

**CDC 2019-Novel Coronavirus
(2019-nCoV) Panel de
diagnóstico RT-PCR en
tiempo real**

Sólo para uso de emergencia

Instrucciones de uso

**Catálogo # 2019-
nCoV-EUA-01
1000 reacciones**

Centros para el Control
y la Prevención de
Enfermedades División
de Enfermedades
Virales



Índice

<u>Se pretende que el Use.....</u>	<u>3</u>
<u>Resumen y Explanation.....</u>	<u>4</u>
<u>Los principios de los Procedure.....</u>	<u>4</u>
<u>Materiales requeridos (Provided).....</u>	<u>6</u>
<u>Materiales requeridos (pero no Provided).....</u>	<u>7</u>
<u>Advertencias y Precautions.....</u>	<u>10</u>
<u>Almacenamiento, manipulación y Stability.....</u>	<u>12</u>
<u>Recolección, manipulación y Storage.....</u>	<u>12</u>
<u>Referencia del espécimen al CDC.....</u>	<u>13</u>
<u>Reactivo y controles Preparation.....</u>	<u>13</u>
<u>General Preparation.....</u>	<u>14</u>
<u>Ácido nucleico Extraction.....</u>	<u>14</u>
<u>Conjunto de ensayos Up.....</u>	<u>16</u>
<u>Crear una plantilla de ejecución en el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx (requerido si no existe una plantilla)21</u>	
<u>Definición del instrumento Settings.....</u>	<u>27</u>
<u>Corriendo a Test.....</u>	<u>29</u>
<u>Interpretación de los resultados y Reporting.....</u>	<u>35</u>
<u>2019-nCoV rRT-PCR Resultados del panel de diagnóstico Interpretación Guide.....</u>	<u>38</u>
<u>Calidad Control.....</u>	<u>39</u>
<u>Limitations.....</u>	<u>39</u>
<u>Condiciones de autorización para el Laboratory.....</u>	<u>40</u>
<u>Rendimiento Characteristics.....</u>	<u>42</u>
<u>Disposal.....</u>	<u>52</u>
<u>References.....</u>	<u>52</u>
<u>Revisión History.....</u>	<u>53</u>
<u>Información de contacto, pedidos y productos Support.....</u>	<u>53</u>

<u>Apéndice A: Tratamiento térmico alternativo al Extraction.....</u>	<u>54</u>
<u>Apéndice B: Preparación del espécimen en pool y Processing.....</u>	<u>58</u>
<u>Apéndice C: Aplicación y vigilancia de los especímenes mancomunados Testing.....</u>	<u>67</u>

Uso previsto

El Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) es una prueba de RT-PCR en tiempo real destinada a la detección cualitativa del ácido nucleico del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias superiores e inferiores (como hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos), esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado nasofaríngeo/aspirado o aspirado nasal) recogidos de individuos sospechosos de tener [COVID-19](#) por su proveedor de atención médica¹.

Esta prueba también sirve para la detección cualitativa de ácido nucleico del SARS-CoV-2 en muestras agrupadas que contienen hasta cuatro de las muestras individuales de hisopos respiratorios superiores (nasofaríngeos (NP), orofaríngeos (OP), NP/OP combinados o hisopos nasales) que se recogieron utilizando viales individuales que contenían medios de transporte de personas sospechosas de padecer COVID-19 por su proveedor de atención médica.

Los resultados negativos de las pruebas agrupadas no deben considerarse definitivos. Si los signos y síntomas clínicos de un paciente son inconsistentes con un resultado negativo o si los resultados son necesarios para el manejo del paciente, entonces el paciente debe ser considerado para una prueba individual. Los especímenes incluidos en los pools con un resultado positivo, no concluyente o inválido deben ser probados individualmente antes de reportar un resultado. Es posible que los especímenes con cargas virales bajas no se detecten en los grupos de muestras debido a la disminución de la sensibilidad de las pruebas en grupo.

Las pruebas se limitan a los laboratorios certificados bajo las Enmiendas de Mejora de Laboratorios Clínicos de 1988 (CLIA), 42 U.S.C. § 263a, que cumplen los requisitos para realizar pruebas de alta complejidad.

Los resultados son para la identificación del ARN del SARS-CoV-2. El ARN del SARS-CoV-2 se detecta generalmente en las muestras respiratorias superiores e inferiores durante la infección. Los resultados positivos son indicativos de una infección activa con el SARS-CoV-2, pero no descartan una infección bacteriana o una coinfección con otros virus. Es posible que el agente detectado no sea la causa definitiva de la enfermedad. Los laboratorios de los Estados Unidos y sus territorios están obligados a comunicar todos los resultados a las autoridades sanitarias públicas competentes.

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

Las pruebas con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV están destinadas a ser utilizadas por personal de laboratorio capacitado que sea competente en la realización de ensayos de RT-PCR en tiempo real. El panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) es sólo para su uso bajo la autorización de uso de emergencia de la Administración de Drogas y Alimentos.

¹Para este EUA, un proveedor de servicios de salud incluye, entre otros, médicos, enfermeros, farmacéuticos, tecnólogos, directores de laboratorio, epidemiólogos o cualquier otro profesional de la salud o profesional de la salud aliado.

Resumen y explicación

El 31 de diciembre de 2019 se notificó inicialmente a la OMS un brote de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei (China). Las autoridades chinas identificaron un nuevo coronavirus (2019-nCoV, también conocido como SARS-CoV-2), que ha provocado millones de infecciones humanas confirmadas en todo el mundo.

Se han notificado casos de infección asintomática, enfermedades leves, enfermedades graves y muertes.

El Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV es una prueba de diagnóstico molecular *in vitro* que ayuda a la detección y diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 y se basa en la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ampliamente utilizada. El producto contiene cebadores de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis de doble etiqueta (TaqMan®) y material de control utilizado en la rRT-PCR para la detección cualitativa *in vitro* del ARN 2019- nCoV en muestras respiratorias.

La expresión "laboratorios calificados" se refiere a los laboratorios en los que todos los usuarios, analistas y cualquier persona que comunique los resultados de la utilización de este dispositivo deben ser capacitados para realizar e interpretar los resultados de este procedimiento por un instructor competente antes de su utilización.

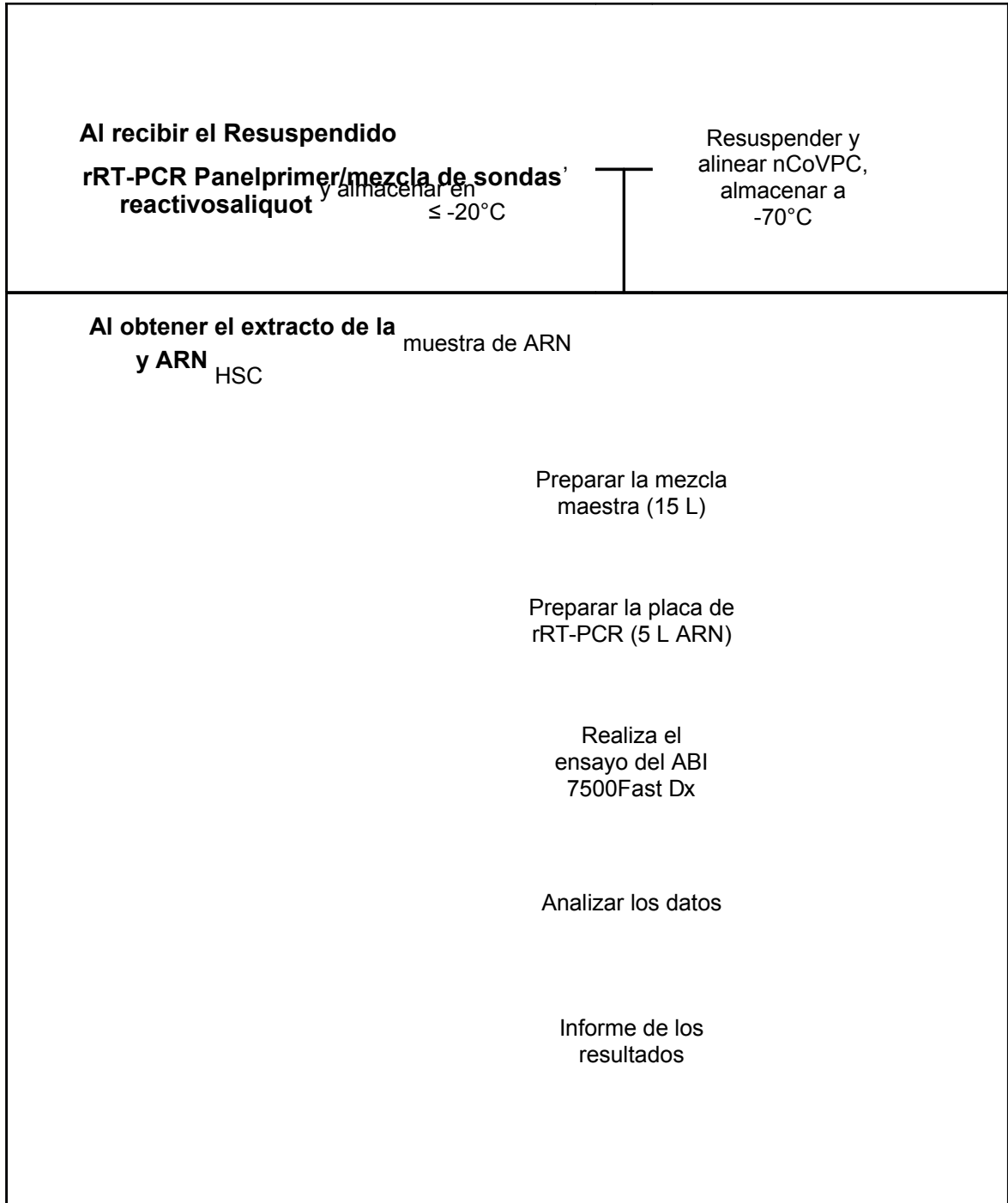
Principios del procedimiento

Los cebadores oligonucleótidos y las sondas para la detección de 2019-nCoV se seleccionaron a partir de regiones del gen de la nucleocápside (N) del virus. El panel está diseñado para la detección específica del SARS-CoV-2 (dos juegos de cebadores/sondas). También se incluye en el panel un conjunto adicional de cebadores/sondas para detectar el gen de la RNasa P humana (RP) en muestras de control y muestras clínicas.

El ARN aislado y purificado de los especímenes respiratorios superiores e inferiores se transcribe en sentido inverso al ADNc y posteriormente se amplifica en el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx con el software SDS versión 1.4. En el proceso, la sonda se recocina hasta una secuencia objetivo específica situada entre los cebadores de avance y retroceso. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la actividad de la nucleasa 5' de la Taq polimerasa degrada la sonda, haciendo que el colorante reportado se separe del colorante de enfriamiento, generando una señal fluorescente. Con cada ciclo, se separan moléculas adicionales de colorante reportador de sus respectivas sondas, aumentando la intensidad de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se monitoriza en cada ciclo de PCR mediante el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems con el software SDS versión 1.4.

La detección del ARN viral no sólo ayuda a diagnosticar enfermedades sino que también proporciona información epidemiológica y de vigilancia.

Resumen del proceso de preparación y ensayo



Materiales necesarios (proporcionados)

Nota: El CDC mantendrá en su sitio web una lista de lotes comerciales de conjuntos de cebadores y sondas y/o materiales de control positivo que son alternativas aceptables al conjunto de cebadores y sondas del CDC y/o al control positivo incluido en el Panel de Diagnóstico. Sólo el material distribuido a través del Recurso Internacional de Reactivos de los CDC y los lotes específicos de material publicados en el sitio web de los CDC son aceptables para su uso con este ensayo bajo la Autorización de Uso de Emergencia de los CDC.

Esta lista de lotes alternativos aceptables de materiales de cebadores y sondas y/o materiales de control positivo estará disponible en

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/virus-requests.html>

Primers y sondas:

Catálogo #2019-nCoV EUA-01 Panel de Diagnóstico Caja #1:

<i>Etiqueta del reactivo</i>	<i>Parte #</i>	<i>Descripción</i>	<i>Cantidad / Tubo</i>	<i>Reacciones / Tubo</i>
2019-nCoV_N1	RV202001 RV202015	2019-nCoV_N1 Mezcla combinada de imprimación/bata	22,5 nmol	1000
2019-nCoV_N2	RV202002 RV202016	2019-nCoV_N2 Mezcla combinada de imprimación/sonda	22,5 nmol	1000
RP	RV202004 RV202018	RNase P humana Combinación de imprimación y sonda	22,5 nmol	1000

Control positivo (cualquiera de los siguientes productos son

aceptables): Catálogo #2019-nCoV EUA-01 Panel de Diagnóstico

Caja #2:

Catálogo #VTC-04 CDC 2019-nCoV Positive Control (nCoVPC)

<i>Etiqueta del reactivo</i>	<i>Parte #</i>	<i>Descripción</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Notas</i>
nCoVPC	RV202005	2019-nCoV Control Positivo (nCoVPC) Para ser usado como un control positivo con el procedimiento del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019- nCoV. El nCoVPC contiene material de control positivo no infeccioso suministrado en estado seco y debe ser resuspendido antes de su uso. El nCoVPC consiste en ARN transcrito <i>in vitro</i> . El nCoVPC dará un resultado positivo con cada ensayo en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real 2019- nCoV incluyendo a RP.	4 tubos	Proporciona (800) 5 μ L reacciones de prueba

Materiales requeridos (pero no proporcionados)

Control de Especímenes Humanos (HSC)

Descripción	Cantidad	Nº de catálogo del CDC.
Fabricado por el CDC. Para su uso como control de procedimientos de extracción de ácido nucleico para demostrar el éxito de la recuperación del ácido nucleico así como la integridad del reactivo de extracción. El CDC consiste en material celular humano cultivado no infeccioso (tratado con beta-propiolactona) suministrado como líquido suspendido en 0,01 M PBS a un pH de 7,2-7,4.	10 viales x 500 μ L	KT0189

Alternativas aceptables al HSC:

- ! Material de muestra humana negativo: Los laboratorios pueden preparar un volumen de material de muestras humanas (por ejemplo, sueros humanos o restos de muestras respiratorias negativas) para extraer y ejecutar junto con las muestras clínicas como control de extracción. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para ser utilizado en múltiples ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para asegurar que genera los resultados esperados para las CEH enumeradas en estas instrucciones de uso.
- ! Material de espécimen humano inventado: Los laboratorios pueden preparar materiales de muestras humanas artificiales suspendiendo cualquier línea celular humana (por ejemplo, A549, Hela, o 293) en PBS. Este material debe prepararse en un volumen suficiente para ser utilizado en múltiples ejecuciones. El material debe probarse antes de su uso como control de extracción para asegurar que genera los resultados esperados para la HSC listada en estas instrucciones de uso.

Los CDC mantendrán en su sitio web una lista de controles de extracción comercialmente alternativos, si procede, que son aceptables para su uso con este ensayo bajo la Autorización de

Uso de Emergencia de los CDC, en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/virus-requests.html>

rRT-PCR Opciones de mezcla maestra de enzimas

Reactivo	Cantidad	No de catálogo.
Quantabio qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix	100 x 20 µL rxns (1 x 1 mL)	95132-100
	2000 x 20 µL rxns (1 x 20 mL)	95132-02K
	500 x 20 µL rxns (5 x 1 mL)	95132-500
Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)	100 x 20 µL rxns (500 µL)	95166-100
	500 x 20 µL rxns (5 x 500 µL)	95166-500
	1000 x 20 µL rxns (1 x 5 mL)	95166-01K
Sonda GoTaq® de Promega Sistema RT-qPCR de 1 paso	200 x 20 µL rxns (2 mL)	A6120
	1250 x 20 µL rxns (12,5 mL)	A6121
Thermofisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	1000 reacciones	A15299
	2000 reacciones	A15300

Opciones de extracción de ARN

Para cada uno de los equipos que se enumeran a continuación, los CDC han confirmado que el tampón de lisis externa es eficaz para la inactivación del SARS-CoV-2.

Fabricante de instrumentos.	Kit de extracción	No de catálogo.
QIAGEN	² QIAamp DSP Mini Kit de ARN Viral	50 extracciones (61904)
	² QIAamp Mini Kit de ARN Viral	50 extracciones (52904) 250 extracciones (52906)
QIAGEN EZ1 Avanzado XL	² EZ1 Kit de virus DSP	48 extracciones (62724) Buffer AVL (19073 o 19089) EZ1 Tarjeta de virus DSP XL avanzada (9018703)
	² EZ1 Virus Mini Kit v2.0	48 extracciones (955134) Buffer AVL (19073 o 19089) EZ1 Advanced XL Virus Card v2.0 (9018708)
Roche MagNA Pure 24	² MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit	96 extracciones (07 658 036 001) Tampón de lisis externo (06 374 913 001, 12 239 469 103, 03 246 779 001 o 03 246 752 001)
Roche MagNA Pure 96	Kit de Pequeño Volumen de 2DNA y NA Viral	576 extracciones (06 543 588 001) Tampón de lisis externo (06 374 913 001, 12 239 469 103, 03 246 779 001 o 03 246 752 001)

¹ Roche MagNA Pure LC	² Kit de ácido nucleico total	192 extracciones (03 038 505 001)
Fabricante de instrumentos.	Kit de extracción	No de catálogo.
¹ Roche MagNA Pure Compact	² Kit de aislamiento de ácido nucleico	32 extracciones (03 730 964 001)
Promega Maxwell® RSC 48 y Maxwell® CSC 48	Kit de purificación de ácido nucleico total viral ³ Maxwell® RSC	48 extracciones (AS1330) 144 extracciones (ASB1330)
¹ QIAGEN QIAcube	² QIAmp DSP Mini Kit de ARN Viral	50 extracciones (61904)
	² QIAamp Mini Kit de ARN Viral	50 extracciones (52904) 250 extracciones (52906)
^{1, 3} bioMérieux NucliSENS® easyMAG® y ^{1, 3} bioMérieux EMAG® (Los reactivos de extracción magnética automatizada se venden por separado. Ambos instrumentos utilizan los mismos reactivos y desechables, a excepción de las puntas).		EasyMAG® Sílice magnética (280133) EasyMAG® Tampón para lisis (280134) EasyMAG® Tampón para lisis, 2 mL (200292) EasyMAG® Wash Buffers 1, 2 y 3 (280130, 280131, 280132) Desechables EasyMAG® (280135) Puntas de pipeta Biohit (easyMAG® solamente) (280146) EMAG®1000µL Consejos (418922)

¹La equivalencia y el rendimiento de estas plataformas de extracción de ARN viral se demostraron con el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del Virus de la Gripe Humana del CDC (K190302). No se han demostrado las características de rendimiento de estas plataformas de extracción con 2019-nCoV (SARS CoV-2).

² El CDC ha confirmado que el tampón de lisis externa utilizado con este método de extracción es efectivo para la inactivación del SARS- CoV-2.

³ La CDC ha comparado la concentración del agente inactivador en la solución tampón de lisis utilizada con este método de extracción y ha determinado que la concentración se encuentra dentro del rango de concentraciones que se consideran eficaces para la inactivación del SARS-CoV-2.

Alternativa a la extracción:

Si un laboratorio no puede acceder a reactivos de extracción adecuados para apoyar la demanda de pruebas debido a la escasez mundial de reactivos, el CDC ha evaluado un procedimiento de tratamiento térmico para los especímenes de las vías respiratorias superiores utilizando el Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X), CG. Aunque el rendimiento fue comparable, este método se ha evaluado con un número limitado de especímenes clínicos y no se puede descartar una posible reducción de la sensibilidad debido al arrastre de sustancias inhibitoras o a la degradación del ARN. Sólo debería utilizarse cuando una jurisdicción determine que la necesidad de la prueba es lo suficientemente grande como para justificar el riesgo de una posible pérdida de sensibilidad. Los especímenes tratados térmicamente que generen resultados no concluyentes o inválidos deben extraerse con un método de extracción autorizado antes de volver a realizar las pruebas. Los detalles y el procedimiento para el tratamiento térmico alternativo a la extracción pueden encontrarse en el Apéndice A.

Equipo y consumibles necesarios (pero no suministrados)

- Mezclador de vórtice
- Microcentrífuga
- Micropipetas (2 o 10 μL , 200 μL y 1000 μL)
- Micropipetas multicanal (5-50 μL)

- Bastidores para tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- 2 bloques de frío de 96 pozos a -20°C
- 7500 Sistemas de PCR en tiempo real Fast Dx con software SDS 1.4 (Applied Biosystems; catálogo #4406985 o #4406984)
- Sistemas de extracción (instrumentos): QIAGEN EZ1 Advanced XL, QIAGEN QIAcube, Roche MagNA Pure 24, Roche MagNA Pure 96, Promega Maxwell® RSC 48, Roche MagNA Pure LC, Roche MagNA Pure Compact, bioMérieux easyMAG y bioMérieux EMAG
- Agua de grado molecular, libre de nucleasas
- Lejía al 10% (dilución 1:10 de lejía comercial de hipoclorito al 5,25-6,0%)
- DNAZap™ (Ambion, cat. #AM9890) o equivalente
- RNase AWAY™ (Fisher Scientific; cat. #21-236-21) o equivalente
- Guantes y batas quirúrgicas desechables sin polvo
- Puntas de pipeta de barrera de aerosol
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (sin DNasa/RNasa)
- Placas de reacción PCR de 0.2 mL (Applied Biosystems; catálogo #4346906 o #4366932)
- Tiras ópticas MicroAmp de 8 tapas (Applied Biosystems; catálogo #4323032)

Componentes alternativos que califican:

Si un laboratorio modifica esta prueba utilizando componentes alternativos no autorizados (por ejemplo, métodos de extracción o instrumentos de PCR), la prueba modificada no está autorizada en virtud de esta EUA. La Política de la FDA para las pruebas de diagnóstico de la enfermedad por virus coronarios-2019 durante la emergencia de salud pública, actualizada el 11 de mayo de 2020, no cambia esto. Como parte de esta política, la FDA no tiene la intención de objetar cuando un laboratorio modifica una prueba autorizada por la EUA, lo que podría incluir el uso de componentes no autorizados, sin obtener una enmienda de la EUA o de la EUA, en la que la prueba modificada se valida utilizando un estudio puente a la prueba autorizada por la EUA.

Advertencias y precauciones

- ! Para el uso de diagnóstico *in vitro* (IVD).
 - ! Esta prueba no ha sido autorizada o aprobada por la FDA; esta prueba ha sido autorizada por la FDA bajo una EUA para su uso por laboratorios certificados bajo CLIA, 42 U.S.C. § 263a, que cumplen los requisitos para realizar pruebas de alta complejidad.
 - ! Esta prueba se ha autorizado únicamente para la detección de ácido nucleico del SARS CoV-2, no para ningún otro virus o patógeno.
 - ! Esta prueba sólo se autoriza mientras dure la declaración de que existen circunstancias que justifican la autorización del uso de emergencia de pruebas de diagnóstico *in vitro* para la detección y/o el diagnóstico de COVID-19 en virtud del artículo 564 b) 1) de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, 21 U.S.C. § 360bbb-3 b) 1), a menos que la autorización se termine o se revoque antes.
- ! Siga las precauciones estándar. Todas las muestras de los pacientes y los controles positivos deben considerarse potencialmente infecciosos y manejarse en consecuencia.
- ! No coma, beba, fume, se aplique cosméticos o manipule lentes de contacto en áreas donde se manipulan reactivos y especímenes humanos.

- ! Maneje todos los especímenes como si fueran infecciosos usando procedimientos de laboratorio seguros. Consulte las Directrices provisionales de bioseguridad en el laboratorio para la manipulación y el procesamiento de especímenes relacionados con el 2019- nCoV <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html>.
- ! El procesamiento de las muestras debe realizarse de conformidad con las normas nacionales de seguridad biológica.
- ! Si se sospecha que existe una infección por 2019-nCoV sobre la base de los actuales criterios de detección clínica y epidemiológica recomendados por las autoridades de salud pública, las muestras deben recogerse con las debidas precauciones de control de la infección.
- ! Las características de rendimiento se han determinado con muestras de las vías respiratorias superiores y las inferiores de pacientes humanos con signos y síntomas de infección respiratoria.
- ! Realizar todas las manipulaciones de muestras de virus vivos dentro de una cabina de seguridad biológica (BSC) de clase II (o superior).
- ! Utilice equipo de protección personal como (pero no limitado a) guantes, protección ocular y batas de laboratorio al manipular los reactivos del kit mientras se realiza este ensayo y al manipular los materiales, incluidas las muestras, los reactivos, las pipetas y otros equipos y reactivos.
- ! Las tecnologías de amplificación como la PCR son sensibles a la introducción accidental del producto de la PCR a partir de reacciones de amplificación anteriores. Podrían producirse resultados incorrectos si la muestra clínica o los reactivos en tiempo real utilizados en la etapa de amplificación se contaminan por la introducción accidental del producto de la amplificación (amplificación). El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder de forma unidireccional.
 - Mantener áreas separadas para la preparación de los ensayos y el manejo de los ácidos nucleicos.
 - Compruebe siempre la fecha de caducidad antes de usarla. No utilice reactivos caducados. No sustituya ni mezcle reactivos de diferentes lotes de kits o de otros fabricantes.
 - Cambie las puntas de las pipetas de barrera de aerosol entre todas las transferencias manuales de líquidos.
 - Durante la preparación de las muestras, el cumplimiento de buenas técnicas de laboratorio es esencial para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y la introducción inadvertida de nucleasas en las muestras durante y después del procedimiento de extracción. Siempre se debe utilizar una técnica aséptica adecuada cuando se trabaja con ácidos nucleicos.
 - Mantener equipos y suministros separados y específicos (por ejemplo, pipetas, microcentrífugas) y suministros (por ejemplo, tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta) para la preparación de los ensayos y la manipulación de los ácidos nucleicos extraídos.
 - Use una bata de laboratorio limpia y guantes desechables sin polvo (no usados anteriormente) cuando se realizan los ensayos.
 - Cambie los guantes entre las muestras y siempre que se sospeche de contaminación.
 - Mantenga los tubos de reactivos y de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible.
 - Los cebadores, las sondas (incluidas las alícuotas) y la mezcla maestra de enzimas deben descongelarse y mantenerse en un bloque frío en todo momento durante su preparación y uso.

- Las superficies de trabajo, las pipetas y las centrifugadoras deben limpiarse y descontaminarse con productos de limpieza como la lejía al 10%, DNAZap™, o la RNase ^{AWAY}™ para minimizar el riesgo de contaminación con ácido nucleico. La lejía residual debe ser eliminada usando etanol al 70%.
- ! El ARN debe mantenerse en un bloque frío o en hielo durante la preparación y el uso para asegurar su estabilidad.
- ! Deshágase de los reactivos no utilizados del kit y de los especímenes humanos de acuerdo con las regulaciones locales, estatales y federales.

Almacenamiento, manipulación y estabilidad de los reactivos

- ! Almacene todos los primers y sondas secas y el control positivo, nCoVPC, a 2-8°C hasta que se rehidrate para su uso. Almacene los materiales líquidos de control de HSC en $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
Nota: La información de almacenamiento es para los materiales de cebadores y sondas del CDC obtenidos a través del Recurso de Reactivos Internacionales. Si utiliza primers y sondas comerciales, consulte las instrucciones del fabricante para el almacenamiento y la manipulación.
- ! Compruebe siempre la fecha de caducidad antes de usarla. No utilice 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 un bloque frío en todo momento durante su preparación y uso.
- ! No vuelva a congelar las sondas.
- ! Los controles y sus alícuotas deben descongelarse y mantenerse en hielo en todo momento durante su preparación y uso.

Recolección, manipulación y almacenamiento de especímenes

Es probable que la recogida, el almacenamiento y el transporte de muestras inadecuadas o inapropiadas den lugar a resultados de pruebas falsas. Se recomienda encarecidamente la capacitación en la recogida de muestras debido a la importancia de la calidad de las mismas. Se puede hacer referencia al CLSI MM13-A como un recurso apropiado.

- La recolección del espécimen
 - ! [Consulte las Directrices provisionales para la recogida](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html), manipulación y prueba de muestras clínicas para COVID- 19 <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
 - ! Siga las instrucciones del fabricante del dispositivo de recogida de muestras para obtener los métodos de recogida adecuados.
 - ! Las muestras de hisopos deben ser recogidas usando solamente hisopos con punta sintética, como el nylon o el Dacron®, y un mango de aluminio o plástico. Los bastoncillos de alginato de calcio son inaceptables y no se recomiendan los bastoncillos de algodón con vástago de madera. Coloque los hisopos inmediatamente en tubos estériles que contengan de 1 a 3 mL de medios de transporte apropiados, como los medios de transporte viral (VTM).
- Transporte de especímenes
 - ! Los especímenes deben ser embalados, enviados y transportados de acuerdo con la edición actual del Reglamento de Mercancías Peligrosas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). Siga las regulaciones de envío para la Sustancia Biológica UN 3373, Categoría B cuando envíe potenciales especímenes 2019-nCoV. Almacene los especímenes a 2-8°C y envíelos durante la noche al CDC en una bolsa de hielo. Si un espécimen está congelado a -70°C o menos, envíelo durante la noche al CDC en hielo seco.
- Almacenamiento de especímenes
 - ! Los especímenes pueden ser almacenados a 2-8°C hasta 72 horas después de su recolección.
 - ! Si se espera un retraso en la extracción, almacene los especímenes a -70°C o menos.

! El ácido nucleico extraído debe ser almacenado a -70°C o menos.

Remisión de la muestra al CDC

Para los laboratorios de salud pública estatales y locales:

- ! Envíe todos los especímenes durante la noche al CDC.
- ! Envíe los especímenes congelados en hielo seco y los no congelados en paquetes fríos.
- ! Consulte a la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA - www.iata.org) para conocer los requisitos para el envío de muestras biológicas humanas o potencialmente infecciosas. Siga las regulaciones de envío para la Sustancia Biológica UN 3373, Categoría B cuando envíe potenciales especímenes 2019-nCoV.
- ! Antes del envío, notifique a la División de Enfermedades Virales de los CDC (ver información de contacto abajo) que está enviando muestras.
- ! Envíe todas las muestras al siguiente destinatario:

Centros para el Control y la Prevención de
Enfermedades c/o STATT
Atención: Unidad 66
1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30329-4027
Teléfono: (404) 639-3931

**El número de contacto de emergencia del Centro de Operaciones de
Emergencia del CDC (EOC) es 770-488-7100.**

Todos los demás laboratorios que están certificados por la CLIA y cumplen los requisitos para realizar pruebas de alta complejidad:

- ! Por favor, notifique a su laboratorio de salud pública estatal y/o local para la remisión de muestras y la orientación de las pruebas de confirmación.

Preparación de reactivos y controles

NOTA: La información de almacenamiento es para los materiales obtenidos a través del Recurso Reactivo Internacional del CDC. Si se utilizan productos comerciales para las pruebas, por favor, consulte las instrucciones del fabricante para el almacenamiento, manejo y preparación.

Preparación de la sonda y el cebador:

- 1) Al recibirlas, almacene los cebadores y las sondas secas a 2-8°C.
- 2) Precauciones: Estos reactivos sólo deben manipularse en una zona limpia y almacenarse a temperaturas adecuadas (véase más abajo) en la oscuridad. Deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación. Mantener el frío cuando se descongele.
- 3) Utilizando la técnica aséptica, suspenda los reactivos secos en 1,5 mL de agua libre de nucleasas y déjelos rehidratar durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 4) Mezcle suavemente y alícuotas de primers/sonda en 300 volúmenes de µL en 5 tubos pre-etiquetados. Almacene una única alícuota de trabajo de los primers/sondas a 2-8°C en la oscuridad. Almacene las alícuotas restantes en

≤ -20°C en un congelador no libre de heladas. No vuelva a congelar alícuotas descongeladas (estable hasta 4 meses a 2-8°C).

Preparación de Control Positivo 2019-nCoV (nCoVPC):

- 1) Precauciones: Este reactivo debe manipularse con precaución en una zona dedicada a la manipulación de ácido nucleico para evitar una posible contaminación. Deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación. Mantener en hielo cuando se descongele.
- 2) Resuspender el reactivo seco en cada tubo en 1 mL de agua libre de nucleasas para lograr el adecuado concentración. Hacer alícuotas de un solo uso (aproximadamente 30 µL) y almacenarlas en $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- 3) Descongelar una sola alícuota de control positivo diluido para cada experimento y mantenerla en hielo hasta que se añada al plato. Deseche cualquier porción no utilizada de la alícuota.

Control de especímenes humanos (HSC) (no se proporciona):

- 1) El Control de Especímenes Humanos (HSC) o uno de los controles de extracción alternativos aceptables enumerados debe ser extraído y procesado con cada ejecución de extracción de especímenes.
- 2) Consulte el prospecto del Control de Especímenes Humanos (HSC) para las instrucciones de uso.

No hay control de plantilla (NTC) (no se proporciona):

- 1) Agua estéril y sin nucleasas
- 2) Alícuota en pequeños volúmenes
- 3) Se utiliza para comprobar si hay contaminación durante la extracción de la muestra y/o la colocación de la placa

Preparación general

Preparación del equipo

Limpie y descontamine todas las superficies de trabajo, pipetas, centrífugas y otros equipos antes de su uso. Se deben utilizar agentes de descontaminación, incluyendo 10% de lejía, 70% de etanol, y DNAzap™, o RNase ^{AWAY™} para minimizar el riesgo de contaminación con ácido nucleico.

Extracción de ácido nucleico

NOTA: Las instrucciones de extracción a continuación son para su uso cuando se prueban especímenes individuales SOLAMENTE. Cuando se agrupen los especímenes, consulte el Apéndice B para ver las instrucciones de extracción modificadas.

El rendimiento del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV depende de la cantidad y calidad del ARN patrón purificado de los especímenes humanos. Los siguientes kits y procedimientos de extracción de ARN disponibles en el mercado han sido calificados y validados para la recuperación y la pureza del ARN para su uso con el panel:

Qiagen QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit o QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Recomendación(es): Utilizar 100 µL de muestra y eluir con 100 µL de tampón o utilizar 140 µL de muestra y eluir con 140 µL de tampón.

Qiagen EZ1 Avanzado XL

Kit: Kit de virus Qiagen EZ1 DSP y Buffer AVL (suministrado por separado) para la tarjeta de lisis externa: Tarjeta del virus DSP EZ1 Advanced XL

Recomendación(es): Añadir 120 µL de muestra a 280 µL de AVL de búfer prealiquitado (muestra de entrada total volumen es de 400 µL). Proceda a la extracción en el EZ1 Advanced XL. El volumen de elución es de 120 µL.

Kit: Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 y Buffer AVL (suministrado por separado) para la tarjeta de lisis fuera de borda: Tarjeta de virus EZ1 Advanced XL v2.0

Recomendación(es): Añadir 120 µL de muestra a 280 µL de AVL de búfer prealiquitado (muestra de entrada total volumen es de 400 µL). Proceda a la extracción en el EZ1 Advanced XL. El volumen de elución es de 120 µL.

Roche MagNA Pure 96

Kit: Roche MagNA Pure 96 DNA y Viral NA Kit de pequeño volumen

Protocolo: Recomendación(es) del protocolo Viral NA Plasma Ext LysExt Lys SV 4.0 o del protocolo

Viral NA Plasma Ext Lys SV: Añadir 100 µL de muestra a 350 µL de tampón de análisis externo prealculado (suministrado por separado) (el volumen total de la muestra de entrada es de 450 µL).

Proceda a la extracción en el MagNA Puro 96. (**Control Interno = Ninguno**). El volumen de elución es de 100 µL.

Roche MagNA Pure 24

Kit: Protocolo del Kit de Aislamiento de NA de

Roche MagNA Pure 24 Total: Protocolo

Patógeno 1000 2.0

Recomendación(es): Añadir 100 µL de muestra a 400 µL de tampón de lisis externa prealiquitado (suministrado por separado) (el volumen total de la muestra de entrada es de 500 µL). Proceda con la extracción en el MagNA Pure 24. (**Control Interno = Ninguno**). El volumen de elución es de 100 µL.

Promega Maxwell® RSC 48 y Maxwell® CSC 48

Kit: Protocolo del kit de purificación de ácido nucleico total

viral Promega Maxwell®: Ácido nucleico total viral

Recomendación(es): Añadir 120 µL de muestra a 330 µL de tampón de lisis externa prealiquitado (300 µL de tampón de lisis más 30 µL de proteinasa K; suministrado en el kit) (el volumen total de entrada es de 450 µL). Proceda con la extracción en el Maxwell® RSC 48. El volumen de elución es de 75 µL.

La equivalencia y el rendimiento de las siguientes plataformas de extracción se demostraron con el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del Virus de la Gripe Humana de los CDC (K190302) y, en base a esos datos, son aceptables para su uso con el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV.

QIAGEN QIAcube

Kit: QIAGEN QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit o QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Recomendaciones: Utilizar 140 µL de muestra y eluir con 100 µL de tampón.

Roche MagNA Pure LC

Kit: Protocolo del kit de ácido nucleico total
puro de Roche MagNA: NA total
Lisis_externa

Recomendación(es): Añadir 100 µL de muestra a 300 µL de tampón de lisis del kit de aislamiento de ATN prealiquitado (el volumen total de la muestra de entrada es de 400 µL). El volumen de elución es de 100 µL.

Roche MagNA Pure Compact

Kit: Protocolo del Kit de Aislamiento de Ácido
Nucleico Puro de Roche MagNA I:
Total_NA_Plasma100_400

Recomendación(es): Añadir 100 µL de muestra a 300 µL de tampón de lisis del kit de aislamiento de ATN prealiquitado (el volumen total de la muestra de entrada es de 400 µL). El volumen de elución es de 100 µL.

bioMérieux NucliSENS® easyMAG® Instrumento

Protocolo: Protocolo general (no para la sangre) utilizando los ajustes del reactivo "Off-board Lysis". Recomendación(es): Añadir 100 µL de muestra a 1000 µL de tampón de lisis easyMAG prealiquitado (el volumen total de muestra de entrada es de 1100 µL). Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente.
El volumen de la elución es de 100 µL.

Instrumento EMAG® de bioMérieux

Protocolo: Protocolo personalizado: Gripe **V1 del CDC** usando la configuración del reactivo "Off-board Lysis". Recomendación(es): Añadir 100 µL de muestras a 2000 µL de tampón de lisis easyMAG prealiquitado (el volumen total de la muestra de entrada es de 2100 µL). Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. El volumen de elución es de 100 µL. El protocolo personalizado, **CDC Flu V1**, se programa en el instrumento EMAG® de bioMérieux con la asistencia de un representante del servicio de bioMérieux. La verificación de la instalación se documenta en el momento de la instalación. Se recomienda que los laboratorios conserven un registro de la verificación paso a paso del procedimiento de instalación del protocolo personalizado de bioMérieux.

Para la extracción de muestras se seguirán los procedimientos recomendados por el fabricante (excepto los indicados en las recomendaciones anteriores). Las HSC deben incluirse en cada lote de extracción.

Descargo de responsabilidad: Los nombres de los vendedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados. La inclusión no implica el respaldo de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Preparación del ensayo

Mezcla del maestro de reacción y montaje de la placa

Nota: La configuración de la placa puede variar con el número de muestras y la organización del día de trabajo. Los NTC y los nCoVPC deben ser incluidos en cada corrida.

- 1) En la sala de preparación de reactivos, limpie la campana, coloque el buffer de rRT-PCR, la enzima y las sondas en hielo o en bloque frío. Mantenga el frío durante la preparación y el uso.
- 2) Mezcla el tampón, la enzima y el cebador/sonda por inversión 5 veces.
- 3) Centrifugar los reactivos y los primers/sondas durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo, y luego colocar el tubo en un estante frío.
- 4) Etiqueta un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL por cada juego de cebadores/sondas.

- 5) Determinar el número de reacciones (N) a establecer por ensayo. Es necesario hacer un exceso de mezcla de reacciones para las reacciones NTC, nCoVPC, HSC (si se incluyen en la ejecución de rRT-PCR) y RP y para el error de pipeteo. Utilice la siguiente guía para determinar N:
- ! Si el número de muestras (n) incluyendo los controles es igual a 1 a 14, entonces $N = n + 1$
 - ! Si el número de muestras (n), incluidos los controles, es 15 o más, entonces $N = n + 2$
- 6) Para cada conjunto de cebador/sonda, calcula la cantidad de cada reactivo que debe añadirse para cada mezcla de reacción ($N = \#$ de reacciones).

Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix

Paso #	Reactivo	Volumen de reactivo añadido por reacción
1	Agua libre de nucleasas	N x 8,5 µL
2	Mezcla combinada de imprimación/sonda	N x 1,5 µL
3	TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4x)	N x 5.0 µL
	Volumen total	N x 15.0 µL

Sonda GoTaq® de Promega Sistema RT-qPCR de 1 paso

Paso #	Reactivo	Volumen de reactivo añadido por reacción
1	Agua libre de nucleasas	N x 3,1 µL
2	Mezcla combinada de imprimación/sonda	N x 1,5 µL
3	Sonda GoTaq qPCR Master Mix con dUTP	N x 10.0 µL
4	Go Script RT Mix para RT-qPCR de 1 paso	N x 0,4 µL
	Volumen total	N x 15.0 µL

Quantabio qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix

Paso #	Reactivo	Volumen de reactivo añadido por reacción
1	Agua libre de nucleasas	N x 3,5 µL
2	Mezcla combinada de imprimación/sonda	N x 1,5 µL
3	qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix(2X)	N x 10.0 µL
	Volumen total	N x 15.0 µL

Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)

Paso #	Reactivo	Volumen de reactivo añadido por reacción
1	Agua libre de nucleasas	N x 8,5 µL
2	Mezcla combinada de imprimación/sonda	N x 1,5 µL
3	UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)	N x 5.0 µL
	Volumen total	N x 15.0 µL

- 7) Dispense reactivos en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con su respectiva etiqueta. Después de añadir los reactivos, mezcle las mezclas de reacción pipeteando hacia arriba y hacia abajo. **No lo haga en vórtex.**
- 8) Centrifugar durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo, y luego colocar el tubo en un estante frío.
- 9) Coloca los tubos o placas de reacción en un estante refrigerador de 96 pozos.
- 10) Dispensar 15 µl de cada mezcla maestra en los pozos apropiados que atraviesan la fila como se muestra a continuación (**Figura 1**):

Figura 1: Ejemplo de configuración de la placa de mezcla del maestro de reacción

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

- 11) Antes de pasar al área de manejo de ácido nucleico, prepare las reacciones de Control de No Plantilla (NTC) para la columna #1 en el área de preparación del ensayo.
- 12) Pipetee 5 µL de agua libre de nucleasas en los pozos de muestra de NTC (**Figura 2**, columna 1). Tapar bien los pozos NTC antes de proceder.
- 13) Cubrir toda la placa de reacción y mover la placa de reacción al área de manejo del ácido nucleico del espécimen.

Adición de plantillas de ácido nucleico

- 1) Vortice suavemente los tubos de muestra de ácido nucleico durante aproximadamente 5 segundos.
- 2) Centrifugar durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo.
- 3) Después de la centrifugación, coloque los tubos de muestra de ácido nucleico extraído en el estante frío.

- 4) Las muestras deben añadirse a las columnas 2-11 (las columnas 1 y 12 son para los controles) al ensayo específico que se está probando, como se ilustra en la **figura 2**. Con cuidado, pipetee 5,0 µl de la primera muestra en todos los pozos etiquetados para esa muestra (es decir, la muestra "S1" en la columna 2). *Mantenga cubiertos los demás pocillos de la muestra durante la adición. Cambie las puntas después de cada adición.*
- 5) Tapar firmemente la columna a la que se ha añadido la muestra para evitar la contaminación cruzada y asegurar el seguimiento de la muestra.
- 6) Cámbiese los guantes a menudo y cuando sea necesario para evitar la contaminación.
- 7) Repita los pasos #4 y #5 para las muestras restantes.
- 8) Si es necesario, añada 5 µL de muestra extraída del Control de Especímenes Humanos (HSC) a los pozos de HSC (**Figura 2**, columna 11). Tapar bien los pozos después de la adición. **NOTA:** Según las regulaciones de la CLIA, el HSC debe ser analizado al menos una vez al día.
- 9) Cubre toda la placa de reacción y muévela a la zona de manejo del control positivo de la plantilla.

Adición de control de ensayos

- 1) Pipetee 5 µl de ARN de nCoVPC a los pozos de muestra de la columna 12 (**Figura 2**). **Tapar bien** los pozos después de añadir el ARN de control.
NOTA: *Si se utilizan tiras de 8 tubos, etiquetar el TAB de cada tira para indicar la posición de la muestra. ¡NO ETIQUETEN LA PARTE SUPERIOR DE LOS TUBOS DE REACCIÓN!*
- 2) Centrifugue brevemente las tiras del tubo de reacción durante 10-15 segundos. Después de la centrifugación vuelva a la estantería fría.
NOTA: *Si se utilizan placas de 96 pozos, centrifugar las placas durante 30 segundos a 500 x g, 4°C.*

Figura 2. Panel de diagnóstico 2019-nCoV rRT-PCR: Ejemplo de configuración de muestra y control

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11a	12
A	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
B	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
C	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
D												
E												
F												
G												
H												

^aSustituir la muestra en esta columna con HSC extraída si es necesario

**Crear una plantilla de ejecución en el instrumento de PCR en tiempo real
Applied Biosystems 7500 Fast Dx (requerido si no existe una
plantilla)**

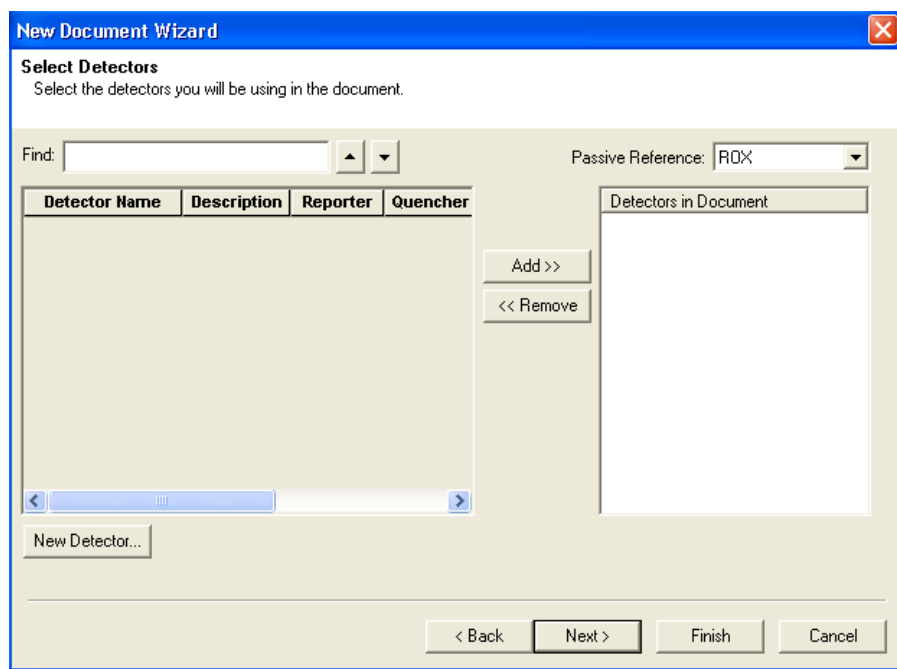
Si la plantilla ya existe en su instrumento, por favor proceda a la sección de EJECUCIÓN DE UNA PRUEBA.

- 1) Lance el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx haciendo doble clic en el icono de Applied Biosystems 7500 Fast Dx System en el escritorio.
- 2) Debería aparecer una nueva ventana, seleccione **Crear nuevo documento** en el menú.

Figura 3. Ventana del Asistente para nuevos documentos

- 3) **Aparecerá** la pantalla del Asistente para **nuevos documentos en la Figura 3**. Seleccione:
 - a. Ensayo: Curva **estándar (cantidad absoluta)**
 - b. **Contenedor: 96-Well Clear**
 - c. Plantilla: **Documento en blanco**
 - d. Modo de ejecución: **Estándar 7500**
 - e. Operadora: ***Su nombre***
 - f. Comentarios: **SDS v1.4**
 - g. Nombre de la placa: ***Su elección***
- 4) Después de hacer las selecciones, haga clic en **Siguiente** en la parte inferior de la ventana.

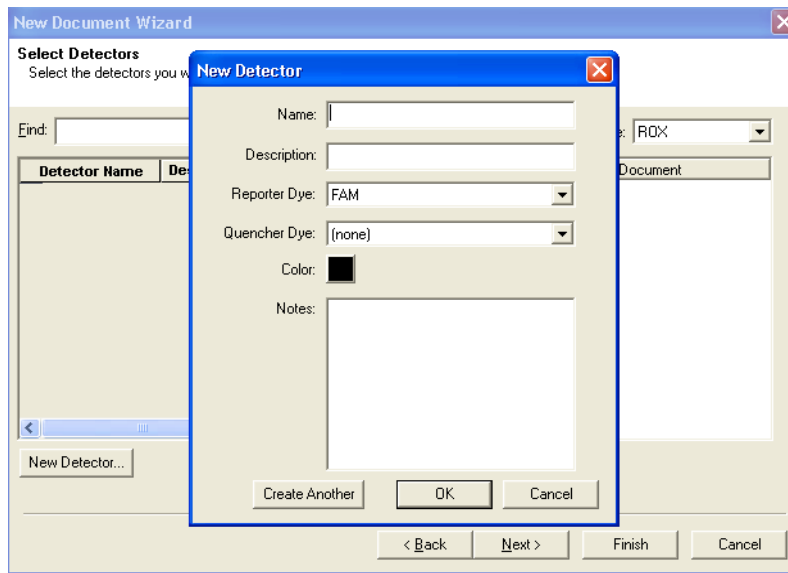
Figura 4. Creación de nuevos detectores



NOTA: ROX es la referencia pasiva por defecto. Esto se cambiará a "ninguno" en el paso 12.

- 5) Después de seleccionar el siguiente, aparecerá la pantalla de selección de **detectores (Figura 4)**.
- 6) Haga clic en el botón **Nuevo detector** (ver **Figura 4**).
- 7) Aparecerá la ventana del **Nuevo Detector (Figura 5)**. Habrá que definir un nuevo detector para cada conjunto de cebadores y sondas. La creación de estos detectores le permitirá analizar cada conjunto de cartillas y sondas individualmente al final de la reacción.

Figura 5. Nueva ventana del detector



- 8) Empieza por crear el Detector N1. Incluye lo siguiente:
 - a. Nombre: **N1**
 - b. Descripción: *dejar en blanco*
 - c. Reportero Dye: **FAM**
 - d. Tintura de apagado: **(ninguno)**
 - e. Color: *para cambiar el color del indicador del detector haga lo siguiente:*
 Haga clic en el cuadro de color para revelar la carta de colores
 Seleccione un color haciendo clic en uno de los cuadrados
 Después de seleccionar un color, haga clic en **OK** para volver a la pantalla del Nuevo Detector
 - f. Haga clic en el botón Aceptar de la pantalla Nuevo detector para volver a la pantalla que se muestra en la **Figura 4**.
- 9) Repita el paso 6-8 para cada objetivo en el panel.

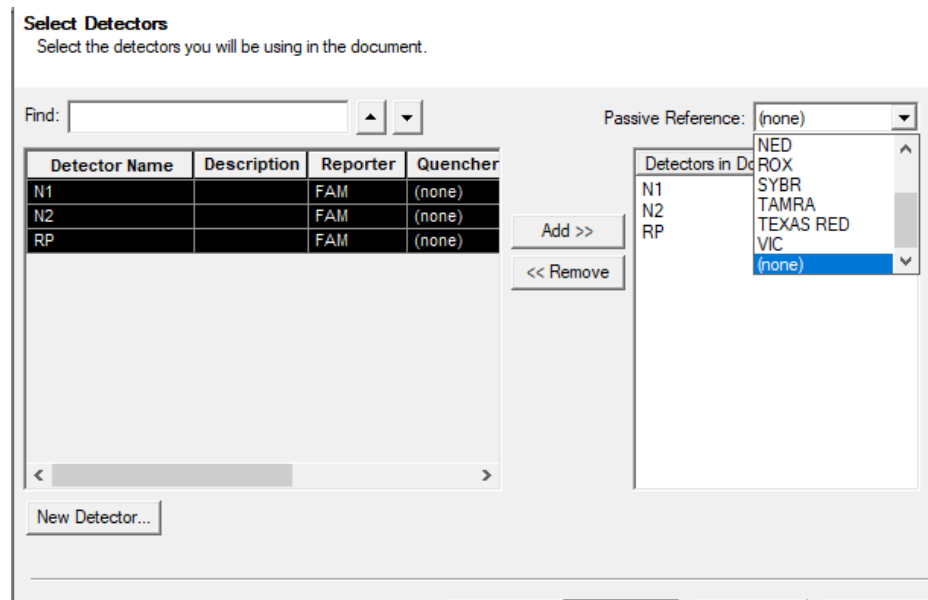
Nomb re	Tintura de reportero	Tintura de apagado
N1	FAM	(ninguno)
N2	FAM	(ninguno)
RP	FAM	(ninguno)

- 10) Después de añadir cada detector, los campos **Nombre del detector**, **Descripción**, **Reportero** y **Quencher** se rellenarán en la pantalla **Seleccionar detectores** (Figura 6).
- 11) Antes de proceder, los detectores recién creados deben ser añadidos al documento. Para agregar los nuevos detectores al documento, haga clic en **ADD** (ver Figura 6). Los nombres de los detectores aparecerán en el lado derecho de la ventana de selección de detectores (Figura 6).

Figura 6. Añadir nuevos detectores al documento

- 12) Una vez que se hayan añadido todos los detectores, seleccione **(ninguno)** para la Referencia **Pasiva** en el menú desplegable superior derecho (Figura 7).

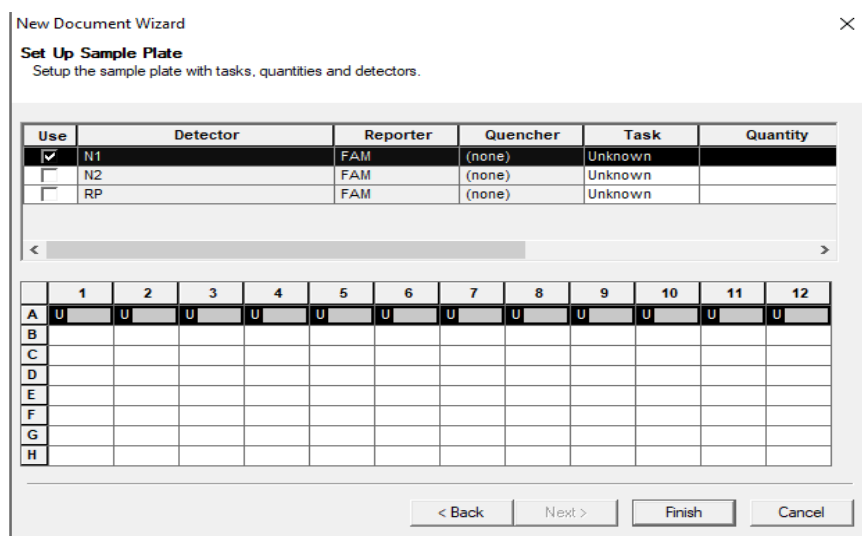
Figura 7. Seleccione la referencia pasiva



La referencia pasiva debe establecerse en "(ninguno)" como se describe anteriormente.

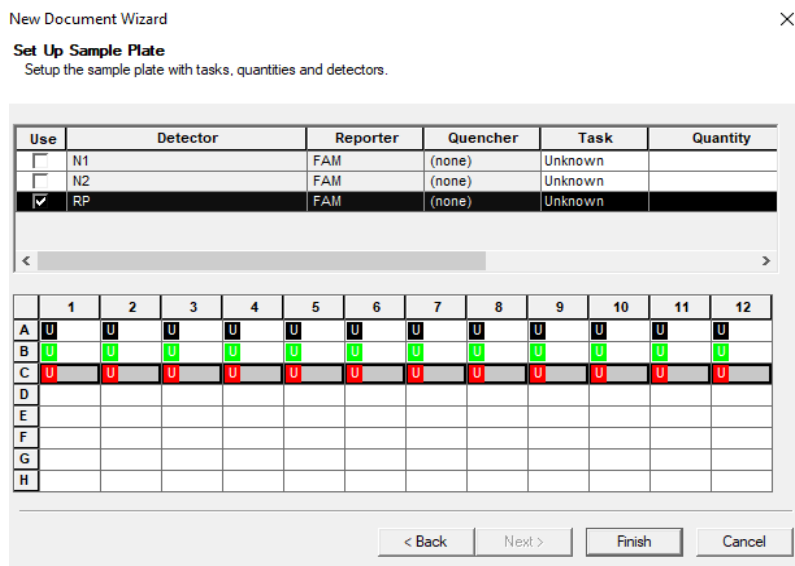
- 13) Haga clic en **Next en la** parte inferior de la ventana **Select Detectors** para proceder a la configuración de la **placa de muestra (Figura 8)**.
- 14) En la ventana Configurar placa de **muestra (Figura 8)**, utilice el ratón para seleccionar la fila A de la parte inferior de la ventana, en la hoja de cálculo (véase la **Figura 8**).
- 15) En la parte superior de la ventana, seleccione el detector **N1**. Aparecerá una marca de verificación junto al detector que ha seleccionado (**Figura 8**). También notarás que la fila en la hoja de cálculo se llenará con un ícono "U" de color para indicar qué detector has seleccionado.
- 16) Repita los pasos 14-15 para cada detector que se utilice en el ensayo.

Figura 8. Montaje del plato de muestra



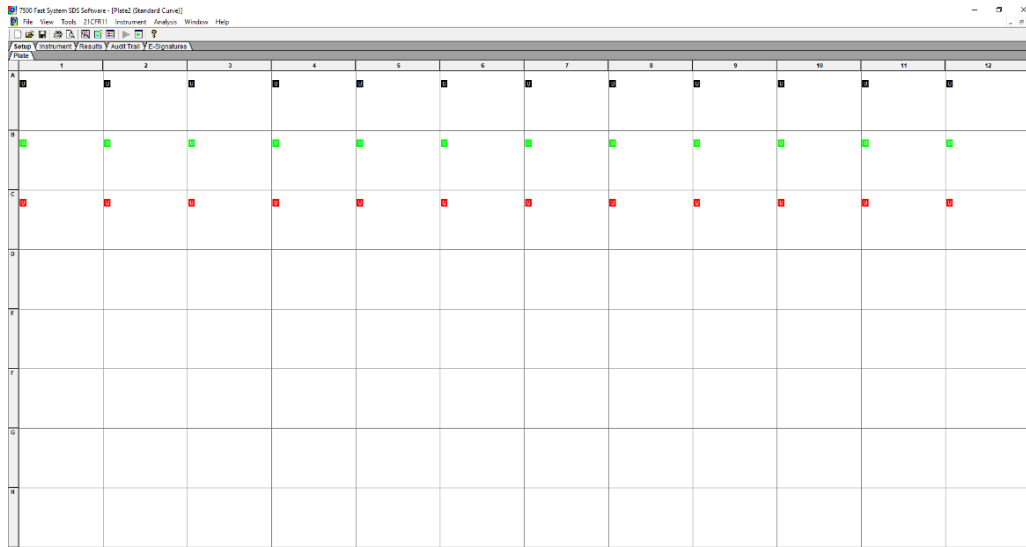
- 17) Seleccione **Terminar** después de que los detectores hayan sido asignados a sus respectivas filas. (**Figura 9**).

Figura 9. Instalación de la placa terminada



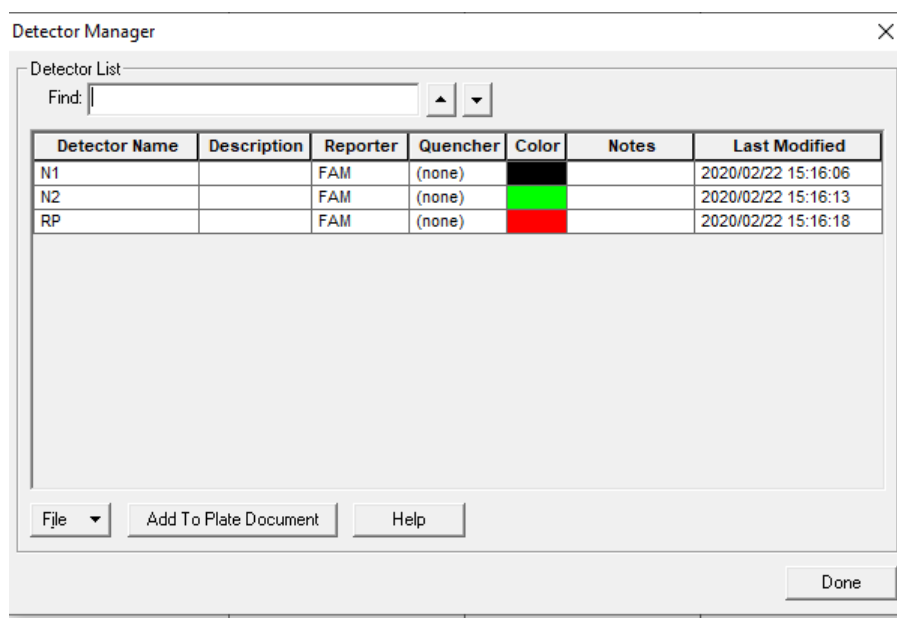
- 18) Después de pulsar "Finalizar", habrá una breve pausa que permitirá que el Applied Biosystems 7500 Fast Dx se inicialice. Esta inicialización es seguida por un ruido de clic. **Nota: La máquina debe estar encendida para la inicialización.**
- 19) Después de la inicialización, aparecerá la pestaña **Placa** de la Configuración (**Figura 10**).
- 20) Cada pozo de la placa debe contener iconos U de color que se correspondan con las etiquetas del detector que se eligieron previamente. Para confirmar las asignaciones de los detectores, seleccione **Herramientas** en el menú de archivos, y luego seleccione **Administrador de detectores**.

Figura 10. Ventana de configuración de la placa



- 21) Aparecerá la ventana del Detector Manager (**Figura 11**).

Figura 11. Ventana del administrador del detector



22) Confirme que todos los detectores están incluidos y que cada objetivo tiene un **Reportero** fijado en **FAM** y el

El apagado está fijado en **(ninguno)**.

23) Si todos los detectores están presentes, seleccione **Hecho**. La información del detector ha sido creada y asignada a los pozos de la placa.

Definición de los ajustes del instrumento

- 1) Después de que se hayan creado y asignado los detectores, proceda a la instalación de los instrumentos.
- 2) Seleccione la pestaña **Instrumento** para definir las condiciones del ciclo térmico.
- 3) Modifique las condiciones de los ciclos térmicos de la siguiente manera (**Figura 12**):

Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG

- a. En la Etapa 1, ajustada a 2 min. a **25°C; 1 Rep.**
- b. En la Etapa 2, ajustada a 15 min. a **50°C; 1 Rep.**
- c. En la Etapa 3, ajustada a 2 min. a **95°C, 1 Rep.**
- d. En la etapa 4, el paso 1 se fijó en **3 seg.** a **95°C.**
- e. En la etapa 4, el paso 2 se fijó en **30 seg.** a **55,0°C.**
- f. En la etapa 4, los Reps deben ser fijados en **45.**
- g. En **Ajustes (Figura 12)**, cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- h. En **Ajustes**, la selección del **modo de ejecución** debe ser **Standard 7500.**
- i. El paso 2 de la Etapa 4 debe resaltarse en amarillo para indicar la recopilación de datos (véase la **figura 12**).

O

Quantabio qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix o UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)

- a. En la Etapa 1, ajustada a 10 min. a **50°C; 1 Rep.**
- b. En la Etapa 2, ajustada a 3 min. a **95°C, 1 Rep.**
- c. En la etapa 3, el paso 1 se fijó en **3 seg.** a **95°C.**
- d. En la etapa 3, el paso 2 se fijó en **30 seg.** a **55,0°C.**
- e. En la Etapa 3, los Reps deben ser fijados en **45.**
- f. En **Ajustes (Figura 12)**, cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- g. En **Ajustes**, la selección del **modo de ejecución** debe ser **Standard 7500.**
- h. El paso 2 de la Etapa 3 debe resaltarse en amarillo para indicar la recopilación de datos (véase la **figura 12**).

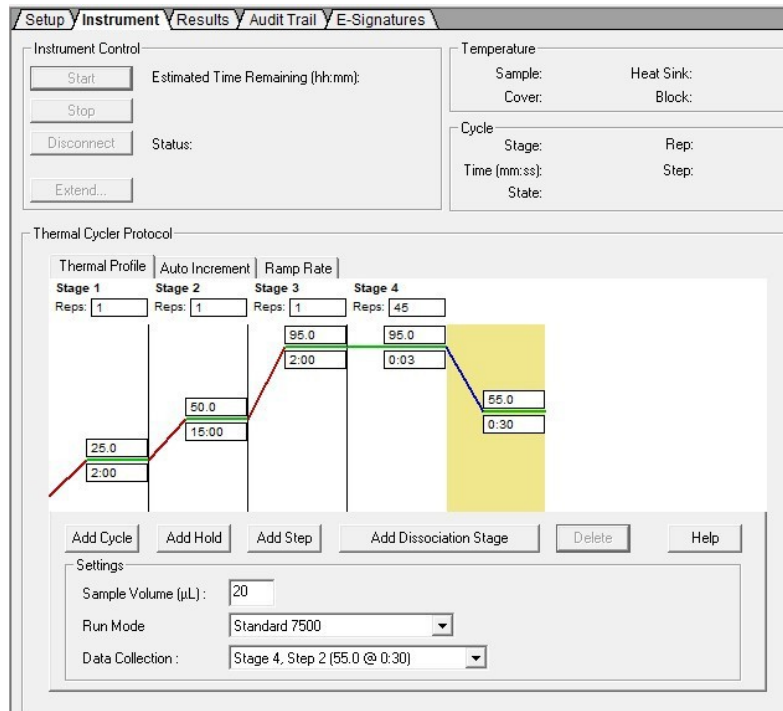
O

Sistema de RT-qPCR de 1 paso de la sonda GoTaq® de Promega

- a. En la Etapa 1, ajustada a 15 min. a **45°C; 1 Rep.**
- b. En la Etapa 2, ajustada a 2 min. a **95°C, 1 Rep.**

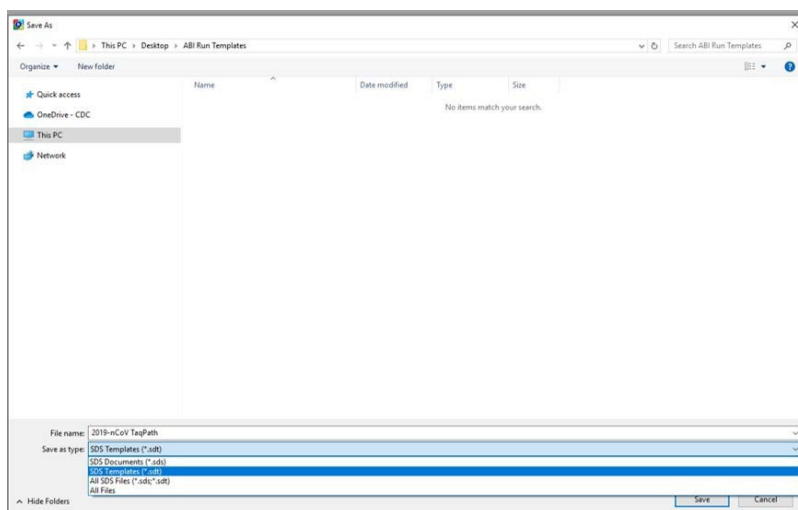
- c. En la etapa 3, el paso 1 se fijó en **3 seg.** a **95°C.**
- d. En la etapa 3, el paso 2 se fijó en **30 seg.** a **55,0°C.**
- e. En la Etapa 3, los Repts deben ser fijados en **45.**
- f. En **Ajustes (Figura 12)**, cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- g. En **Ajustes**, la selección del **modo de ejecución** debe ser **Standard 7500.**
- h. El paso 2 de la Etapa 3 debe resaltarse en amarillo para indicar la recopilación de datos (véase la **figura 12**).

Figura 12. Ventana de instrumentos



- 4) Después de hacer cambios en la pestaña de **Instrumentos**, el archivo de plantilla está listo para ser guardado. Para guardar la plantilla, seleccione **Archivo** en el menú superior y luego seleccione **Guardar como**. Dado que las opciones de enzimas tienen diferentes configuraciones de instrumentos, se recomienda guardar la plantilla con un nombre que indique la opción de enzimas.
- 5) Guarde la plantilla como **2019-nCoV Dx Panel TaqPath** o **2019-nCoV Dx Panel Quanta** o **2019-nCoV Dx Panel Promega** según corresponda en la carpeta del escritorio denominada "**ABI Run Templates**" (*debe crear esta carpeta*). Guardar como tipo debe ser SDS Templates (*.sdt) (**Figura 13**).

Figura 13. Plantilla de ahorro



Ejecutando una prueba

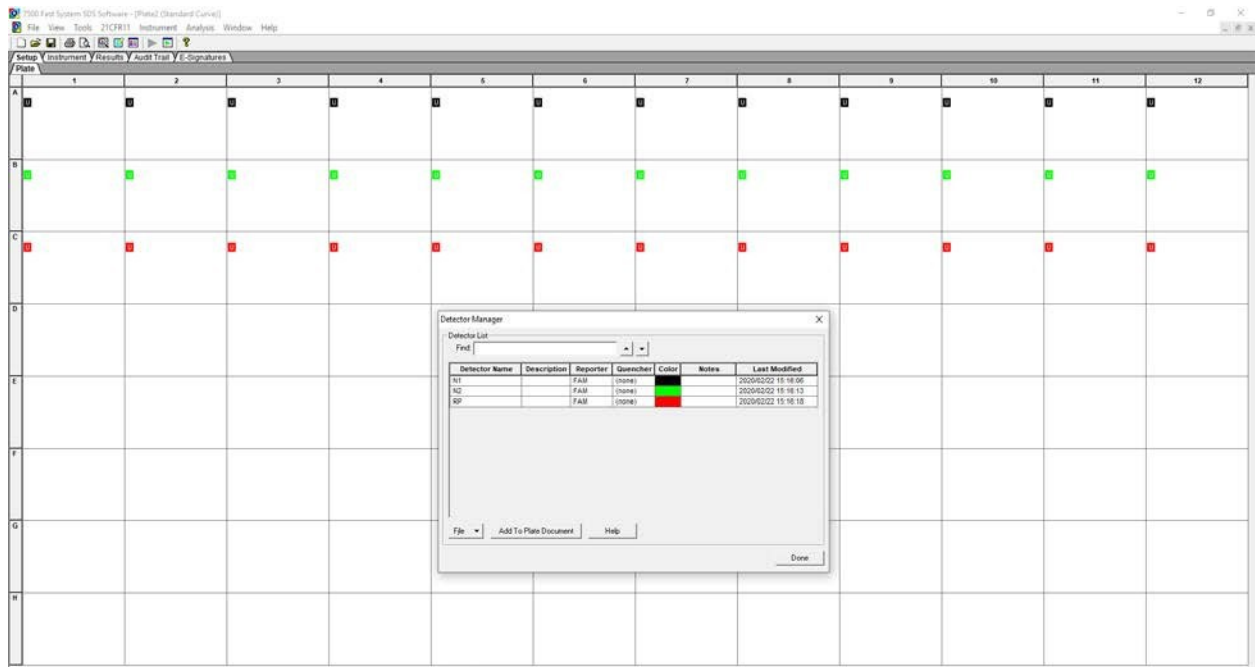
- 1) Enciende el instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx.
- 2) Lance el Sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx haciendo doble clic en el icono del 7500 Fast Dx System en el escritorio.
- 3) Debería aparecer una nueva ventana, seleccione **Abrir documento existente** en el menú.
- 4) Navegue para seleccionar su carpeta de ABI Run Template del escritorio.
- 5) Haga doble clic en el archivo de plantilla apropiado (**2019-nCoV Dx Panel TaqPath** o **2019-nCoV Dx Panel Quanta** o **2019-nCoV Dx Panel Promega**)
- 6) Habrá una breve pausa para que el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx se inicialice. Esta inicialización es seguida por un ruido de clic. **Nota: La máquina debe estar encendida para la inicialización.**

Figura 14. Ventana de montaje de la placa



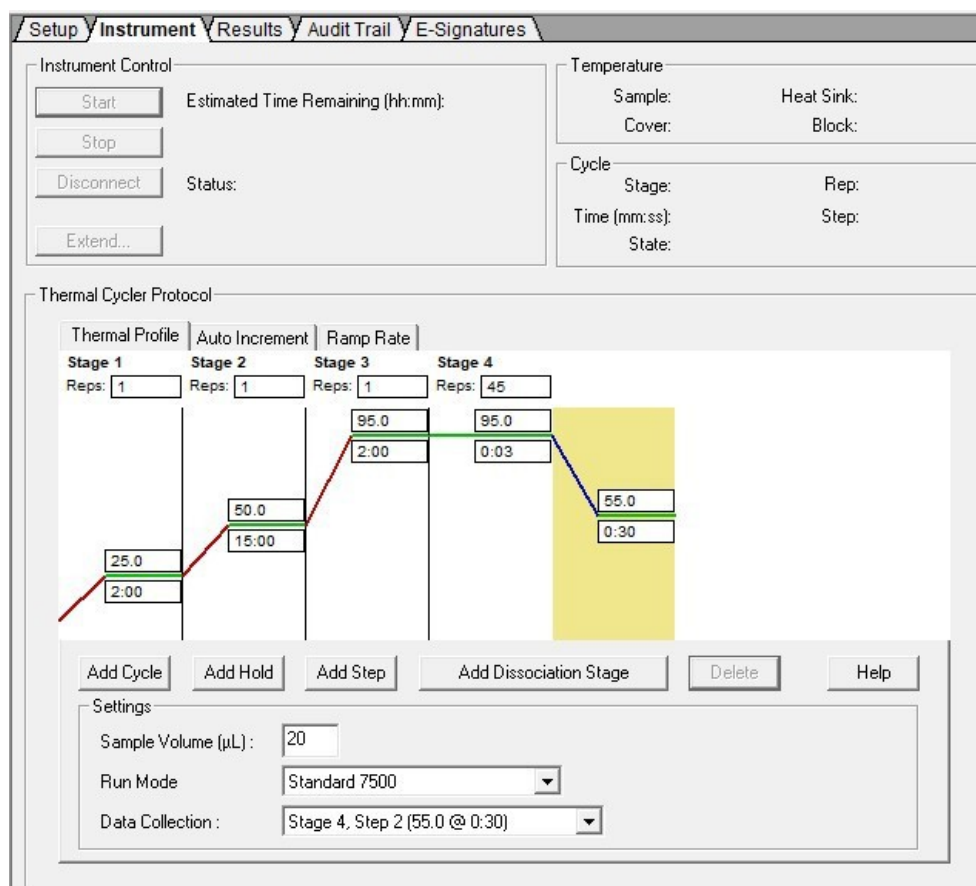
- 7) Después de que el instrumento se inicialice, aparecerá un mapa de placas (**Figura 14**). Los detectores y controles ya deben estar etiquetados como se asignaron en la plantilla original.
- 8) Haga clic en el **Inspector de pozos** del menú icon superior.
- 9) Destaca los pozos de interés en el mapa de la placa.
- 10) Escriba los identificadores de la muestra en la casilla Nombre de la muestra en la ventana **Inspector de pozos** (**Figura 15**).

Figura 15. Pozos de etiquetado



- 11) Repita los pasos 9-10 hasta que todos los identificadores de la muestra se añadan a la configuración de la placa.
- 12) Una vez que todos los identificadores de control y de muestra se añadan, pulse el botón **Cerrar del Inspector de Pozos** para volver a la pestaña de configuración de la **placa**.
- 13) Haga clic en la pestaña "**Instrumento**" en la esquina superior izquierda.
- 14) Las condiciones de la reacción, los volúmenes y el tipo de reacción de 7500 deben estar ya cargados (**Figura 16**).

Figura 16. Ajustes del instrumento



- 15) Asegúrese de que los ajustes sean correctos (consulte la sección Definición de *los ajustes del instrumento*).
- 16) Antes de proceder, el archivo de ejecución debe ser guardado; desde el menú principal, seleccione **Archivo**, y luego **Guardar como**. Guardar en la designación apropiada de la carpeta de ejecución.
- 17) Cargue la placa en el soporte de la placa en el instrumento. Asegúrese de que la placa esté correctamente alineada en el soporte.
- 18) Una vez que se haya guardado el archivo de ejecución, haga clic en el botón Inicio. *Nota: La ejecución debería tomar aproximadamente 1 hora y 20 minutos para completarse.*

Análisis de datos

- 1) Una vez que la ejecución se haya completado, seleccione la pestaña **Resultados** en la esquina superior izquierda del software.
- 2) Seleccione la pestaña **Amplification Plot** para ver los datos en bruto (**Figura 17**).

Figura 17. Ventana de diagrama de amplificación

a

e

- 3) Empiece resaltando todas las muestras de la tirada; para ello, haga clic en la casilla superior izquierda (**a**) de los pozos de muestra (figura 17). Todas las curvas de crecimiento deben aparecer en el gráfico.
- 4) En el lado derecho de la ventana (**b**), la selección del desplegable de **datos** debería estar en **Delta Rn vs. Cycle**.
- 5) Seleccione **N1** de (**c**), el menú desplegable **del Detector**, usando la flecha hacia abajo.
 - a. Tenga en cuenta que cada detector es analizado individualmente para reflejar diferentes perfiles de rendimiento de cada conjunto de cebadores y sondas.
- 6) En el menú desplegable Color de **línea** (**d**), **debe seleccionarse Color de detector**.
- 7) En **Ajustes de análisis** seleccione **Ct** (**e**) **manual**.
 - b. No cambie los números predeterminados de la Línea de **base manual**.
- 8) Con el ratón, haga clic y arrastre la línea roja del umbral hasta que se encuentre dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (**Figura 18**).

Figura 18. Diagrama de amplificación

- 9) Haz clic en el botón **Analizar** en la esquina inferior derecha de la ventana. La línea roja del umbral se convertirá en verde, indicando que los datos han sido analizados.
- 10) Repita los pasos 5-9 para analizar los resultados generados para cada conjunto de marcadores (N1, N2, RP).
- 11) Guarde el archivo de análisis seleccionando **Archivo** y luego Guardar **como en** el menú principal.
- 12) Después de completar el análisis de cada uno de los marcadores, seleccione la pestaña **Informe situada encima** del gráfico para mostrar los valores de Ct (**Figura 19**). Para filtrar el informe por nombre de la muestra en orden ascendente o descendente, simplemente haga clic en Nombre de la **muestra en** la tabla.

Figura 19. Informe

The screenshot shows the '7500 Fast System SDS Software' interface. The main window displays a table with the following columns: Well, Sample Name, Detector, Task, Ct, StdDev Ct, Quantity, Mean Qty, StdDev Qty, Filtered, and Tm. Below the table is a gel electrophoresis image with 12 lanes and 8 rows (A-H). The gel image shows bands in lanes 1-5, with red and green markers indicating specific bands.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	NTC	N1	Unknown	Under						
A2	hCoVPC 1	N1	Unknown	20.2502						
A3	hCoVPC 2	N1	Unknown	20.8418						
A4	hCoVPC 3	N1	Unknown	20.4563						
A5	APC	N1	Unknown	20.4529						
B1	NTC	N2	Unknown	Under						
B2	hCoVPC 1	N2	Unknown	20.8161						
B3	hCoVPC 2	N2	Unknown	21.6637						
B4	hCoVPC 3	N2	Unknown	21.2075						
B5	APC	N2	Unknown	20.445						
C1	NTC	RP	Unknown	Under						
C2	hCoVPC 1	RP	Unknown	20.9166						
C3	hCoVPC 2	RP	Unknown	21.1067						
C4	hCoVPC 3	RP	Unknown	20.7028						
C5	APC	RP	Unknown	25.9688						

Interpretación de los resultados y presentación de informes

Extracción y Control Positivo Resultados e Interpretación

Sin Plantilla de Control (NTC)

La NTC consiste en utilizar agua libre de nucleasas en las reacciones de rRT-PCR en lugar de ARN. Las reacciones de la NTC para todos los conjuntos de cebadores y sondas no deberían mostrar curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral. Si alguna de las reacciones NTC exhibe una curva de crecimiento que cruza el umbral del ciclo, puede haberse producido una contaminación de la muestra. Invalide la corrida y repita el ensayo con estricto apego a las pautas.

2019-nCoV Control Positivo (nCoVPC)

El nCoVPC consiste en ARN transcrito in vitro. El nCoVPC dará un resultado positivo con los siguientes conjuntos de cebadores y sondas: N1, N2 y RP.

Control de Especímenes Humanos (HSC) (Control de Extracción)

Cuando el HSC se ejecuta con el Panel de Diagnóstico CDC 2019-nCoV rRT-PCR (véase la sección anterior sobre Configuración del ensayo), el HSC se utiliza como un control de procedimiento de extracción de ácido nucleico para demostrar la recuperación exitosa del ácido nucleico así como la integridad del reactivo de extracción. El control de las CEH consiste en material de células humanas cultivadas no infecciosas (A549). El ácido nucleico purificado de las CEH debería dar un resultado positivo con el conjunto de cebadores y sondas de RP y resultados negativos con todos los marcadores 2019-nCoV.

Desempeño esperado de los controles incluidos en el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-nCoV

Tipo de control	Externo Nombre de control	Usado para monitorear	2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Valores Ct esperados
Positivo	nCoVPC	Fallo sustancial de los reactivos, incluyendo el cebador y integridad de la sonda	+	+	+	< 40.00 Ct
Negativo	NTC	Reactivo y/o contaminación ambiental	-	-	-	No se ha detectado ninguno.
Extracción	HSC	Fallo en el procedimiento de lisis y extracción, contaminación potencial durante extracción	-	-	+	< 40.00 Ct

Si cualquiera de los controles anteriores no muestra el rendimiento esperado como se describe, el ensayo puede haberse configurado y/o ejecutado de forma incorrecta, o puede haberse producido un mal funcionamiento del reactivo o del equipo. Invalide la ejecución y vuelva a realizar el ensayo.

RNase P (Control de Extracción)

- Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia en la reacción de la RNasa P que crucen la línea de umbral en un plazo de 40,00 ciclos (< 40,00 Ct), indicando así la presencia del gen humano de la RNasa P. El hecho de no detectar la RNase P en cualquier muestra clínica puede indicar:
 - ! La extracción inadecuada de ácido nucleico de los materiales clínicos da lugar a la pérdida de ARN y/o a la degradación del ARN.
 - ! Ausencia de suficiente material celular humano debido a una mala recolección o a la pérdida de integridad de la muestra.
 - ! Montaje y ejecución de ensayos inadecuados.

- ! Mal funcionamiento del reactivo o del equipo.
- Si el ensayo RP no produce un resultado positivo para las muestras clínicas humanas, interprete lo siguiente:
 - ! Si los 2019-nCoV N1 y N2 son positivos incluso en ausencia de un RP positivo, el resultado debe considerarse válido. Es posible que algunas muestras no muestren las curvas de crecimiento de la RNasa P debido al bajo número de células de la muestra clínica original. Una señal negativa de la peste bovina no excluye la presencia del ARN del virus 2019-nCoV en una muestra clínica.
 - ! Si todos los marcadores 2019-nCoV Y_RNase P son negativos para el espécimen, el resultado debe considerarse inválido para el espécimen. Si el espécimen residual está disponible, repita la extracción

procedimiento y repetir la prueba. Si todos los marcadores siguen siendo negativos después de la repetición de la prueba, comunique los resultados como inválidos y, si es posible, se debe recoger una nueva muestra.

2019-nCoV Marcadores (N1 y N2)

- ! Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado, un espécimen se considera negativo si todas las curvas de crecimiento umbral del marcador 2019-nCoV (N1, N2) del ciclo NO cruzan la línea de umbral dentro de los 40.00 ciclos (< 40.00 Ct) Y la curva de crecimiento de la RNase P SI cruza la línea de umbral dentro de los 40.00 ciclos (< 40.00 Ct).
- ! Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado, un espécimen se considera positivo para 2019- nCoV si todas las curvas de crecimiento umbral del marcador 2019-nCoV (N1, N2) de los ciclos cruzan la línea de umbral dentro de los 40.00 ciclos (< 40.00 Ct). La RNasa P puede o no ser positiva como se ha descrito anteriormente, pero el resultado de 2019-nCoV sigue siendo válido.
- ! Cuando todos los controles exhiben el rendimiento esperado y las curvas de crecimiento de los marcadores 2019-nCoV (N1, N2) Y el marcador RNase P NO crucen la curva de crecimiento del umbral del ciclo dentro de 40.00 ciclos (< 40.00 Ct), el resultado es inválido. El ARN extraído del espécimen debe ser reexaminado. Si el ARN residual no está disponible, vuelva a extraer el ARN del espécimen residual y haga otra prueba. Si la muestra reexaminada es negativa para todos los marcadores y la RNasa P, el resultado es inválido y se debe considerar la posibilidad de recoger una nueva muestra del paciente.
- ! Cuando todos los controles muestran el rendimiento esperado y la curva de crecimiento del umbral del ciclo para cualquier marcador (N1 o N2, pero no ambos marcadores) cruza la línea de umbral dentro de 40.00 ciclos (< 40.00 Ct) el resultado no es concluyente. El ARN extraído debe volver a ser analizado. Si no se dispone de ARN residual, volver a extraer el ARN del espécimen residual y volver a probarlo. Si se obtiene el mismo resultado, informe del resultado no concluyente. Consulte con el laboratorio de salud pública de su estado o con el CDC, según corresponda, para solicitar orientación y/o coordinar la transferencia del espécimen para un análisis adicional.
- ! Si el HSC es positivo para N1 o N2, entonces puede haber habido contaminación durante la extracción o el procesamiento de la muestra. Invalide todos los resultados de las muestras extraídas junto con la HSC. Vuelva a extraer los especímenes y el HSC y vuelva a hacer la prueba.

2019-nCoV rRT-PCR Guía de interpretación de los resultados del panel de diagnóstico

La siguiente tabla enumera los resultados esperados para el Panel de Diagnóstico de 2019-nCoV rRT-PCR. Si un laboratorio obtiene resultados inesperados para los controles del ensayo o si se obtienen resultados no concluyentes o inválidos y no pueden resolverse mediante las nuevas pruebas recomendadas, póngase en contacto con los CDC para realizar una consulta y una posible derivación de muestras. Consulte las páginas 13 y 53 para obtener información de referencia y contacto.

2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Resultado Interpretación ^a	Informe	Acciones
+	+	±	2019-nCoV detectado	Positivo 2019-nCoV	Reporte los resultados al CDC y al remitente.
Si sólo uno de los dos objetivos es positivo		±	Resultado no concluyente	Inconcluso	Repita la prueba del ácido nucleico y/o re-extraiga y repita el rRT-PCR. Si el resultado repetido no es concluyente, póngase en contacto con su laboratorio de salud pública o con el CDC para obtener instrucciones para la transferencia de la muestra o más orientación.
-	-	+	2019-nCoV no detectado	No se ha detectado	Informe de los resultados al remitente. Considere la posibilidad de hacer pruebas para otros virus respiratorios. ^b
-	-	-	Resultado inválido	Inválido	Repita la extracción y la rRT-PCR. Si el resultado repetido sigue siendo inválido, considere la posibilidad de recoger un nuevo espécimen del paciente.

^aLos laboratorios deben informar de sus resultados de diagnóstico según corresponda y de conformidad con su sistema específico de presentación de informes.

No se han determinado los tipos de muestras ^bOptimum y el momento de los niveles virales máximos durante las infecciones causadas por el 2019-nCoV. La recolección de múltiples muestras del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el virus. Se debe considerar especialmente la posibilidad de un resultado falso negativo si las exposiciones recientes o la presentación clínica del paciente sugieren que es posible la infección por 2019-nCoV, y las pruebas de diagnóstico para otras causas de enfermedad (por ejemplo, otras enfermedades respiratorias) son negativas. Si se sigue sospechando que existe una infección por 2019-nCoV, se debe considerar la posibilidad de repetir las pruebas en consulta con las autoridades de salud pública.

Control de calidad

- ! Los requisitos de control de calidad deben realizarse de conformidad con los reglamentos o requisitos de acreditación locales, estatales y federales y los procedimientos de control de calidad estándar del laboratorio del usuario. Para más orientación sobre las prácticas de control de calidad apropiadas, véase 42 CFR 493.1256.
- ! Los procedimientos de control de calidad tienen por objeto 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 de kit para asegurar que todos los reactivos y componentes del kit funcionan correctamente.
- ! Las buenas prácticas de laboratorio (cGLP) recomiendan incluir un control de extracción positivo en cada lote de aislamiento de ácido nucleico.
- ! Aunque el HSC no está incluido en el Panel de Diagnóstico de 2019-nCov rRT-PCR, el control de la extracción del HSC debe proceder a través del aislamiento de ácido nucleico por lote de muestras a probar.
- ! Incluya siempre un control negativo de plantilla (NTC) y el control positivo apropiado (nCoVPC) en cada ejecución de amplificación y detección. Todas las muestras clínicas deben ser analizadas para detectar el gen de la RNasa P humana para controlar la calidad y la extracción de las muestras.

Limitaciones

- ! Todos los usuarios, analistas y cualquier persona que informe de los resultados del diagnóstico deben ser capacitados para realizar este procedimiento por un instructor competente. Deben demostrar su capacidad para realizar la prueba e interpretar los resultados antes de realizar el ensayo de forma independiente.
- ! El rendimiento del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de CDC 2019-nCoV sólo se ha establecido en muestras respiratorias superiores e inferiores (como hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, esputo, aspirados de las vías respiratorias inferiores, lavado broncoalveolar y lavado/aspiración nasofaríngea o aspirado nasal).
- ! Los resultados negativos no excluyen la infección por el 2019-nCoV y no deben utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de gestión del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos ni el momento óptimo para los niveles virales máximos durante las infecciones causadas por 2019-nCoV. Puede ser necesario recoger múltiples muestras (tipos y puntos temporales) del mismo paciente para detectar el virus.
- ! Puede producirse un resultado falso negativo si una muestra se recoge, transporta o manipula incorrectamente. También pueden producirse resultados falsos negativos si hay inhibidores de la amplificación presentes en la muestra o si hay un número insuficiente de organismos en la muestra.
- ! Los valores predictivos positivos y negativos dependen en gran medida de la prevalencia. Los resultados falsos negativos son más probables cuando la prevalencia de la enfermedad es alta. Los resultados falsos positivos de las pruebas son más probables cuando la prevalencia es de moderada a baja.

- ! No utilice ningún reactivo después de la fecha de caducidad.
- ! Si el virus muta en la región objetivo de la rRT-PCR, es posible que el 2019-nCoV no se detecte o se detecte de forma menos previsible. Los inhibidores u otros tipos de interferencia pueden producir un resultado falso negativo. No se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de los medicamentos para el resfrío común.
- ! El rendimiento de las pruebas puede verse afectado porque la epidemiología y el espectro clínico de la infección causada por el 2019-nCoV no se conoce completamente. Por ejemplo, es posible que los médicos y los laboratorios no sepan

los tipos óptimos de especímenes para recolectar y, durante el curso de la infección, cuándo es más probable que estos especímenes contengan niveles de ARN viral que puedan ser fácilmente detectados.

- ! La detección de ARN viral puede no indicar la presencia de un virus infeccioso o que el 2019-nCoV es el agente causante de los síntomas clínicos.
- ! La realización de esta prueba no se ha establecido para el seguimiento del tratamiento de la infección por el 2019-nCoV.
- ! La realización de esta prueba no se ha establecido para el análisis de la sangre o los productos sanguíneos para detectar la presencia de 2019-nCoV.
- ! Esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos o virales.

Condiciones de autorización del laboratorio

La Carta de Autorización del Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV, junto con la Hoja de Datos autorizada para Proveedores de Salud, la Hoja de Datos autorizada para Pacientes y el etiquetado autorizado están disponibles en el sitio web de la FDA:

<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnosics-euas>.

Sin embargo, para ayudar a los laboratorios clínicos que utilizan el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real de CDC 2019-nCoV ("su producto" en las condiciones que se indican a continuación), las condiciones de autorización pertinentes se enumeran a continuación:

- ! Los laboratorios autorizados que utilicen su producto incluirán con los informes de los resultados de las pruebas, todas las hojas de datos autorizadas disponibles en el sitio web de los CDC. En circunstancias urgentes, se podrán utilizar otros métodos apropiados para difundir estas Hojas Informativas, que pueden incluir los medios de comunicación.
- ! Los laboratorios autorizados que utilicen su producto lo utilizarán como se indica en el etiquetado autorizado disponible en el sitio web de los CDC. Las desviaciones de los procedimientos autorizados, incluidos los instrumentos RT-PCR autorizados, los métodos de extracción autorizados, los tipos de muestras clínicas autorizadas, los materiales de control autorizados, los demás reactivos auxiliares autorizados y los materiales autorizados necesarios para utilizar su producto no están permitidos en virtud de esta autorización.
- ! Los laboratorios autorizados que reciben los conjuntos de cebadores y sondas fabricados y distribuidos comercialmente e identificados como aceptables en el sitio web de los CDC para su uso con su producto, y que no pueden obtener los materiales autorizados de Control de Especímenes Humanos y Control Positivo para 2019-nCoV (NCoVPC) descritos en el etiquetado autorizado de su producto, pueden utilizar los materiales apropiados identificados como materiales aceptables en el sitio web de los CDC para su uso con su producto.
- ! Los laboratorios autorizados que reciban su producto notificarán a las autoridades de salud pública pertinentes su intención de utilizarlo antes de iniciar las pruebas.

- ! Los laboratorios autorizados que utilicen su producto dispondrán de un proceso para informar de los resultados de las pruebas a los proveedores de atención de la salud y a las autoridades de salud pública pertinentes, según proceda.
- ! Los laboratorios autorizados recogerán información sobre el rendimiento de su producto e informarán al DMD/OHT7-OIR/OPEQ/CDRH (por correo electrónico: CDRH-EUA-Reporting@fda.hhs.gov) y a los CDC (respvirus@cdc.gov) de cualquier sospecha de resultados falsos positivos o falsos negativos y

desviaciones significativas de las características de rendimiento establecidas de la prueba de las que tienen conocimiento.

- ! Los laboratorios autorizados que utilicen estrategias de agrupación de muestras cuando prueben muestras de pacientes con su producto incluirán, junto con los informes de resultados negativos de las pruebas para los pacientes específicos cuyos especímenes hayan sido objeto de la agrupación, un aviso de que la agrupación se utilizó durante las pruebas y que "Los especímenes de pacientes con cargas virales bajas pueden no detectarse en las agrupaciones de muestras debido a la disminución de la sensibilidad de las pruebas agrupadas".
- ! Los laboratorios autorizados que apliquen estrategias de agrupación para el ensayo de muestras de pacientes deben utilizar la "Aplicación y supervisión de los ensayos de muestras agrupadas" disponible en el etiquetado autorizado para evaluar la conveniencia de seguir utilizando esas estrategias sobre la base de las recomendaciones del protocolo.
- ! Los laboratorios autorizados mantendrán registros de las estrategias de agrupación de especímenes aplicadas, incluido el tipo de estrategia, la fecha de aplicación y las cantidades ensayadas, así como los datos sobre los resultados de los ensayos generados como parte del Protocolo de vigilancia de las estrategias de agrupación de especímenes. Durante los primeros 12 meses a partir de la fecha de su creación, esos registros se pondrán a disposición de la Dirección de Desarrollo Forestal en un plazo de 48 horas hábiles (2 días hábiles) para su inspección, previa solicitud, y se pondrán a disposición en un plazo razonable después de 12 meses a partir de la fecha de su creación.
- ! Los laboratorios autorizados informarán de los eventos adversos, incluidos los problemas con el rendimiento o los resultados de sus productos, a MedWatch enviando el formulario 3500 de la FDA en línea (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/medwatch/index.cfm?action=reporting.home>) o llamando al 1-800-FDA-1088.
- ! Todo el personal de laboratorio que utilice la prueba debe estar debidamente capacitado en las técnicas de RT-PCR y utilizar el equipo de protección personal y de laboratorio adecuado al manipular este equipo y utilizar la prueba de acuerdo con el etiquetado autorizado.
- ! Los CDC, IRR, los fabricantes y distribuidores de materiales comerciales identificados como aceptables en el sitio web de los CDC y los laboratorios autorizados que utilizan su producto se asegurarán de que se mantenga cualquier registro asociado con esta EUA hasta que la FDA notifique lo contrario. Dichos registros se pondrán a disposición de la FDA para su inspección si así se solicita.

Características de rendimiento

Rendimiento analítico:

Límite de detección (LoD):

Los estudios de LoD determinan la concentración más baja detectable de 2019-nCoV en la que aproximadamente el 95% de todos (verdadero positivo) se replica la prueba positiva. La LoD se determinó limitando los estudios de dilución con muestras caracterizadas.

La sensibilidad analítica de los ensayos de rRT-PCR contenidos en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019- nCoV se determinó en los estudios de Límite de Detección. Dado que en el momento en que se desarrolló la prueba y se llevó a cabo este estudio no había disponibles para los CDC aislamientos cuantificados del virus 2019-nCoV, los ensayos diseñados para la detección del ARN 2019-nCoV se probaron con cepas caracterizadas de ARN de longitud completa transcrito in vitro (gen N; adhesión al GenBank: MN908947.2) de título conocido (copias de ARN/ μ L) que se introdujeron en un diluyente compuesto por una suspensión de células humanas A549 y medio de transporte viral (VTM) para imitar el espécimen clínico. Las muestras se extrajeron utilizando el instrumento QIAGEN EZ1 Advanced XL y el kit de virus DSP EZ1 (Cat# 62724) y manualmente con el mini kit de ARN viral DSP de QIAGEN (Cat# 61904). Los ensayos de RT-PCR en tiempo real se realizaron utilizando el Thermo Fisher Scientific TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (Cat# A15299) en el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx según las instrucciones de uso del panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV.

Se determinó una LoD preliminar para cada ensayo probando muestras triplicadas de ARN purificado con cada método de extracción. El LD aproximado se identificó extrayendo y probando diluciones en serie de 10 veces de los stocks caracterizados de ARN de longitud completa transcrito in vitro. Se determinó una confirmación del LD utilizando muestras de ARN de dilución en serie triple con 20 réplicas extraídas. Se determinó que la LD era la concentración más baja en la que \geq el 95% (19/20) de las réplicas eran positivas.

Tabla 4. Límite de detección Confirmación del panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-nCoV con QIAGEN EZ1 DSP

Objetivos	2019-nCoV N1			2019-nCoV N2		
Concentración de ARN1	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}
Positivos/Totales	20/20	19/20	13/20	20/20	17/20	9/20
Media Ct2	32.5	35.4	NA	35.8	NA	NA
Desviación estándar (Ct)	0.5	0.8	NA	1.3	NA	NA

¹ La concentración se presenta en copias de ARN/ μ L

² Media Ct reportada para diluciones que son \geq 95% positivas. Los cálculos sólo incluyen resultados positivos. NA no aplicable

Tabla 5. Límite de Confirmación de Detección CDC 2019-nCoV Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real con QIAGEN QIAmp DSP Mini Kit de ARN Viral

Objetivos	2019-nCoV_N1			2019-nCoV_N2			
	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}	10 ^{-1.0}
Concentración de ARN1	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}	10 ^{0.5}	10 ^{0.0}	10 ^{-0.5}	10 ^{-1.0}
Positivos/Totales	20/20	20/20	6/20	20/20	20/20	20/20	8/20
Media Ct2	32.0	32.8	NA	33.0	35.4	36.2	NA
Desviación estándar (Ct)	0.7	0.8	NA	1.4	0.9	1.9	NA

¹ La concentración se presenta en copias de ARN/μL

² Media Ct reportada para diluciones que son ≥ 95% positivas. Los cálculos sólo incluyen resultados positivos. NA no aplicable

Tabla 6. Límite de detección del panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-nCoV

Virus	Material	Límite de detección (copias de ARN/L)	
		QIAGEN EZ1 Avanzado XL	QIAGEN DSP Viral Mini Kit de ARN
2019 Novela Coronavirus	Gen N ARN Transcripción	100.5	100

Evaluación de sensibilidad de la FDA: La sensibilidad analítica de la prueba se evaluará más a fondo mediante la evaluación de un material de referencia recomendado por la FDA, utilizando un protocolo desarrollado por la FDA si es aplicable y/o cuando esté disponible.

Pruebas del panel de referencia del SARS-CoV-2 de la FDA

La evaluación de la sensibilidad y la reactividad cruzada MERS-CoV se realizó utilizando material de referencia (T1), muestras cegadas y un protocolo estándar proporcionado por la FDA. El estudio incluyó un estudio de búsqueda de rango y un estudio de confirmación para la LoD. Se utilizaron pruebas de muestras ciegas para establecer la especificidad y confirmar la LoD. Las muestras se extrajeron utilizando el QIAGEN EZ1 Advanced XL con el QIAGEN EZ1 DSP Virus Kit. Las muestras extraídas se probaron después utilizando el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real 2019-nCoV en el Instrumento de PCR en Tiempo Real Applied BioSystems 7500 Fast Dx utilizando el ThermoFisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Cuadro 7: Resumen del resultado de la confirmación de la LD utilizando el panel de referencia SARS-CoV-2 de la FDA

Materiales de referencia proporcionados por la FDA	Tipo de muestra	LoD de producto	Reactividad cruzada
SARS-CoV-2	El hisopo de NP	1.8x10 ⁴ NDU/mL	NO.
MERS-CoV		NO.	ND

NDU/mL = unidades detectables de ARN

NAAT/mL N/A: No aplicable

ND: No se ha detectado

En el análisis de silicio de las secuencias de cebador y sonda:

El cebador de oligonucleótidos y las secuencias de sondeo del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de 2019 nCoV de los CDC se evaluaron frente a las 31.623 secuencias disponibles en la base de datos de la Iniciativa Mundial para Compartir Todos los Datos sobre la Gripe (GISAID, <https://www.gisaid.org>) al 20 de junio de 2020, para demostrar la inclusividad prevista del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de 2019 nCoV. A continuación se muestran los desajustes de los nucleótidos en las regiones del cebador/sonda con frecuencias > 0,1%. Con la excepción de un desajuste de nucleótidos con una frecuencia > 1% (2,00%) en la tercera posición de la sonda N1, la frecuencia de todos los desajustes fue < 1%, lo que indica que la prevalencia de los desajustes fue esporádica. Sólo una secuencia (0,0032%) tenía dos desajustes de nucleótidos en la sonda N1, y otra secuencia de un aislado diferente (0,0032%) tenía dos desajustes de nucleótidos en el cebador inverso N1. No se encontró ninguna secuencia que tuviera más de una desadaptación en ninguna región del cebador/sonda N2. El riesgo de que estos desajustes resulten en una pérdida significativa de reactividad que provoque un resultado negativo falso es extremadamente bajo debido al diseño de los cebadores y las sondas, con temperaturas de fusión > 60°C y con temperatura de recocido a 55°C que pueden tolerar hasta dos desajustes.

Tabla 8. Análisis de Inclusión de Silicio del Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV entre 31.623 secuencias de genoma disponibles en GISAID al 20 de junio de 2020

Imprimación/sonda	La sonda N1	N1 inversa		La sonda N2
Ubicación (5'>3')	3	15	21	13
Núcleo desajustado	C>T	G>T	T>C	C>T
No hay coincidencia.	632	34	71	46
Frecuencia de desajuste (%)	2.00	0.11	0.22	0.15

Pruebas de especificidad/exclusividad: Análisis en sílice

Las consultas de análisis de BLASTn de los ensayos de 2019-nCoV rRT-PCR primers y sondas se realizaron contra secuencias de nucleótidos de dominio público. Los parámetros de búsqueda de la base de datos fueron los siguientes: 1) La colección de nucleótidos consta de secuencias GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+RefSeq, pero excluye EST, STS, GSS, WGS, TSA, secuencias de patentes así como secuencias HTGS de fase 0, 1 y 2 y secuencias más largas de 100Mb; 2) La base de datos no es redundante. Se han fusionado secuencias idénticas en una sola entrada, conservando la información sobre la adhesión, la IG, el título y la taxonomía de cada entrada; 3) La base de datos se actualizó el 10/03/2019; 4) Los parámetros de búsqueda se ajustan automáticamente para las secuencias de entrada cortas y el umbral de espera es de 1000; 5) Las puntuaciones de coincidencia y desajuste son 1 y -3, respectivamente; 6) La penalización por crear y ampliar una brecha en una alineación es de 5 y 2, respectivamente.

Ensayo 2019-nCoV_N1:

La secuencia de la sonda del ensayo N1 de 2019-nCoV rRT-PCR mostró una homología de alta secuencia con el coronavirus del SARS y el genoma del coronavirus similar al del SARS de los murciélagos. Sin embargo, los cebadores de avance y retroceso no mostraron homología de secuencia con el coronavirus del SARS y el genoma del coronavirus del murciélago SARS. Combinando los cebadores y la sonda, no hay homologías significativas con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana que puedan predecir posibles resultados falsos positivos de la RRT-PCR.

Ensayo 2019-nCoV_N2:

La secuencia de cebado de 2019-nCoV rRT-PCR ensayo N2 mostró una alta homología de secuencia a los coronavirus similares al SARS de los murciélagos. Las secuencias inversas del cebador y de la sonda no mostraron una homología significativa con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana. Combinando los cebadores y la sonda, no hay predicción de posibles resultados falsos positivos de rRT-PCR.

En resumen, el ensayo 2019-nCoV rRT-PCR N1 y N2, diseñado para la detección específica de 2019-nCoV, no mostró homologías combinadas significativas con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana que pudieran predecir posibles resultados falsos positivos de rRT-PCR.

Además del análisis *in silico*, se extrajeron varios organismos y se probaron con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real CDC 2019-nCoV para demostrar la especificidad y exclusividad analítica. Los estudios se realizaron con ácidos nucleicos extraídos con el instrumento QIAGEN EZ1 Advanced XL y el kit de virus EZ1 DSP. Los ácidos nucleicos se extrajeron de preparaciones de títulos altos (típicamente $\geq 10^5$ PFU/mL o $\geq 10^6$ CFU/mL). Las pruebas se realizaron utilizando el instrumento Thermo Fisher Scientific TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG en el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx. Los datos demuestran que se obtienen los resultados esperados para cada organismo cuando se prueban con el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV.

Tabla 9. Especificidad/Exclusividad del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV

Virus	Cepa	Fuente	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Resultado final
Coronavirus humano	229E	Aislar	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus humano	OC43	Aislar	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus humano	NL63	muestra clínica	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus humano	HKU1	muestra clínica	0/3	0/3	Neg.
MERS-coronavirus		Aislar	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus del SARS		Aislar	0/3	0/3	Neg.
bocavirus	-	muestra clínica	0/3	0/3	Neg.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Aislar	0/3	0/3	Neg.
<i>Streptococcus</i>		Aislar	0/3	0/3	Neg.
Gripe A (H1N1)		Aislar	0/3	0/3	Neg.
Gripe A(H3N2)		Aislar	0/3	0/3	Neg.
Gripe B		Aislar	0/3	0/3	Neg.
Adenovirus humano, tipo 1	Ad71	Aislar	0/3	0/3	Neg.
Metapneumovirus humano	-	Aislar	0/3	0/3	Neg.
virus respiratorio sincitial	Largo A	Aislar	0/3	0/3	Neg.
rinovirus		Aislar	0/3	0/3	Neg.
parainfluenza 1	C35	Aislar	0/3	0/3	Neg.
parainfluenza 2	Greer	Aislar	0/3	0/3	Neg.
parainfluenza 3	C-43	Aislar	0/3	0/3	Neg.
parainfluenza 4	M-25	Aislar	0/3	0/3	Neg.

Estudios sobre sustancias de interferencia endógena:

El Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV utiliza métodos convencionales de extracción de ácido nucleico bien establecidos y basados en nuestra experiencia con otros ensayos de la EUA del CDC, incluido el ensayo RT-PCR en tiempo real del Novel Coronavirus 2012 de los CDC para la presunta detección del Coronavirus del Síndrome Respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV) y el ensayo del Panel de Diagnóstico RT-PCR en tiempo real del Virus de la Gripe Humana de los CDC para la presunta detección del nuevo virus de la gripe A (H7N9), ambos destinados a ser utilizados con varias muestras respiratorias, no prevemos la interferencia de sustancias endógenas comunes.

Estabilidad de los especímenes y pruebas en fresco:

Para aumentar la probabilidad de detectar la infección, los CDC recomiendan la recolección de muestras de las vías respiratorias inferiores y superiores para su análisis. Si es posible, se deben recolectar tipos de muestras adicionales (por ejemplo, heces, orina) y se deben almacenar inicialmente hasta que los CDC decidan si se deben analizar fuentes de muestras adicionales. Los especímenes deben recogerse lo antes posible una vez que se identifique un IUP, independientemente de la aparición de los síntomas. Mantener un control adecuado de las infecciones al recoger las muestras. Almacenar las muestras a 2-8°C y enviarlas durante la noche al CDC en una bolsa de hielo. Etiquete cada contenedor de muestras con el número de identificación del paciente (por ejemplo, número de registro médico), identificación única de la muestra (por ejemplo, número de solicitud del laboratorio), tipo de muestra (por ejemplo, hisopos nasales) y la fecha en que se recogió la muestra. Complete un formulario 50.34 de la CDC por cada muestra presentada.

Rendimiento clínico:

A partir del 22 de febrero de 2020, el CDC ha probado 2071 muestras respiratorias de personas bajo investigación (PUI) en los EE.UU. usando el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real CDC 2019-nCoV. Los tipos de muestras incluyen líquido/lavado bronquial, hisopo bucal, lavado/aspiración nasal, hisopo nasofaríngeo, hisopo nasofaríngeo/garganta, hisopo oral, esputo, hisopo orofaríngeo (garganta), hisopo (sin especificar) y hisopo garganta.

Tabla 10: Resumen de los datos del panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) generados al probar los especímenes respiratorios humanos recolectados de sujetos con PUI en los EE.UU.

Tipo de muestra	2019 nCoV Negativo	2019 nCoV Positivo	Inconcluso	Inválido	Total
Bronquial líquido/lavado	2	0	0	0	2
Hisopo bucal	5	1	0	0	6
Nasal lavar/aspirar	6	0	0	0	6
Nasofaríngeo hisopado	927	23	0	0	950
Hisopo nasofaríngeo/garganta hisopado	4	0	0	0	4
El hisopo oral...	476	9	0	0	485
Frotis faríngeo (garganta)	363	10	0	1	374
Espujo	165	5	0	0	170
Swab (sin especificar) ¹	71	1	0	0	72
Tejido (pulmón)	2	0	0	0	2
Total	2021	49	0	1	2071

¹Faltaba la información del tipo de hisopo en estos especímenes del tracto respiratorio superior.

Dos mil veintidós (2021) muestras respiratorias de las 2071 muestras respiratorias probadas negativas por el Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. Cuarenta y nueve (49) de los 2071 especímenes respiratorios resultaron positivos en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. Sólo una muestra (hisopo orofaríngeo (garganta)) fue inválida. De las 49 muestras respiratorias que dieron positivo en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de CDC 2019-nCoV, diecisiete (17) fueron confirmadas por secuenciación genética y/o cultivo de virus (acuerdo porcentual positivo = 17/17, 95% CI: 81.6%-100%)

Durante la fase inicial de las pruebas, se ensayaron también un total de 117 muestras respiratorias recogidas de 46 sujetos de la PUI con dos ensayos RT-PCR en tiempo real validados analíticamente que se dirigen a regiones separadas e independientes del gen de la proteína nucleocápside de los ensayos 2019-nCoV, N4 y N5. Los objetivos del gen de la proteína nucleocápside de los ensayos N4 y N5 son diferentes e independientes de los objetivos del gen de la proteína nucleocápside de los dos ensayos RT-PCR incluidos en el Panel Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real de CDC 2019-nCoV, N1 y N2. Cualquier resultado positivo del ensayo N4 y/o N5 fue investigado más a fondo mediante secuenciación genética.

El rendimiento del Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV que prueba estos 117 especímenes respiratorios fue estimado contra un comparador compuesto. Un espécimen se consideró negativo para el comparador si tanto el ensayo N4 como el N5 eran negativos. Una muestra

se consideró positiva para el comparador cuando el ensayo N4 y/o N5 generó un resultado positivo, y los resultados positivos del comparador se investigaron más a fondo y se confirmó que el ARN 2019-nCoV era positivo mediante secuenciación genética.

¹⁰⁰ copias/μL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
10-1 copias μL	2/3	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3

Tabla 13: Límite de comparación de detección de las mezclas maestras de enzimas - Resumen de los resultados de la sonda ZEN

Número de copia	Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix		Quantabio qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix		Quantabio UltraPlex 1 Paso ToughMix (4X)		Sonda GoTaq® de Promega Sistema RT-qPCR de 1 paso	
	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2
¹⁰² copias/μL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
¹⁰¹ copias/μL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
¹⁰⁰ copias/μL	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3
10-1 copias μL	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3

Se extrajeron muestras clínicas respiratorias retrospectivas positivas (18) y negativas (17) utilizando el instrumento QIAGEN EZ1 Advanced XL y el kit de virus EZ1 DSP y se probaron con el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV utilizando las mezclas maestras del sistema de RT-qPCR de un paso Quantabio qScript XLT ToughMix, Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X) y Promega GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR. Las tres mezclas maestras de enzimas tuvieron un rendimiento equivalente, demostrando un acuerdo 100% positivo y 100% negativo con los resultados esperados y un intervalo de confianza del 95% de 82,4%-100% y 81,6%- 100%, respectivamente.

Tabla 14: Comparación clínica - Resumen de los resultados del estudio retrospectivo

CDC 2019-nCoV Diagnóstico RT- PCR en tiempo real Resultado del panel	Quantabio qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix		Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)		Sonda GoTaq® de Promega Sistema RT-qPCR de 1 paso	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	18	0	18	0	18	0
Negativo	0	17	0	17	0	17

Evaluación de la plataforma de extracción de Roche MagNA Pure 24 y MagNA Pure 96:

Se comparó el rendimiento del Panel de Diagnóstico RT-PCR en tiempo real 2019-CoV utilizando las plataformas de extracción MagNA Pure 24 y MagNA Pure 96 de Roche con el rendimiento de un método de extracción autorizado. Se añadieron diluciones seriadas de virus inactivados cuantificados del SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020; 100 copias de ARN/μL) en tampón de lisis a la matriz de muestras negativas de las vías respiratorias superiores. Se extrajeron cinco muestras de cada dilución en paralelo con las plataformas de extracción QIAGEN EZ1 Advanced XL (EZ1 DSP Virus Kit Cat# 62724) y Roche MagNA Pure 24 (MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit Cat# 07658036001) y Roche MagNA Pure 96 (MagNA Pure 96 DNA and Viral Nucleic Acid Small Volume Kit Cat# 06543588001) y se evaluaron utilizando el panel de

diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV y ThermoFisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix. La LoD observada se definió como la concentración más baja a la que el 100% (5 de un total de 5) de todas las réplicas resultaron positivas para ambos conjuntos de cebadores/sondas (N1 y N2) en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. Los criterios de aceptación de

se definieron como la demostración de una LoD observada ya sea en el mismo punto final o dentro de una dilución de 3 veces. Los resultados mostraron que tanto la plataforma de extracción MagNA Pure 24 como la MagNA Pure 96 tuvieron un rendimiento equivalente o dentro de una dilución triple de la LD observada cuando se utilizó la plataforma de extracción QIAGEN EZ1 Advanced XL.

Tabla 15. Comparación del límite de detección entre las plataformas de extracción QIAGEN EZ1 Advanced XL, Roche MagNA Pure 96 y Roche MagNA Pure 24 utilizando el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV

Plataforma	Parámetro	Ensayo 2019-nCoV_N1			2019-nCoV_N2 Ensayo			Observado o LoD1
QIAGEN EZ1 Avanzado XL	Copias de ARN/μL	101.0	100.5	100.0	101.0	100.5	100.0	100.5
	# pos./total	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	
	Media Ct2	34.0	35.0	36.3	33.9	36.6	NA	
	Std. Desviación	0.2	0.8	0.2	0.4	0.9	NA	
Roche MagNA Pure 96	Copias de ARN/μL	101.0	100.5	100.0	101.0	100.5	100.0	100.5
	# pos./total	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	
	Media Ct2	33.3	34.6	36.1	33.2	35.7	NA	
	Std. Desviación	0.5	0.5	0.3	0.3	0.4	NA	
Roche MagNA Pure 24	Copias de ARN/μL	101.0	100.5	100.0	101.0	100.5	100.0	101.0
	# pos./total	5/5	3/5	3/5	5/5	5/5	5/5	
	Media Ct2	34.4	NA	NA	35.2	36.9	36.2	
	Std. Desviación	0.6	NA	NA	0.5	1.0	0.8	

¹La concentración se presenta en copias de ARN/μL. La LoD observada es la concentración más baja donde ambos ensayos mostraron un 100% de detección positiva.

²Significa Ct reportado para diluciones que muestran 100% de positividad. Los cálculos sólo incluyen resultados positivos. NA = no aplicable

Las muestras clínicas de restos previamente caracterizadas (14 positivas y 15 negativas) se extrajeron utilizando las plataformas de extracción MagNA Pure 96 y MagNA Pure 24 de Roche y se evaluaron utilizando el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV y Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix.

Los criterios de aceptación de la equivalencia clínica se definieron como la demostración de una coincidencia del 100% con los resultados cualitativos mostrados con el método de comparación autorizado (QIAGEN EZ1 Advanced XL). Los resultados de este estudio mostraron una coincidencia del 100% con el método de comparación para las plataformas de extracción Roche MagNA Pure 96 y Roche MagNA Pure 24 cuando se utilizaron con el panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV.

Tabla 16. Resultados de la comparación clínica - Resultados del estudio retrospectivo

Plataforma de pruebas	Plataforma de pruebas Resultado	QIAGEN EZ1 Resultado XL avanzado		Positivo % Acuerdo (CI) ¹	Negativo % Acuerdo (CI) ¹
		Positivo	Negativo		
Roche MagNA Puro 96	Positivo	14	0	100.0 (78.5 – 100.0)	100.0 (79.6 – 100.0)
	Negativo	0	15		
Roche MagNA Puro 24	Positivo	14	0	100.0 (78.5 – 100.0)	100.0 (79.6 – 100.0)
	Negativo	0	15		

¹ CI = 95% de intervalo de confianza

Evaluación de la plataforma de extracción de Promega Maxwell® RSC 48:

Se comparó el rendimiento del Panel de Diagnóstico RT-PCR en tiempo real 2019-CoV utilizando la plataforma de extracción Promega Maxwell® RSC 48 con el rendimiento de un método de extracción autorizado. Se añadieron diluciones seriadas de virus inactivado cuantificado de SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020; 100 copias de ARN/ μ L) en el VTM a una matriz de muestras de tracto respiratorio superior negativa agrupada. Se extrajeron cinco muestras de cada dilución en paralelo con las plataformas de extracción QIAGEN EZ1® Advanced XL (EZ1 DSP Virus Kit Cat# 62724) y Promega Maxwell® RSC 48 (Promega Maxwell® Viral Total Nucleic Acid Purification Kit Cat# AS1330) y se evaluaron utilizando el panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV y ThermoFisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix. La LoD observada se definió como la concentración más baja a la que el 100% (5 de un total de 5) de todas las réplicas resultaron positivas para ambos conjuntos de cebadores/sondas (N1 y N2) en el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. Los criterios de aceptación de la equivalencia se definieron como la demostración de una LD observada ya sea en el mismo punto final o dentro de una dilución triple. Los resultados mostraron que el rendimiento de la plataforma de extracción Maxwell® RSC 48 era equivalente o dentro de una dilución triple de la LD observada cuando se utilizaba la plataforma de extracción QIAGEN EZ1® Advanced XL.

Tabla 17. Comparación del límite de detección entre las plataformas de extracción QIAGEN EZ1® Advanced XL y Promega Maxwell® RSC 48 utilizando el panel de diagnóstico RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV

Plataforma	Parámetro	Ensayo 2019-nCoV_N1			2019-nCoV_N2 Ensayo			Observado o LoD1
		100.5	100.0	10-0 ^{.5}	100.5	100.0	10-0 ^{.5}	
QIAGEN EZ1® Avanzado XL	Copias de ARN/ μ L	100.5	100.0	10-0 ^{.5}	100.5	100.0	10-0 ^{.5}	100.0
	# pos./total	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	3/5	
	Media Ct2	32.27	33.80	NA	35.13	36.41	NA	
	Std. Desviación	0.81	0.40	NA	0.81	0.40	NA	
Promega Maxwell® RSC 48	Copias de ARN/ μ L	100.5	100.0	10-0 ^{.5}	100.5	100.0	10-0 ^{.5}	100.0
	# pos./total	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	
	Media Ct2	31.11	32.97	NA	31.89	33.95	35.17	
	Std. Desviación	0.24	0.34	NA	0.24	0.35	0.65	

¹La concentración se presenta en copias de ARN/ μ L. La LoD observada es la concentración más baja donde ambos ensayos mostraron un 100% de detección positiva.

²El umbral de ciclo medio (Ct) reportado para diluciones que muestran 100% de positividad. Los cálculos sólo incluyen resultados positivos. NA = no aplicable

Las muestras clínicas de restos previamente caracterizadas (15 positivas y 15 negativas) se extrajeron utilizando la plataforma de extracción Promega Maxwell® RSC 48 junto con la plataforma de extracción QIAGEN EZ1® Advanced XL actualmente autorizada y se evaluaron utilizando el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV y Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix. Los resultados de la RSC 48 de Maxwell® se compararon con la extracción QIAGEN EZ1® Advanced XL realizada en paralelo, mostrando una coincidencia cualitativa del 100% (15/15) en las muestras positivas y del 93,3% (14/15) en las muestras negativas. Esta evaluación mostró que dos muestras originalmente negativas (QIAGEN QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit) (muestras 16 y 24) arrojaron un resultado no concluyente tras la extracción con el QIAGEN EZ1® Advanced XL. La repetición del Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV resolvió uno de los dos especímenes (Específico 24, resultado negativo). El segundo espécimen (Especímen 16) no fue concluyente.

Ambos especímenes dieron un resultado negativo en el Maxwell® RSC 48.

Tabla 18. Resultados de la comparación clínica - Resultados del estudio retrospectivo

Plataforma de pruebas	Resultado	Promega Maxwell® RSC 48			Positivo % Acuerdo (CI) ¹	Negativo % Acuerdo (CI) ¹
		Positivo	Negativo	Inconcluso		
QIAGEN EZ1® Avanzado XL	Positivo	15	0	0	100.0 (79.6-100.0)	93.3 (70.2-98.9)
	Negativo	0	14	0		
	Inconcluso	0	1	0		

¹ CI = 95% de intervalo de confianza

Eliminación

Deshágase de los materiales peligrosos o contaminados biológicamente de acuerdo con las prácticas de su institución.

Referencias

1. Ballew, H. C. y otros, "Basic Laboratory Methods in Virology", DHHS, Servicio de Salud Pública 1975 (Revisado en 1981), Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia 30333.
2. Instituto de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI), "Recolección, Transporte, Preparación y Almacenamiento de Especímenes para Métodos Moleculares": Proposed Guideline", MM13-A
3. Lieber, M., y otros: "A Continuous Tumor Cell Line from a Human Lung Carcinoma with Properties of Type II Alveolar Epithelial Cells" *International Journal of Cancer* 1976, 17(1), 62-70.

Historia de la revisión

Revisión	Fecha de entrada en vigor	Resumen de las revisiones
1	4 de febrero de 2020	Instrucciones de uso originales
2	15 de marzo de 2020	<ul style="list-style-type: none">! Actualización del uso previsto! Eliminación del cebador N3 y del conjunto de sondas del panel de diagnóstico! Actualización de los datos de rendimiento! Adición de plataformas alternativas de extracción de ácido nucleico! Adición de alternativas aceptables al HSC y adición de reactivos de extracción de QIAGEN RUO! Los resultados positivos ya no son presuntivos. No se requiere confirmación de los resultados positivos
3	30 de marzo de 2020	<ul style="list-style-type: none">! Adición de opciones alternativas de mezcla maestra de enzimas
4	12 de junio de 2020	<ul style="list-style-type: none">! Adición del método de extracción de MagNA Pure 24! Adición de datos de rendimiento para el método de extracción de MagNA Pure 96 con SARS-CoV-2! Adición de un tratamiento térmico alternativo a la extracción de muestras! Adición de alternativas de tampón de lisis externa de Roche y QIAGEN! Reconocimiento de la política de la FDA que permite a los usuarios finales calificar los componentes alternativos sin solicitar una enmienda de la EUA o la EUA
5	13 de julio de 2020	<ul style="list-style-type: none">! Adición del método de extracción de Promega Maxwell® RSC 48! Actualización de los análisis de inclusividad <i>in silico</i>
6	1 de diciembre de 2020	<ul style="list-style-type: none">! Adición de instrucciones de agrupación de especímenes y procedimiento de vigilancia (Apéndices B y C)! Adición del instrumento de extracción CSC 48 de Promega Maxwell! Adición de datos para las pruebas del CDC del panel de referencia de la FDA

Información de contacto, pedidos y soporte de productos

Para apoyo técnico y de productos, contacte directamente con la División de Enfermedades Virales de los CDC.

[Envíe un correo electrónico](mailto:respviro@cdc.gov) a: respviro@cdc.gov

Nota: Si su laboratorio utiliza reactivos que no proceden del Recurso de Reactivos Internacionales del CDC, por favor, consulte las instrucciones del fabricante que se proporcionan con los materiales comerciales.

Apéndice A: Tratamiento térmico alternativo a la extracción UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)

Este procedimiento es sólo para uso de los laboratorios de salud pública.

Propósito:

En respuesta a la escasez mundial de reactivos para la extracción de ácido nucleico, que provoca importantes retrasos en las pruebas, el CDC ha investigado el uso de un método de tratamiento térmico que requiere un mínimo de reactivos como alternativa de procesamiento de muestras para la extracción de ácido nucleico, para su uso con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real 2019-nCoV.

Siempre que sea posible, los laboratorios deben utilizar métodos calificados de extracción de ARN o de ácido nucleico total para el procesamiento de los especímenes para su posterior análisis por el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. La extracción elimina las sustancias inhibitoras de los especímenes que podrían afectar negativamente al rendimiento de la PCR.

Este procedimiento para el uso de tratamiento térmico para el procesamiento de especímenes sólo se recomienda cuando la escasez de reactivos de extracción cualificados es un factor limitante en la capacidad de un laboratorio para satisfacer la demanda urgente de pruebas de COVID-19.

Precauciones/Advertencias/Limitaciones:

- ! Los CDC han evaluado este proceso de tratamiento térmico y han determinado que es eficaz para la inactivación del SARS-CoV-2 en las muestras de los pacientes.
- ! El rendimiento se evaluó sólo con muestras de las vías respiratorias superiores. El tratamiento térmico de los especímenes de las vías respiratorias inferiores para su posterior prueba por el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV no ha sido evaluado.
- ! Este procedimiento para el tratamiento térmico de los especímenes sólo se puede utilizar con el Quantabio UltraPlex 1- Step ToughMix (4X).
- ! El tratamiento térmico sólo debe realizarse cuando un laboratorio esté listo para probar las muestras por PCR. Las pruebas de las muestras tratadas con calor deben realizarse el mismo día.

Especímenes aceptables:

- ! Las muestras de las vías respiratorias superiores
Nota: No utilice el tratamiento térmico para procesar especímenes que parezcan sangrientos o que contengan partículas. Tales especímenes deben ser extraídos usando un método calificado de extracción de ARN o ATN antes de la prueba.

Materiales necesarios (no suministrados):

- ! 70% de etanol

- ! 10% de lejía, recién preparada
- ! Placas de reacción PCR de 96 pozos (Applied Biosystems catálogo # 4346906, 4366932, 4346907, o equivalente)
- ! Tapas de tiras ópticas (Applied Biosystems 4323032, o equivalente)

- ! Tubos de Sarstedt de 1,5 mL o equivalente
- ! Puntas de micropipeta resistentes a los aerosoles
- ! Micropipetas
- ! Bloqueo de frío de 96 pozos
- ! Bloques de frío para tubos de 1.5 mL - 2.0 mL
- ! Mezclador de vórtice
- ! Centrifugadora de placas de 96 pozos o equivalente
- ! Ciclador térmico o equivalente
- ! Gabinete de Seguridad Biológica Clase II (BSC)

Procedimiento:

Preparación de la muestra

- 1) Descontaminar el BSC con un 10% de lejía seguido de un 70% de etanol.
- 2) Si las muestras están congeladas, descongélalas en hielo o a 4°C. Limpie el exterior del tubo de muestra con un 70% de etanol. Coloque la muestra descongelada en una estantería fría o en hielo en el BSC.
- 3) Pulsa en el vórtice de cada muestra y gira brevemente hacia abajo en una centrifugadora para recoger el líquido en el fondo del tubo.

Tratamiento de calor

- 1) Coloca un termociclador en el BSC, enciéndelo y programa 95°C durante 1 min. seguido de 4°C de retención.
- 2) Coloca una placa de PCR de 96 pozos en un estante frío o en hielo en el BSC.
- 3) Transfiera 100 µl de cada muestra a la placa de PCR de 96 pozos y tape bien cada pozo usando tapas de tiras ópticas.
NOTA: Asegúrese de que un control de extracción de HSC se incluye en cada lote ejecutado según lo requerido por la CLIA.
- 4) Coloca esta placa de PCR de 96 pozos en el termociclador precalentado y comienza a funcionar. Deje la placa en el termociclador a 4°C, o colóquela sobre hielo o un bloque frío.
- 5) Retire la placa y centrifugue durante 1 minuto a 500 x g para pelear los desechos celulares.
- 6) Ponga la placa en un estante frío o en hielo y proceda a probar el sobrenadante por rRT-PCR.
- 7) Las pruebas de los especímenes tratados con calor deben realizarse el mismo día del tratamiento térmico. Para el almacenamiento a largo plazo, mantenga el espécimen original a ≤-70°C.

Consideraciones especiales de prueba para los

especímenes tratados con calor: Mezcla maestra de enzimas

- ! Las pruebas de los especímenes que han sido procesados con tratamiento térmico deben realizarse con el **Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X)**, que demostró el mejor rendimiento con especímenes tratados térmicamente. Las pruebas de PCR de los especímenes tratados con calor deben seguir las instrucciones del cuerpo principal de este documento de instrucciones de uso.

Resolución de resultados no concluyentes e inválidos

- ! El nuevo ensayo de los especímenes tratados térmicamente que hayan generado un resultado no concluyente o no válido debe incluir la extracción del espécimen original con un método calificado de extracción de ARN o de ácido nucleico total (ATN), si se dispone de él. No vuelva a probar el material del espécimen tratado con calor para resolver resultados de pruebas no concluyentes o inválidos.

Verificación:

Los CDC recomiendan la realización de estudios de verificación para el método de tratamiento térmico antes de su uso en el diagnóstico, que incluye la preparación paralela de un panel de muestras clínicas positivas y negativas utilizando un método de extracción calificado y este método de tratamiento térmico con pruebas posteriores por el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de CDC 2019-nCoV.

Características de rendimiento:

Comparación del límite de detección de

Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix

(4X)

Se prepararon diluciones seriadas de SARS-CoV-2 inactivado [SARS-CoV-2 USA-WA1/2020] en material de muestra simulado (células humanas A549 suspendidas en un medio de transporte viral). Cada concentración se preparó cinco veces en paralelo, tanto por extracción de EZ1 como por tratamiento térmico. Cada muestra extraída o tratada térmicamente fue posteriormente analizada por el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV utilizando el Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X) en el instrumento Applied Biosystems 7500 Fast Dx.

La detección observada fue similar entre los dos métodos de preparación de especímenes.

Tabla 1: Comparación del límite de detección UltraPlex entre el método de extracción XL avanzado de QIAGEN EZ1 y el tratamiento térmico (95°C durante 1 min) - Resumen de resultados

Enzima	Plataforma	Parámetro	Ensayo 2019-nCoV_N1					2019-nCoV_N2 Ensayo					Observado o LoD1
			101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	
Quantabio UltraPlex 1 Paso Tough Mix (4X) Adición de 5 µL de plantilla	QIAGEN EZ1 Avanzado o XL	Copias de ARN/µL	101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	100.5
		# pos./total	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	2/5	
		Media Ct2	34.11	34.59	NA	NA	NA	32.97	33.76	34.70	NA	NA	
		Std. Desviación	0.75	0.99	NA	NA	NA	0.33	0.72	0.98	NA	NA	
	Tratamiento térmico 95°C durante 1 min.	Copias de ARN/µL	101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	101.0	100.5	100.0	10-0 ⁻⁵	10-1 ⁻⁰	100.5
		# pos./total	5/5	5/5	4/5	5/5	1/5	5/5	5/5	4/5	2/5	1/5	
		Media Ct2	33.41	34.32	NA	36.73	NA	33.45	35.25	NA	NA	NA	
		Std. Desviación	0.62	0.40	NA	0.82	NA	0.40	0.80	NA	NA	NA	

¹La concentración se presenta en copias de ARN/ μ L. La LoD observada es la concentración más baja donde ambos ensayos mostraron un 100% de detección positiva.

²Significa Ct reportado para diluciones que muestran 100% de positividad. Los cálculos sólo incluyen resultados positivos. NA = no aplicable

Comparación clínica

Un panel de 39 especímenes de las vías respiratorias superiores se analizaron uno al lado del otro mediante la extracción con el instrumento de extracción Qiagen EZ1 y el tratamiento térmico. Los especímenes extraídos y tratados térmicamente se probaron posteriormente con el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019-nCoV utilizando el Quantabio UltraPlex 1-Step ToughMix (4X). Los resultados cualitativos se compararon para demostrar la concordancia.

Tabla 2: Resumen de los resultados de la comparación clínica - Tratamiento térmico versus QIAGEN EZ1 Avanzado XL

	Resultado de la prueba	Tratamiento de calor			Total	Positivo Acuerdo (CI) ¹	Negativo Acuerdo (CI) ¹
		Positivo	Inconcluso	Negativo			
QIAGEN EZ1 Avanzado XL	Positivo	18	1	0	19	94.7 (75.4-99.1)	100 (83.9-100)
	Inconcluso	0	0	0	0		
	Negativo	0	0	20	20		
	Total	18	1	20	39		

¹ CI = 95% de intervalo de confianza

Preguntas y comentarios:

Si tiene preguntas o comentarios sobre este procedimiento, por favor envíe un correo electrónico a: respvirus@cdc.gov

Apéndice B: Preparación y procesamiento de los especímenes agrupados

Propósito:

En respuesta a la fuerte demanda de enfoques de pruebas de mayor rendimiento, así como a la escasez mundial de reactivos de extracción de ácido nucleico, que provoca importantes retrasos en las pruebas, el CDC ha evaluado la agrupación de muestras y ha determinado que la agrupación de hasta 4 muestras es adecuada para su uso con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real 2019-nCoV.

La agrupación de muestras puede causar una ligera reducción de la sensibilidad de la prueba y, por lo tanto, puede ser más apropiada para las pruebas de detección o de diagnóstico cuando el personal, el equipo o los reactivos del laboratorio son insuficientes para atender a la demanda de pruebas. La agrupación de muestras sólo presenta una ventaja de rendimiento cuando la prevalencia de la enfermedad es baja. Por consiguiente, los laboratorios deben vigilar las tasas de positividad de los especímenes a lo largo del tiempo para determinar si la agrupación de especímenes sigue ofreciendo una ventaja de rendimiento de la prueba en comparación con la prueba de los especímenes individuales. En el apéndice C figuran más detalles sobre las consideraciones relativas a la aplicación.

Mientras que este procedimiento describe el proceso para preparar, procesar y probar un tamaño de piscina de hasta 4 especímenes, los tamaños de piscina de 2 a 4 especímenes están autorizados para su uso con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV. Cuando se utiliza una piscina de menos de 4 muestras, por favor, utilice las siguientes instrucciones como modelo. El volumen de entrada de los especímenes agrupados y las proporciones de volumen de los especímenes agrupados con la solución reguladora de lisis deben permanecer como se indica a continuación (no una proporción menor de la solución reguladora de lisis) para garantizar la inactivación del SARS-CoV-2 en los especímenes de los pacientes. El enfoque de una muestra combinada N debe incluir volúmenes iguales de cada una de las muestras N combinadas para crear el volumen de entrada total de la muestra combinada que se requiere según las instrucciones de extracción de muestras combinadas que figuran a continuación.

Precauciones/Advertencias/Limitaciones:

- ! El agrupamiento de los especímenes tiene el potencial de disminuir la sensibilidad. Los especímenes en un procedimiento de agrupación se diluyen, lo que podría dar lugar a una baja concentración de material genético viral por debajo del límite de detección de una prueba determinada.
- ! Cuando se agrupan los especímenes, el laboratorio no puede asegurar la integridad del diagnóstico de un espécimen individual porque se combina con otros especímenes antes de la prueba. La integridad de los especímenes puede verse afectada por la calidad de la recogida de los hisopos, lo que podría dar lugar a que algunos hisopos tuvieran cantidades limitadas de material genético viral para su detección. Las muestras individuales inadecuadas, incluidas las que tienen cantidades limitadas de material genético vírico, podrían no eliminarse de la muestra combinada antes de la prueba y podrían ser consideradas negativas mediante este proceso.

- ! El rendimiento de este proceso de agrupación de especímenes se evaluó con hisopos nasofaríngeos (NP). No se ha evaluado la agrupación de otros tipos de muestras para su posterior prueba con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real de CDC 2019-nCoV, aunque las pruebas sugieren que la distribución del valor Ct para otras muestras de torunda de las vías respiratorias superiores es similar a la observada para las muestras de torunda NP.
- ! La puesta en común sólo debe llevarse a cabo en laboratorios con un mínimo de 10 días de experiencia utilizando el Panel de Diagnóstico RT-PCR en tiempo real de los CDC 2019-nCoV para pruebas de diagnóstico en la población de especímenes que se está considerando poner en común.

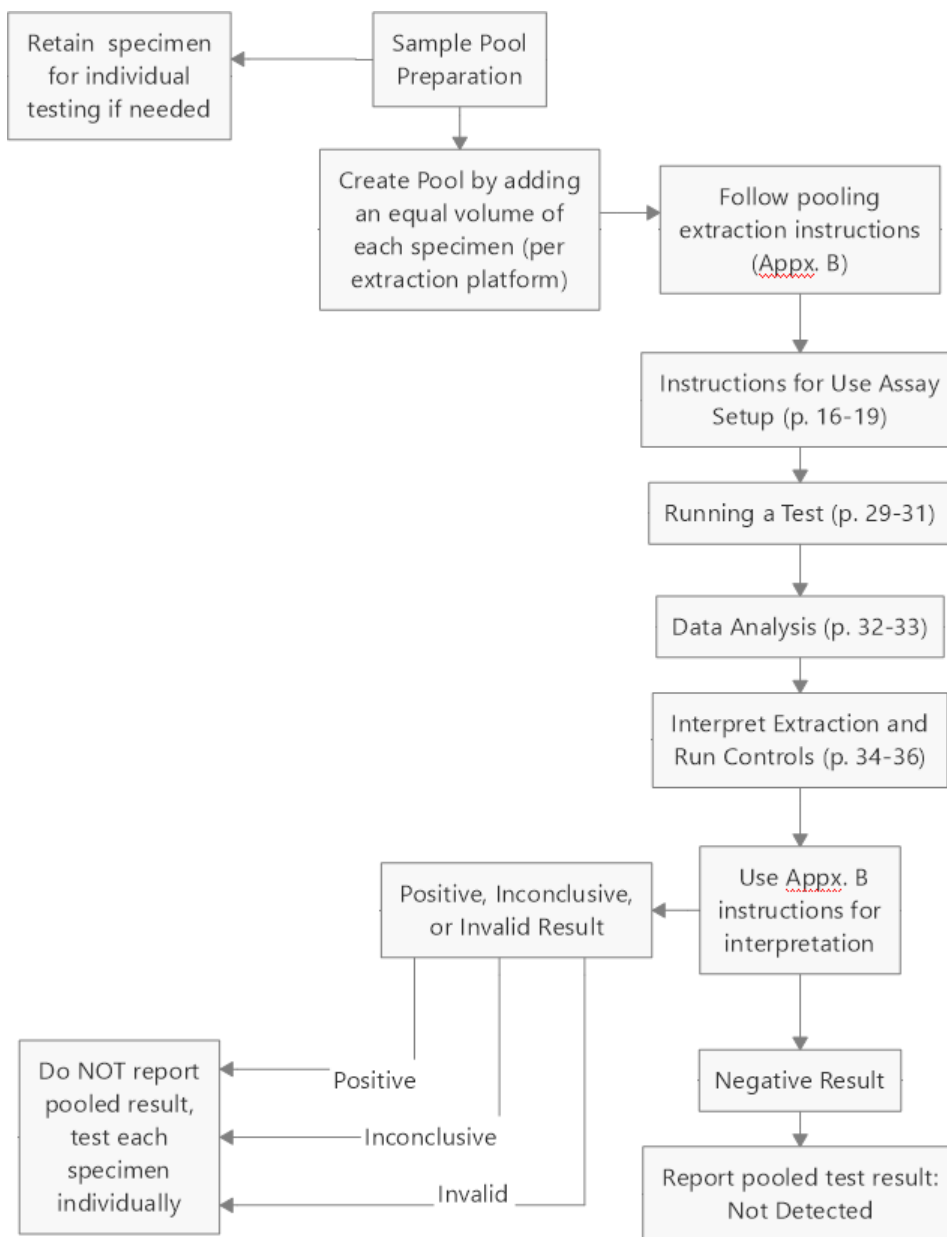
- ! Este procedimiento de agrupación de especímenes sólo ha sido evaluado para su uso con los instrumentos QIAGEN EZ1 Advanced XL, Roche MagNA Pure 96, y el Promega Maxwell RSC 48. El agrupamiento mediante otros métodos de extracción no está autorizado en esta EUA.
- ! Debe disponerse de un volumen suficiente de especímenes para permitir la posterior extracción y ensayo de especímenes individuales en caso de que el conjunto de especímenes resulte positivo, no concluyente o inválido.
- ! La interpretación apropiada, la presentación de informes y los pasos siguientes pueden ser diferentes para las pruebas de vigilancia y no están limitados por las instrucciones de interpretación del diagnóstico que figuran a continuación.
- ! Se alienta a los laboratorios a que vuelvan a examinar la cuestión de si la agrupación sigue teniendo sentido cuando la demanda de pruebas ya no excede la capacidad del laboratorio y/o cuando ya no hay escasez de reactivos de prueba.

Tipos de muestras aceptables:

- ! Torundas respiratorias superiores (por ejemplo, torundas nasofaríngeas (NP), torundas orofaríngeas (OP), torundas NP/OP combinadas, torundas nasales)
Nota: Los especímenes deben tener un volumen adecuado para soportar las pruebas de los especímenes agrupados y cualquier nueva prueba individual posterior.

Overview of Pooled Specimen Testing:

This flow chart provides an overview of the steps involved in pooled specimen testing and location of the instructions for each step within the document. For those steps that are identical for both individual specimen testing and for pooled specimen testing, instructions are found in the main body of the instructions for use. For steps in which pooled specimen testing differs from individual specimen testing, instructions specific to pooled specimen testing are presented in this Appendix.



Procedure:

Specimen Pool Preparation

- 1) Descontaminar el BSC con un 10% de lejía seguido de un 70% de etanol.
- 2) If specimens are frozen, thaw on ice or at 4°C. Wipe the outside of the specimen tube with 70% ethanol. Place thawed specimen on cold rack or ice in BSC.
- 3) Pulse vortex each specimen and briefly spin down in a centrifuge to collect the liquid at the bottom of the tube.
- 4) For each specimen pool, add an equal volume of each specimen (depending on total volume needed for extraction platform) to be included into the pool, into a sterile, nuclease-free tube.
- 5) Pulse vortex each specimen pool and briefly centrifuge to collect the liquid at the bottom of the tube.
- 6) Proceed to extraction using the modified extraction parameters below.

Extraction Instructions

NOTE: These pooled specimen extraction instructions have been modified to optimize recovery of nucleic acid when processing pooled specimens. When testing individual specimens, please follow the individual specimen extraction instructions (p. 14-16).

QIAGEN EZ1 Avanzado XL

- ! Kit: Qiagen EZ1 DSP Virus Kit and Buffer AVL (supplied separately) for offboard lysis
- ! Card: EZ1 Advanced XL DSP Virus Card
- ! Instructions: Add 200 µL of pooled specimen to 200 µL of pre-aliquoted Buffer AVL (total input sample volume is 400 µL). Proceed with the extraction on the EZ1 Advanced XL. Elution volume is 60 µL.

Roche MagNA Pure 96

- ! Kit: Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit
- ! Protocol: Viral NA Plasma Ext LysExt Lys SV 4.0 Protocol or Viral NA Plasma Ext Lys SV Protocol
- ! Instructions: Add 225 µL of pooled specimen to 225 µL of pre-aliquoted MagNA Pure 96 External Lysis Buffer (supplied separately) for total input sample volume of 450 µL. Proceed with the extraction on the MagNA Pure 96. (Internal Control = none).
- ! Elution volume is 50 µL.

Promega Maxwell RSC 48 or Maxwell CSC 48

- ! Kit: Promega Maxwell® Viral Total Nucleic Acid Purification Kit
- ! Protocol: Viral Total Nucleic Acid
- ! Instructions: Add 240 µL of pooled specimen to 660 µL of pre-aliquoted External Lysis Buffer (600 µL Lysis Buffer plus 60 µL Proteinase K; supplied within the kit) (total input volume is 900 µL). Proceed with the extraction on the Maxwell® RSC 48 or Maxwell CSC 48.
- ! Elution volume is 50 µL.

Testing, Interpretation, and Reporting Instructions

- 1) After extraction, continue PCR testing using the steps outlined in the following sections of the Instructions for Use: Assay Set Up (p. 16-20), Running a Test (p. 29-32) and Data Analysis (p. 33-34).
- 2) Interpret controls and PCR test results as outlined in the following sections of the Instructions for Use: Interpretation of Results and Reporting (p. 35-37), 2019-nCoV rRT-PCR Diagnostic Panel Results Interpretation Guide (p. 38). All extraction and PCR run controls must perform as expected.
 - A. If a specimen pool generates **negative** results, report “Not Detected” for each specimen included in the pool. The test result report should include a statement that the specimen was tested in a pooled format. No further testing is required.
 - B. If a specimen pool generates a **positive** result, do not report the result. Test each specimen included in the pool individually, according to the Instructions for Use. Report the individual result for each specimen.
 - C. If a specimen pool generates an **inconclusive** result, do not report the result. Test each specimen included in the pool individually, according to the Instructions for Use. Report the individual result for each specimen.
 - D. If a specimen pool generates an **invalid** result, do not report the result. Test each specimen within the pool individually, according to the Instructions for Use. Report the individual result for each specimen.

Verification:

Verification should be conducted by all laboratories prior to implementing pooling for diagnostic testing. In addition to method verification studies, verification must include a validation of the accuracy and function of the laboratory’s process of specimen and pool labeling, tracking and reporting through the laboratory information management system(s).

Performance Characteristics:

Pooling Validation

A panel of 20 positive, previously characterized nasopharyngeal (NP) specimens, with 25% (5) representing the weak positive range (Ct 36.00-39.99), were used for evaluation of specimen pooling with the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel; 80 negative NP specimens were also included. These specimens were used to create twenty positive 4-specimen pools, by combining one positive specimen with three negative specimens. Twenty negative pools were also created by combining equal volumes of four negative specimens. These pools were tested and qualitative results from pooled-testing were compared with the results from individual-testing to determine the positive and negative percent agreement of the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for testing using 4-specimen pools. The performance of 4-specimen pooling was evaluated using the QIAGEN EZ1® Advanced XL, the Promega Maxwell RSC 48, or the Roche MagNA Pure 96 platforms. Modifications were made to the input and output volume for each extraction platform, for pooling patient specimen, to compensate for the dilution effect due to pooling.

QIAGEN EZ1® Advanced XL

Individual positive panel members and positive and negative pools were extracted using the QIAGEN EZ1® Advanced XL platform for subsequent testing on the Applied Biosystems 7500 Fast Dx with the Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG. Results obtained for twenty, 4-specimen pools were compared with the results from individual testing. Pools containing a positive specimen were considered to be in agreement with results from individual testing if the pool generated positive or inconclusive results (i.e., at least one of the SARS-CoV-2-specific primer and probe sets generated a Ct value less than 40). Negative specimen pools were considered to be in agreement with expected results if the pooled specimen result was negative (i.e., neither SARS-CoV-2-specific primer and probe set generated positive results).

A comparison of qualitative test results from individual testing of panel members with pooled specimen testing is summarized below in Table 1, along with testing agreement with results from individual testing for positive and negative specimen pools. Of the five positive specimen panel members in the weak positive category (determined by original diagnostic results): one returned an inconclusive result when tested individually, but returned a positive result when tested in a 4-specimen pool; one returned a negative result when tested individually, but returned a positive result when tested in a 4-specimen pool; and three were in agreement when tested individually and in 4-specimen pools.

Table 1 - Summary of Pooled vs. Individual-testing - QIAGEN EZ1® Advanced XL

Plataforma de pruebas	Resultado	Individual testing result			Positive Pools Percent Agreement (CI) ¹	Negative Pools Percent Agreement (CI) ¹
		Positivo	Inconclusive [†]	Negativo		
4-specimen Pooling Result	Positivo	17	1	1	100% (82.4-100)	95.2% (77.3-99.2)
	Inconclusive [‡]	1	0	0		
	Negativo	0	0	20		

¹CI = 95% confidence interval

[†]Inconclusive individually-tested results are not included in the final performance calculations.

[‡]Inconclusive pooled results are considered in agreement with the positive individually-tested results for the final performance calculations.

Promega Maxwell RSC 48

Individual positive panel members and positive and negative pools were extracted using the Promega Maxwell RSC 48 platform for subsequent testing on the Applied Biosystems 7500 Fast Dx with the Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG. Results obtained for twenty, 4-specimen pools were compared with the results from individual testing. Pools containing a positive specimen were considered to be in agreement with the results from individual testing if the pooled specimen generated positive or inconclusive results (i.e., at least one of the SARS-CoV-2-specific primer and probe sets generated a Ct value less than 40). Twenty negative specimen pools (made from 4 known negative specimens) were considered to be in agreement with expected results if the pooled specimen result was negative (i.e., neither SARS-CoV-2-specific primer and probe set generated positive results).

A comparison of qualitative test results from individual testing of panel members with pooled specimen testing is summarized below in Table 2, along with testing agreement with results from individual testing for positive and negative specimen pools. Of the five positive specimen panel members in the weak positive category (determined by original diagnostic results): one returned a positive result when tested individually, but returned a negative result when tested in a 4-specimen pool; and four were in agreement when tested individually and in 4-specimen pools. Additionally, one moderate to high positive panel member returned an inconclusive result when tested individually but returned a positive result when tested in a 4-specimen pool.

Table 2 -Summary of Pooled vs. Individual-testing Results – Promega Maxwell RSC 48

Plataforma de pruebas	Resultado	Individual-testing result			Positive Pools Percent Agreement (CI) ¹	Negative Pools Percent Agreement (CI) ¹
		Positivo	Inconclusive [†]	Negativo		
4-specimen Pooling Result	Positivo	16	1	0	94.7% (75.4-99.1)	100% (83.9-100)
	Inconclusive [‡]	2	0	0		
	Negativo	1	0	20		

¹CI = 95% confidence interval

[†]Inconclusive individually-tested results are not included in the final performance calculations.

[‡]Inconclusive pooled results are considered in agreement with the positive individually-tested results for the final performance calculations.

MagNA Pure 96

Individual positive panel members and positive and negative pools were extracted on the MagNA Pure 96 platform for subsequent testing on the Applied Biosystems 7500 Fast Dx using the Thermo Fisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG. Results obtained for twenty, 4-specimen pools were compared with the results from individual testing. Pools containing a positive specimen were considered to be in agreement with the results from individual testing if the pooled specimen generated positive or inconclusive results (i.e., at least one of the SARS-CoV-2-specific primer and probe sets generated a Ct value less than 40). Twenty negative specimen pools (made from 4 known negative specimens) were considered to be in agreement with expected results if the pooled specimen result was negative (i.e., neither SARS-CoV-2-specific primer and probe set generated positive results).

A comparison of qualitative test results from individual testing of panel members with pooled specimen testing is summarized below in Table 3, along with testing agreement with results from individual testing for positive and negative specimen pools. Of the five positive specimen panel members in the weak positive category (determined by original diagnostic results): one returned an inconclusive result when tested individually, but returned a positive result when tested in a 4-specimen pool; and four were in agreement when tested individually and in 4-specimen pools.

Table 3 -Summary of Pooled vs. Individual-testing Results – Roche MagNA Pure 96

Plataforma de pruebas	Resultado	Individual-testing result			Positive Pools Percent Agreement (CI) ¹	Negative Pools Percent Agreement (CI) ¹
		Positivo	Inconclusive [†]	Negativo		
4-specimen Pooling Result	Positivo	18	1	0	100% (83.2-100)	100% (83.9-100)
	Inconclusive [‡]	1	0	0		
	Negativo	0	0	20		

¹CI = 95% confidence interval

[†]Inconclusive individually-tested results are not included in the final performance calculations.

[‡]Inconclusive pooled results are considered in agreement with the positive individually-tested results for the final performance calculations.

In Silico Sensitivity

An *in silico* analysis was conducted to evaluate the effect of 4-sample pooling on the clinical sensitivity of the CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel using the QIAGEN EZ1® Advanced XL extraction platform. This analysis was conducted by performing a Passing-Bablok regression using the “Pooling Validation” data to calculate the Ct shifts resulting from the dilution effect of 4-specimen pools (1 positive specimen combined with 3 negative specimens) for each target. In the regression analysis, the X-axis displayed individual Ct values for positive specimens and the Y-axis displayed Ct values for the corresponding pools with one positive specimen and 3 negative specimens. The regression analysis was used to calculate an interval of Ct values [X*, 40] where individual specimens with Ct values within this interval would have negative results in 4-specimen pools (1 positive and 3 negative).

The results from individually-tested NP swab specimens processed at the CDC using the QIAGEN EZ1® Advanced XL extraction platform (n= 381), were analyzed to determine an *in silico* PPA for 4-specimen pooling. The number of individual specimens with Ct values ranging from [X*, 40] was determined. The X* value for the N1 target was 37.2 and the X* value for the N2 target was 37.5. The results, summarized Table 4, show that 97.1% (370/381 95% CI 94.9-98.3%) of the specimens would not have negative results when combined into 4-specimen pools.

Table 4. *in silico* Sensitivity for Pooled Specimens Extracted using the QIAGEN EZ1® Advanced XL

n	N1 Interval [X*, 40]	Number of samples with N1 Ct values in the interval	N2 Interval [X*, 40]	Number of samples with N2 Ct values in the interval	Number of Samples with both target Ct values in intervals	Neg	Inc	Pos	% Positive Percent Agreement*
381	[37.2, 40]	16	[37.5, 40]	63	11	11	57	313	97.1

*Since any pool that is not negative is re-tested as individual samples, the Positive Percent Agreement includes all pools that were not negative.

The specimens submitted to CDC for testing included many that had generated inconclusive results in the hands of public health laboratories and were forwarded to CDC for further testing. Thus, specimens received by CDC for testing overrepresent the weak positive category. The CDC also obtained the results of individually-tested NP swab specimens from three additional geographic locations: state lab 1 (n= 2217), state lab 2 (n= 6559), and state lab 3 (n= 2315). These data sets were analyzed with regard to the percent of weak positives (Ct 36.00-39.99) collected at each site. The results, summarized in Table 5, suggest that the percent of weak positive NP specimens received at State Health Department laboratories is smaller than that obtained at CDC. Therefore, the *in silico* analysis, summarized in Table 4, presents a PPA in a scenario where 4-specimen pooling is applied to testing populations with a greater than average number of weak positive specimens.

Table 5. Percent of Weak Positive Specimens at CDC Compared with Three Geographic Locations

	n	Ct < 36.0		Ct 36.0 - 39.99	
		N1	N2	N1	N2
CDC	381	314 (82.4 %)	254 (66.7 %)	67 (17.6 %)	127 (33.3 %)
State 1	2217	2121 (95.7 %)	2021 (91.2 %)	150 (6.8 %)	250 (11.3%)
State 2	6559	6343 (96.7 %)	5883 (89.7 %)	216 (3.3%)	676 (10.3%)
State 3	2315	2073 (89.5 %)	1884 (81.4 %)	242 (10.5 %)	431 (18.6 %)

References:

1. Abdalhamid, B., *et al.* "Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources." *Am J Clin Path* 2020, 153, 715-718.

Questions and Comments:

Si tiene preguntas o comentarios sobre este procedimiento, por favor envíe un correo electrónico a: respvirus@cdc.gov

Appendix C: Implementation and Monitoring of Pooled Specimen Testing

Purpose:

These instructions are intended to assist laboratories and jurisdictions to implement and monitor the efficiency and effectiveness of pooled specimen testing over time. A laboratory should have a minimum of 10 days experience performing the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for diagnostic testing within the intended population prior to implementation of a pooling strategy.

Laboratories should weigh the potential risks associated with pooling as described in Appendix B against the benefits of pooling for their laboratory and patient population. When pooling has been implemented to address overwhelming testing demands and/or scarcity of testing materials, laboratories should consider a return to individual specimen testing when laboratory capacity and resources permit.

Prior to Implementation of a Specimen Pooling Strategy:

- ! Determine the individual specimen positivity rate ($P_{\text{Individual}}$) for your testing population.

Before implementation of specimen pooling, evaluate test data from the testing population for the previous 7-10 days to estimate the positivity rate ($P_{\text{Individual}}$) which is the number of positive results divided by the total number of specimens tested during these 7-10 days. $P_{\text{Individual}}$ will be used to determine if pooling should be considered and will be used to monitor the performance of your pooling strategy.

Note: To calculate the efficiency of 4-sample pooling, using $P_{\text{Individual}}$, apply the formula $F = 1 / (1 + 1/n - (1 - P_{\text{Individual}})^n)$, where F is the efficiency and n is the pool size. For example, when $P_{\text{Individual}}$ is 1%, the efficiency, F, is 3.46 for n = 4. This means that 1,000 tests can cover testing of 3,460 patients on average, which translates to a reduction in test volume of 71%. Using this formula, a pool size of n = 3 produces a greater efficiency than n = 4 at $P_{\text{Individual}} \geq 13\%$.

- ! Identify your positivity thresholds.

Table 1: Association Between Individual Specimen Positivity Rates and Reduction in Test Volume with Pooling

Specimen Positivity Rate (P)	No. tests with 4 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 4 specimen pooling	No. tests with 3 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 3 specimen pooling	No. tests with 2 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 2 specimen pooling
1%	87	71%	109	64%	156	48%
2%	98	67%	118	61%	162	46%
3%	109	64%	126	58%	168	44%
4%	120	60%	135	55%	174	42%
5%	131	56%	143	52%	179	40%
6%	141	53%	151	50%	185	38%
8%	160	47%	166	45%	191	36%
10%	178	41%	181	40%	207	31%

11%	187	38%	189	37%	212	29%
12%	195	35%	196	35%	218	27%
13%	203	32%	202	33%	223	26%
Specimen Positivity Rate (P)	No. tests with 4 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 4 specimen pooling	No. tests with 3 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 3 specimen pooling	No. tests with 2 specimen pooling for 300 patients	Reduction in testing volume with 2 specimen pooling
14%	211	30%	209	30%	228	24%
15%	218	27%	216	28%	233	22%
16%	226	25%	222	26%	238	21%
17%	233	22%	228	24%	243	19%
18%	239	20%	235	22%	248	17%
19%	246	18%	241	20%	253	16%
20%	252	16%	246	18%	258	14%

Note: Table 1 does not account for running the positive, negative, and extraction controls with each plate.

Note: Unshaded cells indicate the optimal reduction in testing volume compared to other the pool sizes.

Table 1 presents the estimated increase in efficiency achieved through pooling at different rates of specimen positivity. Laboratories are encouraged to use this table and factor in additional testing necessary to monitor the effectiveness of pooling to determine the specimen positivity thresholds ($P_{\text{Threshold}}$) at which (1) four-specimen pooling is appropriate, (2) smaller specimen pools are appropriate, and (3) the threshold at which specimen pooling offers no testing capacity/reagent consumption advantages. These thresholds should be documented for your laboratory's pooling monitoring process.

Example: a laboratory might consider a 30% reduction in test volume as the minimum required reduction in test volume to be considered beneficial (this is subjective). Thus, the laboratory would set a positivity threshold ($P_{\text{Threshold}}$) at 12%₂ for 4 specimen pooling, 14% for 3 specimen pooling, and 10% or less for 2 specimen pooling.

NOTE: It is recommended that $P_{\text{Threshold}}$ should not be greater than 20% for any pool size.

Moreover, laboratories may choose a threshold positivity rate lower than 20% for when to consider a pooling strategy.

- ! Define and document a specimen pooling strategy/process for your laboratory.
- ! Verify laboratory performance of pooled specimen testing (CLIA requirement).
- ! Establish and implement a pooling monitoring process appropriate to assure the quality of results generated through the laboratory's pooling strategy. The pooling monitoring process should document the laboratory's $P_{\text{Threshold}}$ for each pool size, $P_{\text{Individual}}$ and the laboratory's process to address the monitoring requirements below.

! Please note that information from the monitoring process described in this Appendix may not be the only information useful to monitor for pooling performance issues or to aid in decision-making for pooling strategy. Thus, laboratories are encouraged to monitor other sources of COVID-19 prevalence or test positivity rate information for their target population, comparing those trends to

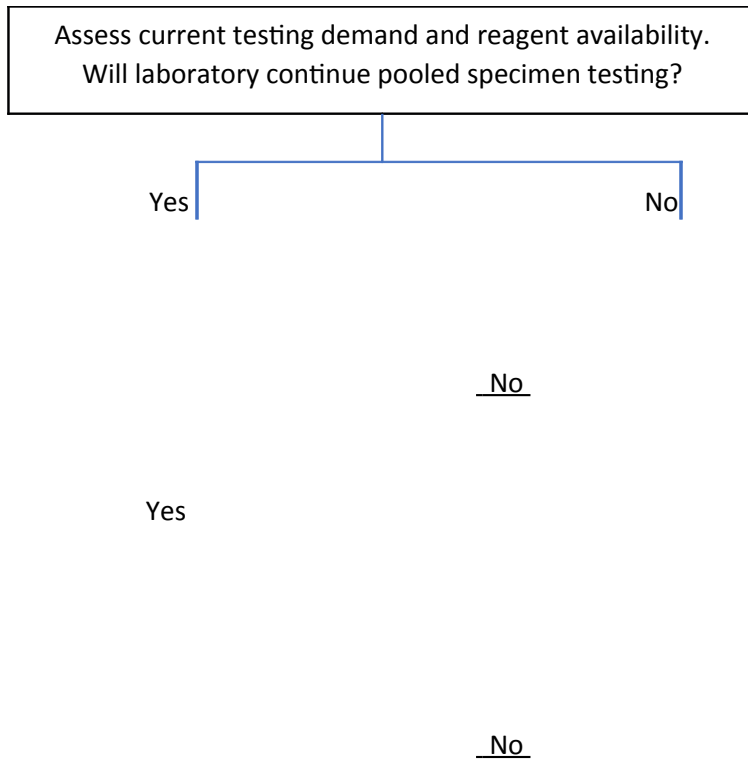
²At $P_{\text{Individual}} \geq 13\%$, $n=3$ offers a greater efficiency than $n=4$, therefore it is recommended that $P_{\text{Threshold}}$ should not be greater than 12% for $n=4$.

their pooling testing trends, as part of the laboratory's pooling monitoring process in addition to the approach below.

Monitoring of the Pooling Strategy

At regular intervals (weekly at a minimum, continual analysis with a moving 7-10 day average preferred), laboratories must monitor the positivity rate of specimen pools as described below.

Figure 1: Overview of Pooling Monitoring Process to be Conducted at Defined Intervals



Data Monitoring Steps to Be Conducted at Each Interval

1. Evaluate need for pooled specimen testing going forward.

Evaluate test demand and testing resource availability. When testing capacity and resource availability are sufficient to meet testing demand without the use of specimen pooling, consider whether the risks of reduced test sensitivity with pooling and extra effort of pooling outweigh the benefits of pooled specimen testing.

2. Calculate Pooled Percent Positive (P_{Pool}) for the interval.

$$P_{Pool} = \frac{\text{Specimens tested under pooling strategy generating positive results}}{\text{Total specimens tested under pooling strategy}}$$

3. Check Interval P_{Pool} Against Positivity Threshold ($P_{Threshold}$) for the pool size in use.

Compare the P_{Pool} for the current interval to the specimen positivity threshold established during pooling implementation.

! If P_{Pool} is greater than $P_{Threshold}$ for the pool size in use, consider a reduction in pool size or discontinuation of specimen pooling until specimen positivity rates decrease in your testing population.

! If P_{Pool} is less than $P_{Threshold}$, proceed to step 4.

4. Check Interval P_{Pool} Against Re-assessment Criteria

Compare P_{Pool} to $P_{Individual}$.

! If P_{Pool} is equal to or greater than 85% of $P_{Individual}$. ($P_{Pool} \geq 0.85 \times P_{Individual}$), then

monitoring checks are complete for this interval. Proceed with the current pooling strategy.

! If P_{Pool} is less than 85% of $P_{Individual}$. ($P_{Pool} < 0.85 \times P_{Individual}$), re-assessment is necessary to

determine if pooled-specimen testing process is still acceptable. Please proceed to the Re-assessment of Pooling section below.

5. Update $P_{Individual}$ if Indicated by Re-assessment.

If re-assessment is conducted and indicates n-specimen pooling is still acceptable, re-establish $P_{Individual}$ in your laboratory using the data generated during re-assessment.

If 10 positive specimens were tested during re-assessment:

$$P_{Individual} = \frac{10 \text{ positive specimens used for re-assessment}}{\text{The total number of specimens tested to reach 10 positive specimens}} \times \frac{10}{11}$$

If 20 positive specimens were tested during re-assessment:

$$P = \frac{20 \text{ positive specimens used for re-assessment}}{\text{Individual}}$$

The total number of specimens tested to reach 20 positive specimens ²¹

$\times \frac{20}{X}$

This updated new positivity rate should be used as P _{Individual} in the future monitoring.

Explanation: This calculation attempts to estimate the individual testing positivity rate in the population from which the 10 (or 20) individual positive samples were collected for re-assessment. Since the total number of samples (N^*) that needed to be tested to obtain 10 (or 20) consecutive positive samples for re-assessment is stopped at the 10th (or 20th) positive sample, then the positivity rate of $10/N^*$ (or $20/N^*$) may be overestimated. $P_{\text{Individual}}$ is corrected in the above calculations by including an appropriate multiplier: estimated positivity rate for 10 positive sample re-assessment data is $(10/N^*) \times (10/11)$ and for 20 samples is $(20/N^*) \times (20/21)$.

Re-assessment of Pooling:

Re-assessment of pooling should be conducted as indicated by monitoring activities. Two possible approaches are presented below.

Option 1

Incoming patient specimens should be tested individually until the collection contains 10 positive specimens.

- ! Using these specimens, 10 n -specimen pools should be created and tested, each with 1 positive and $(n-1)$ negative specimens.
- ! Calculate the PPA between individual testing results and pooled testing results.

Note: For the calculation of the PPA, all pools that generate positive or inconclusive result are considered in agreement with the individually-tested positive result.

Option 2

Incoming patient specimens can continue to be tested in pools.

- ! Re-assessment study should start from time T_0 and should consist of individual sample testing in parallel with the pooled testing. However, since all non-negative sample pools require individual testing of all individual samples included in the pool as a part of the n -sample pooling and deconvoluting workflow, the re-assessment study essentially consists of testing individual samples from the negative n -sample pools.
- ! Re-assessment study may pause at time T_1 when a minimum of 10 consecutive positive individual results are obtained, including both positive individual results generated from individual testing of samples from the non-negative sample pools following the n -sample pooling and deconvoluting workflow, and positive individual results obtained from individual testing of samples from the negative sample pools for the time period from T_0 to T_1 [T_0 , T_1].
- ! Considering that number of positive individual sample results among negative pools is K , PPA between testing n -sample pools and assaying single specimens using the candidate test should be calculated as $\text{PPA (EUA Test pool vs. EUA Test individual)} = 100\% \times (10-K)/10$. It is critical that all consecutive positive samples from time period [T_0 , T_1] are included in the PPA calculations. With regard to calculating the PPA, all non-negative results testing pooled samples should be counted as in agreement with positive individually tested results.

Re-assessment Acceptance Criteria for Option 1 and Option 2

- ! If the PPA between pooled-testing results and individual-testing results is $\geq 90\%$ (9 out of 10 or 10 out of 10), then continuation of testing using n -specimen pooling is acceptable.
- ! If the PPA between pooled-testing results and individual-testing results is less than 85%:
 - o If $PPA \leq 70\%$ (7 out of 10), reduce the pool size (consider $n = 3$) and repeat the re-assessment testing with the new pool size until PPA of pooled compared to individual testing is $\geq 90\%$ OR consider cessation of pooling patient specimens.
 - o If PPA is 80% (8 out of 10), collect an additional 10 consecutive individually positive samples. Then, calculate the PPA from the combined data of 20 samples, between pooled testing results and individual testing results. If the PPA is $\geq 85\%$, then implementation of testing using n -sample pooling is acceptable. Or, to compensate for lost sensitivity, reduce the pool size (consider $n = 3$) and repeat the re-assessment testing with the new pool size until PPA of pooled compared to individual testing is $\geq 85\%$.
- ! If PPA of at least 85% cannot be reached for any pool size, cease pooling patient specimens.
- ! If n -sample pooling is acceptable, return to step 5 in “Data Monitoring” to re-establish P_{Individual}.

Additional Resources:

1. Abdalhamid, et al., Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing resources, Amer J Clin Pathol., Vol 153, June 2020, Pages 715–718. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa064>.
2. Advisory on feasibility of using pooled samples for molecular testing of COVID-19. https://www.icmr.gov.in/pdf/covid/strategy/Advisory_on_feasibility_of_sample_pooling.pdf
3. CDC, Interim Guidance for Use of Pooling Procedures in SARS-CoV-2 Diagnostic, Screening and Surveillance Testing. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>

Questions and Comments:

If you have questions or comments about this procedure, please send by email to: respvirus@cdc.gov.

***** DO NOT DISCARD: Important product-specific information *****

CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel – Verification Requirements

Please consult the following guidance from the Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS) regarding diagnostic tests under Emergency Use Authorization (EUA):

<https://www.cms.gov/Medicare/Provider-Enrollment-and-Certification/SurveyCertificationGenInfo/Policy-and-Memos-to-States-and-Regions-Items/QSO18-19-CLIA>

INTENDED USE

The CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel is a real-time RT-PCR test intended for the qualitative detection of nucleic acid from SARS-CoV-2 in upper and lower respiratory specimens (such as nasopharyngeal or oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage, and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate) collected from individuals suspected of COVID-19 by their healthcare provider¹.

This test is also for the qualitative detection of nucleic acid from the SARS-CoV-2 in pooled samples containing up to four of the individual upper respiratory swab specimens (nasopharyngeal (NP), oropharyngeal (OP), NP/OP combined, or nasal swabs) that were collected using individual vials containing transport media from individuals suspected of COVID-19 by their healthcare provider. Negative results from pooled testing should not be treated as definitive. If a patient's clinical signs and symptoms are inconsistent with a negative result or results are necessary for patient management, then the patient should be considered for individual testing. Specimens included in pools with a positive, inconclusive, or invalid result must be tested individually prior to reporting a result. Specimens with low viral loads may not be detected in sample pools due to the decreased sensitivity of pooled testing.

Las pruebas se limitan a los laboratorios certificados bajo las Enmiendas de Mejora de Laboratorios Clínicos de 1988 (CLIA), 42 U.S.C. § 263a, que cumplen los requisitos para realizar pruebas de alta complejidad.

Los resultados son para la identificación del ARN del SARS-CoV-2. El ARN del SARS-CoV-2 se detecta generalmente en las muestras respiratorias superiores e inferiores durante la infección. Los resultados positivos son indicativos de una infección activa con el SARS-CoV-2, pero no descartan una infección bacteriana o una coinfección con otros virus. Es posible que el agente detectado no sea la causa definitiva de la enfermedad. Los laboratorios de los Estados Unidos y sus territorios están obligados a comunicar todos los resultados a las autoridades sanitarias públicas competentes.

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

Las pruebas con el Panel de Diagnóstico de RT-PCR en Tiempo Real del CDC 2019-nCoV están destinadas a ser utilizadas por personal de laboratorio capacitado que sea competente en la realización de ensayos de RT-PCR en tiempo real. El panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) es sólo para su uso bajo la autorización de uso de emergencia de la Administración de Drogas y Alimentos.

REQUIRED MATERIALS

The 2019 novel coronavirus positive control (nCoVPC) is provided with the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel and should be prepared according to the Instructions for

¹ For this EUA, a healthcare provider includes, but is not limited to, physicians, nurses, pharmacists, technologists, laboratory directors, epidemiologists, or any other practitioners or allied health professionals.

***** DO NOT DISCARD: Important product-specific information *****

Use. The nCoVPC consists of an RNA transcript of the 2019-nCoV N gene as well as human RNase P gene segment. nCoVPC will yield a positive result with the following primer and probe sets: 2019-nCoV_N1, 2019-nCoV_N2, and RP.

Approximately 2 mL of an upper respiratory specimen (e.g. nasopharyngeal swab (NPS) in transport media) are needed for testing. Specimens may be pooled if less than 2 mL of one specimen is available.

Refer to CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel package insert (manufacturer instructions) for additional reagents, materials, and instructions.

PRECAUTIONS

This reagent should be handled in an approved biosafety level 2 (BSL-2) handling area to avoid contamination of laboratory equipment and reagents that could cause false positive results. This product is an RNA transcript and is non-infectious. However, the nCoVPC should be handled in accordance with Good Laboratory Practices.

Store reagent at appropriate temperatures (see Instructions for Use) and hold on ice when thawed.

Please use standard precautions when handling respiratory specimens.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE QIAamp® DSP VIRAL RNA MINI KIT OR THE QIAamp® VIRAL RNA MINI KIT

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 560 ! L of lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 140 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 14 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 14 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 14 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE QIAGEN EZ1® ADVANCED XL

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 280 ! L of lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 120 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.

***** DO NOT DISCARD: Important product-specific information *****

- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE ROCHE MagNA PURE TOTAL NUCLEIC ACID KIT OR THE ROCHE MagNA PURE NUCLEIC ACID ISOLATION KIT I

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 300 ! L of lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 100 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE ROCHE MagNA PURE 24 AND TOTAL NUCLEIC ACID ISOLATION KIT

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 400 ! L of lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 100 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE ROCHE MagNA PURE 96 DNA AND VIRAL NA SMALL VOLUME KIT

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 350 ! L of lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 100 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.

***** DO NOT DISCARD: Important product-specific information *****

- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE PROMEGA MAXWELL® RSC 48

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 330 ! L of lysis buffer (300 µL of lysis buffer + 30 µL Proteinase K, included in the kit) into each of nine tubes labeled 1-9.
- ! Add 120 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

INSTRUCTIONS FOR PREPARING SAMPLES BEFORE EXTRACTION WITH THE BIOMÉRIEUX NucliSENS easyMAG OR THE BIOMÉRIEUX EMAG

- ! Refer to the 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for reconstitution of the materials for use. RNA should be kept cold during preparation and use.
- ! Make a 1/10 dilution of nCoVPC by adding 5 ! L of nCoVPC into 45 ! L of nuclease-free water or 10 mM Tris.
- ! Aliquot 1000 µL or 2000 ! L of pre-aliquoted easyMAG lysis buffer into each of nine tubes labeled 1-9 for the easyMAG or eMAG, respectively.
- ! Add 100 ! L of upper respiratory specimen (e.g. NPS in viral transport media) into each of the nine labeled tubes with lysis buffer.
- ! To prepare samples at a moderate concentration, spike 12 ! L of undiluted nCoVPC (rehydrated as described in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use) into each tube labeled 1-3 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare samples at a low concentration, spike 12 ! L of 1/10 dilution of nCoVPC into each tube labeled 4-6 containing lysis buffer and specimen.
- ! To prepare negative samples, spike 12 ! L of nuclease-free water into each tube labeled 7-9 containing lysis buffer and specimen.
- ! Perform extractions of all nine samples according to the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use.

PROCEDURE

Follow the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use for testing the nine extracted samples at least once.

EXPECTED RESULTS

Moderate nCoVPC samples should be positive for 2019-nCoV.

Low nCoVPC samples should be positive for 2019-nCoV.

Negative upper respiratory samples should be negative for 2019-nCoV.

≥90% of test results should be in agreement with the expected results. If test results are <90% in agreement with expected results, contact CDC at respvirus@cdc.gov.

***** DO NOT DISCARD: Important product-specific information *****

LIMITATIONS

This test has not been FDA cleared or approved.

This test has been authorized by FDA under an EUA for use by authorized laboratories.

This test has been authorized only for the detection of nucleic acid from 2019-nCoV, not for any other viruses or pathogens.

This test is only authorized for the duration of the declaration that circumstances exist justifying the authorization of emergency use of in vitro diagnostics for detection and/or diagnosis of SARS-CoV-2 under Section 564(b)(1) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. § 360bbb-3(b)(1), unless the authorization is terminated or revoked sooner.

QUESTIONS

Please send questions or comments by email to respvirus@cdc.gov.

DISTRIBUTION

Distributed to qualified laboratories by Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA, 30329 USA



*****DO NOT DISCARD: Important product-specific information*****

CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel **For use under EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) only.** **Rx only**

CATALOG: 2019-nCoV-EUA-01

KIT LOT:

EXPIRATION DATE:

INTENDED USE

The CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel is a real-time RT-PCR test intended for the qualitative detection of nucleic acid from SARS-CoV-2 in upper and lower respiratory specimens (such as nasopharyngeal or oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage, and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate) collected from individuals suspected of COVID-19 by their healthcare provider¹.

This test is also for the qualitative detection of nucleic acid from the SARS-CoV-2 in pooled samples containing up to four of the individual upper respiratory swab specimens (nasopharyngeal (NP), oropharyngeal (OP), NP/OP combined, or nasal swabs) that were collected using individual vials containing transport media from individuals suspected of COVID-19 by their healthcare provider. Negative results from pooled testing should not be treated as definitive. If a patient's clinical signs and symptoms are inconsistent with a negative result or results are necessary for patient management, then the patient should be considered for individual testing. Specimens included in pools with a positive, inconclusive, or invalid result must be tested individually prior to reporting a result. Specimens with low viral loads may not be detected in sample pools due to the decreased sensitivity of pooled testing.

Testing is limited to laboratories certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), 42 U.S.C. § 263a, that meet the requirements to perform high complexity tests.

Los resultados son para la identificación del ARN del SARS-CoV-2. El ARN del SARS-CoV-2 se detecta generalmente en las muestras respiratorias superiores e inferiores durante la infección. Los resultados positivos son indicativos de una infección activa con el SARS-CoV-2, pero no descartan una infección bacteriana o una coinfección con otros virus. Es posible que el agente detectado no sea la causa definitiva de la enfermedad. Los laboratorios de los Estados Unidos y sus territorios están obligados a comunicar todos los resultados a las autoridades sanitarias públicas competentes.

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

Testing with the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel is intended for use by trained laboratory personnel who are proficient in performing real-time RT-PCR assays. The CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel is only for use under a Food and Drug Administration's Emergency Use Authorization.

PACKAGE CONTENTS

PACKAGING	COMPONENT	PART NUMBER	COMPONENT LOT NUMBER	VIALS PER KIT	QUANTITY /VIAL	STATE
Oligonucleotide Box	2019-nCoV_N1 Combined Primer/Probe Mix			1	22,5 nmol	Dried
	2019-nCoV_N2 Combined Primer/Probe Mix			1	22,5 nmol	Dried
	RP Combined Primer/Probe Mix			1	22,5 nmol	Dried
Control Box	nCoVPC 2019-nCoV Positive Control (non-infectious)			4	1 x 10 ⁴ copies/μL	Dried

¹ For this EUA, a healthcare provider includes, but is not limited to, physicians, nurses, pharmacists, technologists, laboratory directors, epidemiologists, or any other practitioners or allied health professionals.



STORAGE INSTRUCTIONS

Upon receipt, store at 2-8°C. Refer to the CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use before opening and preparing reagents for use.

PROCEDURE/INTERPRETATION/LIMITATIONS

Users should refer to the **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use** posted on the FDA website for all IVD products used under Emergency Use Authorization, <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm>.

This test has not been FDA cleared or approved.

This test has been authorized by FDA under an EUA for use by authorized laboratories.

This test has been authorized only for the detection of nucleic acid from 2019-nCoV, not for any other viruses or pathogens.

This test is only authorized for the duration of the declaration that circumstances exist justifying the authorization of emergency use of in vitro diagnostics for detection and/or diagnosis of SARS-CoV-2 under Section 564(b)(1) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. § 360bbb-3(b)(1), unless the authorization is terminated or revoked sooner.

PRECAUTIONS

This reagent should be handled in an approved BSL-2 handling area to avoid contamination of laboratory equipment and reagents that could cause false positive results. This product is non-infectious. However, this product should be handled in accordance with Good Laboratory Practices.

REAGENT COMPLAINTS/QUESTIONS

If you have a question/comment about this product, please contact the CDC Division of Viral Diseases/Respiratory Viruses Branch by email at respvirus@cdc.gov.

DISTRIBUTED BY

Manufactured by the Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, Georgia, 30329, USA