Algunos gráficos en la fase de amplificación exponencial no pasan el umbral	<ul style="list-style-type: none"> Busque pocillos con un ruido de fondo excepcionalmente alto. Estos pocillos atípicos pueden hacer que el software fije el umbral demasiado alto. Haga clic en Plate Setup > View/Edit Plate para abrir el Editor de placas. Seleccione el pocillo atípico en el mapa de la placa. En el panel de la derecha del Editor de placas, marque la casilla de verificación denominada Exclude Wells in Analysis (situada en la parte inferior del panel). Haga clic en OK. Cuando se le pregunte si desea aplicar los cambios, haga clic en Yes. El software volverá a calcular el umbral una vez excluido el pocillo atípico. Alternativamente, utilice el ratón para arrastrar manualmente la línea de umbral en el gráfico a una nueva posición. En la parte derecha del gráfico Amplification, haga clic en el icono Baseline Threshold para abrir el cuadro de diálogo Baseline Threshold. En Single Threshold, cambie la selección de Auto Calculated a User Defined. (Esto evita que el software vuelva a calcular el umbral una vez que se vuelve a incluir el pocillo atípico.) Haga clic en OK para cerrar el cuadro de diálogo. Haga clic en Plate Setup > View/Edit Plate para volver a abrir el Editor de placas. Seleccione el pocillo atípico y desactive la casilla Exclude Wells in Analysis. Haga clic en OK y luego en Yes. En el mapa de la placa bajo el gráfico Amplification, seleccione todos los pocillos para volver a incluir el pocillo atípico en el análisis.* <p>* Si el gráfico de amplificación del pocillo atípico no muestra una amplificación exponencial en ningún número de ciclo, asegúrese de que el umbral reducido no haga que el software asigne un valor Cq al pocillo (debido al ruido de fondo de la señal que cruza el umbral). Si lo hace, intente modificar otros ajustes de análisis para ese pocillo, por ejemplo, ajustando los números de ciclo Baseline Begin o Baseline End.</p>
Too low (Demasiado bajo)	Algunos gráficos no están por encima del ruido de fondo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente el umbral justo por encima del nivel de ruido de fondo.

Paso 3. Verificar los resultados en el pocillo NTC

11 En la tabla que muestra los resultados, localice la reacción de control sin plantilla (NTC), situada en el pocillo A12.

12 Asegúrese de que la columna Cq para las tres dianas diga «N/D» o tenga un valor Cq > 37,00.

Si la reacción NTC tiene un valor Cq ≤ 37,00 para cualquiera de las dianas, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Invalide la ejecución y repita el ensayo respetando estrictamente las pautas.

Exportar los datos del software CFX Maestro

- 1 En la parte superior de la ventana Data Analysis, haga clic en **Export > Custom Export**.
Se abre el cuadro de diálogo Custom Export.
- 2 En el campo Export Format, seleccione un tipo de archivo para los datos exportados, por ejemplo, **Excel 2007 (*.xlsx)**.
Asegúrese de que el PC disponga del software necesario para abrir el tipo de archivo seleccionado.
- 3 En el cuadro de diálogo, marque las casillas de verificación como se muestra en **Figura 36**.
Revise la sección Exported Columns para asegurarse de que se enumeren **Well**, **Target Name**, **Sample Name** y **Cq**.

Custom Export

Export Format: Excel 2007 (*.xlsx) ▼

Data to Export

☒ Include Run Information Header

Sample Description

☒ Well
☐ Fluorophore
☒ Target Name
☐ Content
☐ Replicate Number
☒ Sample Name
☐ Biological Group Name
☐ Well Note

Quantification

☒ Cq
☐ Starting Quantity
☐ Cq Mean
☐ Cq Standard Deviation
☐ Quantity Standard Deviation

Melt Curve

☐ Melt Temperature
☐ Melt Peak Height
☐ Melt Peak Begin Temperature
☐ Melt Peak End Temperature

End Point

☐ End Point Call
☐ End RFU

Exported Columns

Well
Target Name
Sample Name
Cq

Customize Column Names...

Set as Default Configuration

Export

Close

Figura 36 Ajustes de exportación de datos personalizados para la aplicación CFX Maestro

- 4 Haga clic en **Export**.
Se abre el cuadro de diálogo Save As.

- 5 Seleccione una carpeta para el archivo.
- 6 En el campo File name, escriba un nombre para el archivo o utilice el predeterminado.
- 7 Haga clic en **Save**.
El cuadro de diálogo se cierra y el programa exporta los datos al tipo de archivo seleccionado y lo guarda en la carpeta designada.
- 8 Abra el archivo y revise los datos Cq de cada una de las muestras de prueba y de los controles para interpretar los resultados. Consulte [Capítulo 6](#), "Análisis y resultados".

6 Análisis y resultados

Interpretación de los resultados **69**

El capítulo contiene información sobre la interpretación de los resultados de los ensayos basados en los datos de la PCR qRT.

Interpretación de los resultados

Resultados e interpretación de las muestras de control

Si alguno de los controles no muestra el rendimiento esperado, tal y como se describe en la **Tabla 16**, es posible que el ensayo se haya preparado o ejecutado de forma incorrecta o que se haya producido un mal funcionamiento del reactivo o del equipo. En tal caso, invalide la ejecución y repita el ensayo.

Control sin plantilla (NTC)

El NTC consiste en utilizar agua libre de nucleasas en la reacción de PCR qRT en lugar de ARN. La reacción NTC no debe presentar curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral dentro de los 37,00 ciclos para ninguna de las tres dianas. Si la reacción NTC presenta una curva de crecimiento con un $Cq \leq 37,00$, es posible que se haya producido una contaminación de la muestra. Invalide la ejecución y repita el ensayo respetando estrictamente las pautas.

Control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 Dx

La reacción de PCR qRT para el control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 producirá un resultado positivo con las dianas 2019-nCoV_N1 y 2019-nCoV_N2 con un valor Cq menor o igual a 37,00, mientras que producirá un resultado negativo (informado como sin Cq detectado o $Cq > 37,00$) con la diana del gen de la ribonucleasa P humana.

Control de muestras humanas

El control de muestras humanas consiste en células humanas no infecciosas y se utiliza como control del procedimiento de extracción de ARN para demostrar que la extracción de ARN y la integridad del reactivo de extracción se han realizado correctamente. La reacción de PCR qRT para el ARN extraído del control de la muestra humana debe producir un resultado positivo con la diana RP, con un valor Cq menor o igual a 37,00. Las dianas N1 y N2 del SARS-CoV-2 deben producir resultados negativos (informados como sin Cq detectado o $Cq > 37,00$).

Tabla 16 Rendimiento esperado de los controles

Tipo de control	Nombre del control	Se utiliza para supervisar	Resultado de la diana N1	Resultado de la diana N2	Resultado de la diana RP
Positivo	Dx por control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2	Fallo sustancial de los reactivos, incluida la integridad de los cebadores y las sondas	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Negativo (No se detecta Cq o $Cq > 37,00$)

Tabla 16 Rendimiento esperado de los controles

Tipo de control	Nombre del control	Se utiliza para supervisar	Resultado de la diana N1	Resultado de la diana N2	Resultado de la diana RP
Negativo	NTC	Contaminación de los reactivos o del medio ambiente	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)
Extracción	Control de muestras humanas	Fallo en el procedimiento de lisis y extracción, posible contaminación durante la extracción	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)

Resultados e interpretación de muestras clínicas

La **Tabla 17** enumera los resultados esperados para el ensayo. Si un laboratorio obtiene resultados inesperados para los controles del ensayo o si se obtienen resultados no concluyentes o no válidos y no pueden resolverse mediante la repetición de la prueba recomendada, póngase en contacto con los CDC para consultar y posiblemente remitir las muestras.

Diana del gen de la ribonucleasa P humana (RP)

Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia para la diana RP que crucen la línea de umbral dentro de los 37,00 ciclos (Cq ≤ 37,00), indicando así la presencia del gen de la ribonucleasa P humana. El hecho de no detectar la diana RP en ninguna muestra clínica puede indicar:

- Extracción inadecuada del ácido nucleico de los materiales clínicos, con la consiguiente pérdida de ARN o degradación del ARN, o arrastre de sustancias inhibitoras.
- Ausencia de suficiente material celular humano debido a una mala recogida o a la pérdida de la integridad de la muestra.
- Preparación y ejecución inadecuados del ensayo.
- Mal funcionamiento del reactivo o del equipo.

Si el ensayo RP no produce un resultado positivo para las muestras clínicas humanas, debe interpretarse como sigue:

- Si las dianas N1 y N2 son positivas (Cq ≤ 37,00) incluso en ausencia de una RP positiva, el resultado debe considerarse válido. Es posible que algunas muestras no muestren las curvas de crecimiento de la ribonucleasa P debido al bajo número de células de la muestra clínica original o a que las dianas víricas reduzcan la eficacia de la amplificación de la RP, especialmente en especímenes con alta concentración vírica. Una señal de RP negativa no excluye la presencia de ARN del virus del SARS-CoV-2 en una muestra clínica.
- Si la diana RP es negativa (no se detecta Cq o Cq > 37,00) mientras una o ambas dianas N1 y N2 son negativas (no se detecta Cq o Cq > 37,00), el resultado debe considerarse inválido para la muestra. Si se dispone de una muestra residual, repita el procedimiento de extracción y repita la prueba. Si todas las dianas siguen siendo negativas después de la repetición de la prueba, informe de los resultados como no válidos y, si es posible, se debe recoger una nueva muestra.

Dianas 2019-nCoV_N1 y 2019-nCoV_N2

- Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado, una muestra se considera **positiva** para el SARS-CoV-2 si se cumple la siguiente condición.
 - Las curvas de crecimiento de las dianas N1 y N2 cruzan la línea del umbral en 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$). La diana RP puede ser positiva o no (consulte la descripción anterior), pero el resultado de SARS-CoV-2 sigue siendo válido.
- Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado, una muestra se considera **negativa** para el SARS-CoV-2 si se cumplen LAS DOS condiciones siguientes.
 - Las curvas de crecimiento de las dianas N1 y N2 NO cruzan la línea del umbral en 37,00 ciclos (no se detecta Cq o $Cq > 37,00$).
 - La curva de crecimiento de la diana RP SÍ cruza la línea del umbral en 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$).
- Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado, una muestra se considera **no concluyente** para el SARS-CoV-2 si se cumple CUALQUIERA de las condiciones siguientes.
 - La curva de crecimiento de una de las dianas 2019-nCoV cruza la línea del umbral dentro de los 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$) mientras que la curva de crecimiento para la otra diana 2019-nCoV no cruza la línea de umbral dentro de 37,00 ciclos (no se detecta Cq o $Cq > 37,00$). La curva de crecimiento de la diana RP cruza la línea del umbral en 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$).

En el caso de muestras no concluyentes, el ARN extraído de la muestra debe volver a analizarse. Si el ARN residual no está disponible, vuelva a extraer el ARN de la muestra residual y vuelva a analizarlo. Si se obtiene el mismo resultado, informe del resultado no concluyente.

- Si el control de muestras humanas es positivo para N1 o N2 ($Cq \leq 37,00$), es posible que se haya producido una contaminación durante la extracción o el procesamiento de la muestra. Invalide todos los resultados de las muestras extraídas junto con el control de muestras humanas. Vuelva a extraer las muestras y el control de muestras humanas y vuelva a realizar la prueba.

Tabla 17 Resultados esperados para el ensayo PCR qRT del SARS-CoV-2

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Gen de la ribonucleasa P humana	Interpretación de resultados*	Informe	Acciones
Positivo (Cq ≤ 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)	Positivo O negativo	Se ha detectado el SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 positivo	Informar de los resultados a los CDC y al remitente
Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)	No se ha detectado el SARS-CoV-2	No se ha detectado	Informar de los resultados al remitente. Considerar la posibilidad de realizar pruebas para otros virus respiratorios. [†]
Positivo (Cq ≤ 37,00)	Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)	Resultado no concluyente	No concluyente	Repetir el análisis de la muestra extraída o repetir la extracción y la PCR qRT.
Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)	Positivo (Cq ≤ 37,00)	Resultado no concluyente	No concluyente	Repetir el análisis de la muestra extraída o repetir la extracción y la qRT-PCR.
Si una o ambas dianas 2019-nCoV son negativas (no se detecta Cq o Cq > 37,00)		Negativo (No se detecta Cq o Cq > 37,00)	Resultado no válido	No válido	Repetir la extracción y la PCR qRT. Si el resultado repetido sigue siendo no válido, considere la posibilidad de recoger una nueva muestra del paciente.

* Los laboratorios deben notificar sus resultados de diagnóstico de forma adecuada y de acuerdo con su sistema de notificación específico.

[†] No se han determinado los tipos de muestras óptimos ni el momento en que se alcanzan los niveles víricos máximos durante las infecciones causadas por el 2019-nCoV. Puede ser necesario recoger varias muestras del mismo paciente para detectar el virus. La posibilidad de un resultado falso negativo debe considerarse especialmente si las exposiciones recientes del paciente o su presentación clínica sugieren que la infección por el 2019-nCoV es posible, y las pruebas de diagnóstico para otras causas de enfermedad (por ejemplo, otra enfermedad respiratoria) son negativas. Si se sigue sospechando de una infección por el 2019-nCoV, debe considerarse la posibilidad de volver a realizar las pruebas en consulta con las autoridades de salud pública.

7

Control de calidad

Control de calidad **74**

Este capítulo contiene información sobre las medidas de control de calidad del ensayo.

Control de calidad

- Los requisitos de control de calidad deben llevarse a cabo de conformidad con la normativa local, estatal y federal o con los requisitos de acreditación y los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio del usuario.
- Los procedimientos de control de calidad están destinados a supervisar el rendimiento de los reactivos y los ensayos.
- Pruebe todos los controles positivos antes de ejecutar las muestras de diagnóstico con cada nuevo lote del kit para asegurarse de que todos los reactivos y componentes del kit funcionen correctamente.
- Las prácticas de laboratorio correctas (PCL) recomiendan incluir un control de extracción positivo en cada lote de aislamiento de ácidos nucleicos.
- El control de muestras humanas **debe** proceder a la extracción de ácido nucleico con cada lote de muestras para analizar.
- Incluya **siempre** un control sin plantilla (NTC) y el control positivo de ARN sintético del SARS-CoV-2 en cada ejecución de amplificación y detección.
- El conjunto de sonda y cebador para el gen de la ribonucleasa P humana (incluido en el 10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) controla la calidad de la muestra y la extracción.

8 Limitaciones del ensayo

Limitaciones **76**

En este capítulo se describen las limitaciones del ensayo realizado con el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Limitaciones

- 1 El uso de este ensayo está limitado al personal formado en el procedimiento. El incumplimiento de estas instrucciones puede dar lugar a resultados erróneos.
- 2 La obtención de resultados fiables depende de la recogida, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento adecuados de las muestras.
- 3 Evite la contaminación respetando las buenas prácticas de laboratorio y los procedimientos especificados en estas instrucciones de uso.
- 4 Los resultados negativos no excluyen la infección por SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como única base para las decisiones de tratamiento o de otra atención médica.
- 5 Un resultado positivo indica la detección de ácido nucleico del virus correspondiente. El ácido nucleico puede persistir incluso después de que el virus deje de ser viable.
- 6 El rendimiento del ensayo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit se estableció utilizando muestras de hisopo nasofaríngeo recogidas en medios de transporte UTM o VCM. Los hisopos orofaríngeos, los hisopos nasales y los hisopos nasales de los cornetes medios se consideran tipos de muestras aceptables para su uso con el ensayo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, pero no se ha establecido el rendimiento con estos tipos de muestras. Las pruebas de los hisopos orofaríngeos, los hisopos nasales y los hisopos nasales de los cornetes medios (recogidos por uno mismo bajo la supervisión de un profesional sanitario o recogidos por él) se limitan a los pacientes con síntomas de COVID-19.
- 7 El Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit no incluye una muestra para utilizar como control de muestras humanas. La muestra utilizada como control debe ser validada por el laboratorio.

9

Características de rendimiento

Características de rendimiento **78**

Este capítulo contiene las características de rendimiento del Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Características de rendimiento

Los siguientes datos demuestran las características de rendimiento del Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit. En todas las extracciones de muestras se utilizaron los volúmenes de entrada de muestras y los volúmenes de elución recomendados en la sección **“Extraer ácidos nucleicos”** en la **página 19**.

Sensibilidad analítica (límite de detección)

Agilent llevó a cabo un estudio del límite de detección (LoD) para establecer la concentración vírica más baja de SARS-CoV-2 (expresada como el número de copias del genoma vírico) que puede ser detectada por el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit al menos el 95 % de las veces con cada uno de los procedimientos de extracción de ácido nucleico admitidos en cada uno de los tres sistemas de PCR en tiempo real admitidos.

Los paneles de muestras de pruebas del LoD se elaboraron diluyendo un patrón de SARS-CoV-2 cuantificado disponible en el mercado con muestras clínicas negativas agrupadas (matriz negativa) para lograr una serie de concentraciones diana deseadas de SARS-CoV-2. Todas las muestras clínicas eran hisopos nasofaríngeos previamente analizados para el SARS-CoV-2 por el proveedor utilizando una prueba de SARS-CoV-2 con autorización de uso de emergencia y confirmada además por Agilent.

En el experimento preliminar del LoD del ensayo completo se utilizó una gama de concentraciones víricas con tres réplicas por concentración. El rango de concentración en el experimento preliminar probó concentraciones de 0,75 a 3 copias/ μ l. Los resultados del experimento preliminar indicaron que el LoD final probablemente se situaría dentro de este intervalo y variaría en función del método de extracción y del sistema de PCR en tiempo real.

El experimento final de confirmación del LoD del ensayo completo se llevó a cabo con tres niveles de entrada diana: 0,75, 1 y 1,5 copias/ μ l. En cada uno de los tres niveles de entrada diana, se probaron 20 réplicas de extracción individuales en todas las combinaciones posibles de método de extracción/sistema de PCR en tiempo real. La **Tabla 18** muestra las tasas de detección positiva de ese experimento. Una tasa de detección de 20/20 indica que las 20 réplicas de extracción se detectaron con esa combinación particular de método de extracción y sistema de PCR en tiempo real.

Tabla 18 Confirmación del límite de detección final -- Tasas de detección positiva* con cada método de extracción de ácidos nucleicos en cada sistema de PCR en tiempo real (Agilent AriaMx, ABI 7500 y Bio-Rad CFX96)

Nivel de entrada diana vírica del SARS-CoV-2 antes de la extracción (copias/μl)	QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con QIAasymphony (extracción automática)			Kit de aislamiento de ácido nucleico MagMAX Viral/Pathogen II con KingFisher Flex (extracción automática)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* Los índices de detección se expresan como el número de réplicas positivas sobre el número total de réplicas positivas y negativas. Los números entre paréntesis, cuando están presentes, indican el número de réplicas no concluyentes. En estos casos, el número total de réplicas positivas y negativas es inferior a 20.

La **Tabla 19** resume los valores finales del LoD para cada combinación de método de extracción/sistema de PCR en tiempo real. Estos valores representan el número de copias víricas por μl de extracto de ácido nucleico que puede ser detectado por el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit al menos el 95 % de las veces.

Tabla 19 Resumen del límite de detección final -- LoD para cada método de extracción de ácido nucleico en cada sistema de PCR en tiempo real (Agilent AriaMx, ABI 7500 y Bio-Rad CFX96)

Método de extracción de ácido nucleico	Límite de detección del ensayo completo (copias/μl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con QIAasymphony (extracción automática)	1,5	1	1,5
Kit de aislamiento de ácido nucleico MagMAX Viral/Pathogen II con KingFisher Flex (extracción automática)	1	1,5	1,5

Inclusión analítica

En el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, las secuencias de los cebadores y las sondas de oligonucleótidos para las dianas víricas N1 y N2 y el gen de la ribonucleasa P humana son idénticas en secuencia a las utilizadas en el panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) de los CDC para uso exclusivo en urgencias. La inclusión de este panel se ha establecido previamente.

Reactividad cruzada

En el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, las secuencias de los cebadores y las sondas de oligonucleótidos para las dianas víricas N1 y N2 y el gen de la ribonucleasa P humana son idénticas en secuencia a las utilizadas en el panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) de los CDC para uso exclusivo en urgencias. Se ha establecido previamente la reactividad cruzada de este panel.

Evaluación clínica

Se realizó un estudio de evaluación clínica con el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit utilizando muestras de hisopos nasofaríngeos (NP) humanos. Para cada condición de análisis, se hizo la prueba a un total de 80 muestras: 40 muestras NP negativas y 40 muestras NP positivas. El estado positivo o negativo de cada muestra se confirmó mediante un ensayo PCR qRT de autorización de uso de emergencia (EUA) para el SARS-CoV-2. El objetivo de la evaluación clínica era valorar la concordancia clínica (positivo/negativo) de los resultados de la prueba obtenidos con el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit con respecto a los obtenidos con el ensayo comparativo de PCR qRT de EUA para el SARS-CoV-2.

La extracción de ácido nucleico se realizó en cada muestra utilizando las dos plataformas de extracción automática admitidas (QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con QIAAsymphony SP y con el Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit con el sistema de purificación KingFisher Flex) utilizando el protocolo del fabricante y las recomendaciones proporcionadas en estas instrucciones de uso. A continuación, cada muestra extraída se analizó en los tres sistemas de PCR en tiempo real compatibles (Agilent AriaMx, ABI 7500 y Bio-Rad CFX96), tal como se describe en estas instrucciones de uso. Por lo tanto, cada muestra se analizó bajo seis (6) condiciones diferentes en este estudio. Como criterio de aceptación, se exigió una concordancia mínima del 95 % de los resultados positivos y negativos entre el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit y el ensayo comparativo. Los resultados de la concordancia se resumen en la **Tabla 20**.

Tabla 20 Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y concordancia general (OA) entre Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit y el ensayo comparativo de PCR qRT de EUA para el SARS-CoV-2

Plataforma de extracción:	QIAAsymphony	QIAAsymphony	QIAAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Sistema de PCR en tiempo real:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4 %	100,0 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
NPA	100,0 %	97,5 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
OA	98,7 %	98,8 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %

10

Referencia

Etiquetas del producto **82**

Este capítulo contiene copias de las etiquetas del producto para el Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Etiquetas del producto

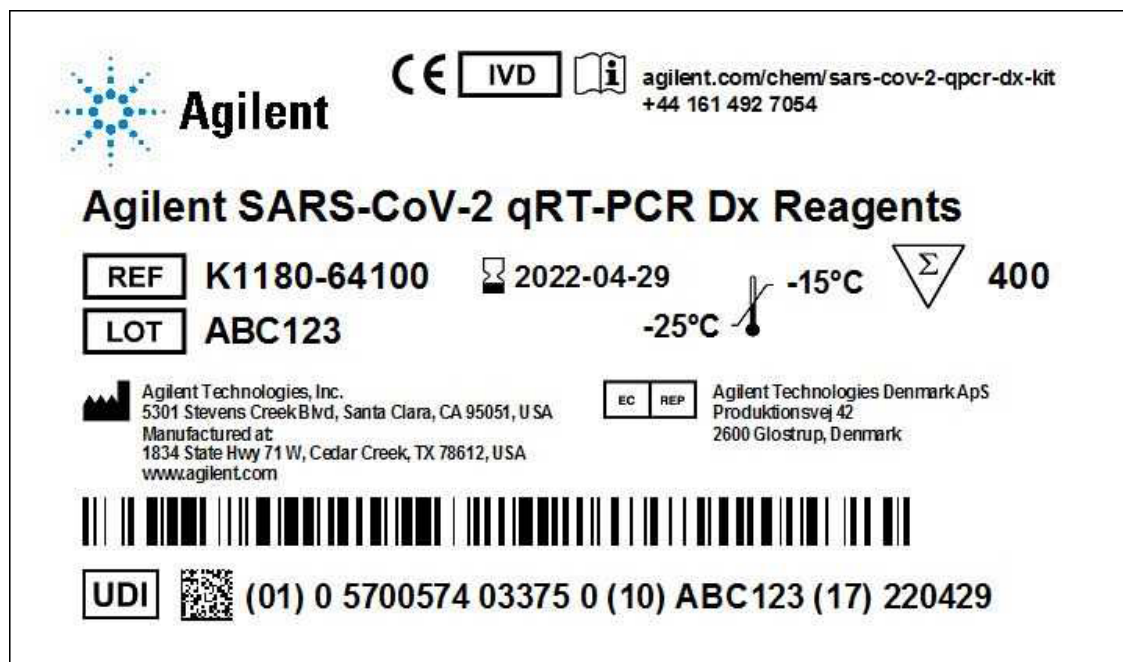


Figura 37 Etiqueta de caja para K1180-64100

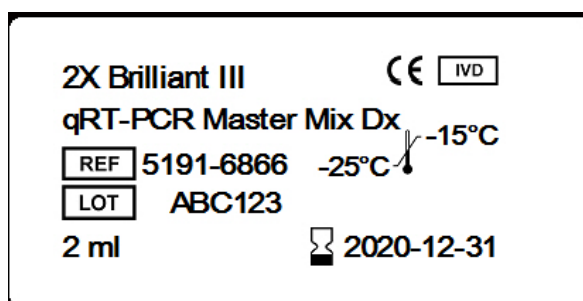


Figura 38 Etiqueta de botella para 5191-6866

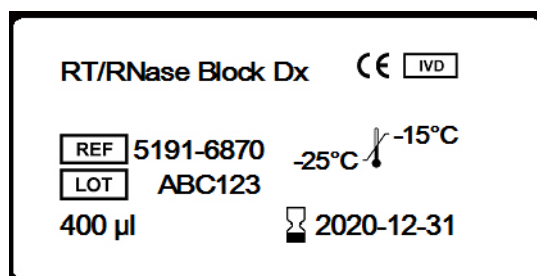


Figura 39 Etiqueta de tubo para 5191-6870

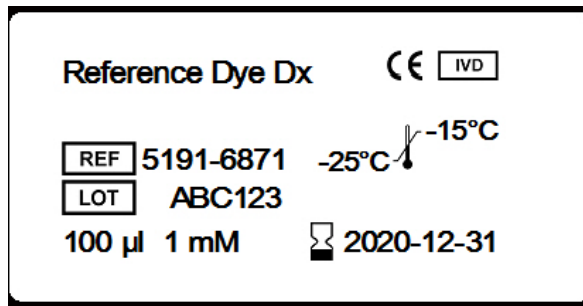


Figura 40 Etiqueta de tubo para 5191-6871

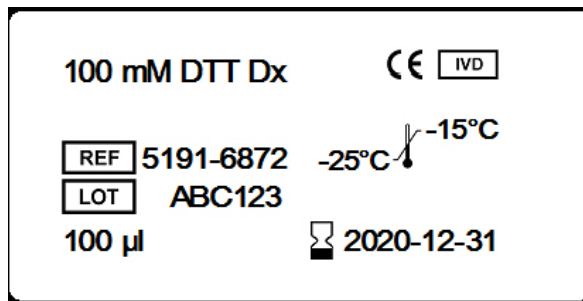


Figura 41 Etiqueta de tubo para 5191-6872

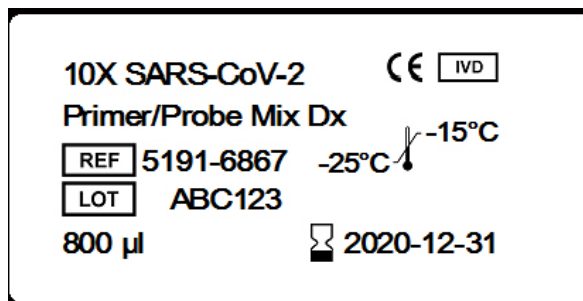


Figura 42 Etiqueta de tubo para 5191-6867



Agilent



agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit
+44 161 492 7054

Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx

REF

K1180-64200



2022-04-29

-75°C



8

LOT

ABC123

-85°C



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, U.S.A.
Manufactured at:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, U.S.A.
www.agilent.com



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark



UDI



(01) 0 5700574 03376 7 (10) ABC123 (17) 220429

Figura 43 Etiqueta de caja para K1180-64200

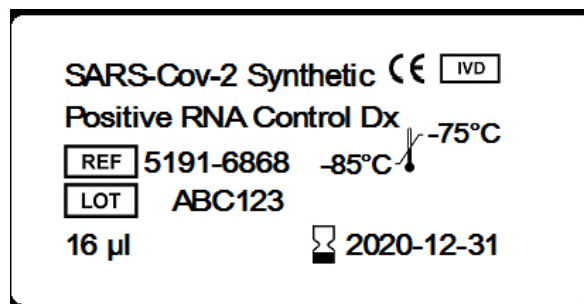


Figura 44 Etiqueta de tubo para 5191-6868

Fabricado por



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Fabricado en:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

Representante autorizado para la Unión Europea



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Soporte técnico de Agilent

Visite www.agilent.com/en/contact-us/page para encontrar los números de teléfono específicos de cada país

O envíe un correo electrónico a covid.support@agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Queda prohibida la reproducción de cualquier parte de este manual en cualquier forma o por cualquier medio (incluidos el almacenamiento y la recuperación electrónica o la traducción a otro idioma) sin el acuerdo y consentimiento previo y por escrito de Agilent Technologies, Inc., que se regirá por las leyes de copyright de Estados Unidos e internacionales.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–
2022

Revisión B3, mayo de 2022

