

COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast* (HEX)

COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast*, es una prueba de RT-PCR (One-Step) en Tiempo Real en formato multiplex para el diagnóstico del virus SARS-CoV-2 (2019-nCoV) en muestras del tracto respiratorio.

Para diagnóstico in vitro

6055 - COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast*

I) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast*, es una prueba de RT-PCR (One-Step) en tiempo real para la detección cualitativa del ácido nucleico del virus SARS-CoV-2 en muestras clínicas procedentes del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos, lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal) y/o del tracto respiratorio inferior (aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado bronco-alveolar y esputo). El ARN del virus SARS-CoV-2 es generalmente detectable en muestras respiratorias superiores e inferiores durante la infección. Los resultados positivos son indicativos de infección activa con SARS-CoV-2 pero no descartan infección bacteriana o co-infección con otros virus. El agente detectado puede no ser la causa definitiva de la enfermedad. Los resultados negativos de esta prueba no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

II) INTRODUCCIÓN

Inicialmente se produjo un brote de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, que fue informado a la OMS el 31 de diciembre de 2019. Las autoridades chinas identificaron un nuevo coronavirus (denominado 2019-nCoV, actualmente SARS-CoV-2) como el agente causal de la enfermedad. La alta tasa de contagio resultó en la rápida expansión del virus y en cientos de miles de seres humanos con infección confirmada en todo el mundo. Se han reportado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muerte.

El kit COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast* es una prueba de diagnóstico molecular *in vitro* para la detección y diagnóstico de SARS-CoV-2. El ARN extraído a partir de las muestras clínicas, será retrotranscrito a ADN y amplificado mediante PCR en tiempo real en un solo paso basándose en la amplificación de regiones específicas del genoma viral. El producto contiene cebadores y sondas de hidrólisis (TaqMan®) y material de control utilizado en la RT-PCR para la detección cualitativa *in vitro* de ARN SARS-CoV-2 en muestras del tracto respiratorio.

Todos los usuarios y analistas que utilicen este kit, deben ser capacitados por un asesor técnico competente antes de utilizarlo e interpretar los resultados.

III) PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

El kit se basa en la retrotranscripción, amplificación y detección por PCR en tiempo real de secuencias específicas del gen que codifica para la proteína N de la nucleocápside viral. Adicionalmente el kit contiene otro juego de cebadores y sonda para la amplificación del gen humano de la RNasa P (Control Interno) como control de la extracción de ARN.

IV) PRESENTACIÓN

El kit COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast* contiene todos los reactivos necesarios para realizar la determinación del ARN viral en muestras del tracto respiratorio. **El kit rinde 240 reacciones (RXN), incluyendo controles y muestras.**

Kit de RT-PCR en Tiempo Real x 240 RXN.	
COMPONENTE	PRESENTACIÓN
Master Mix 4x	3 x 415 µL
Mix SARS-CoV-2 <i>Fast</i>	3 x 830 µL
Control Positivo	1 x 100 µL

V) MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para la utilización del kit COVID-19 RT-PCR Real *TM Fast*, que no se incluyen en el mismo:

- Tubos de microcentrífuga 1,5 mL (libre de DNAsas y RNAsas)
- Tubos, *strips* o placas ópticas para la PCR en tiempo real
- Micropipetas adecuadas (10 µL, 20 µL, 100 µL y 1.000 µL)
- Puntas de pipeta (*tips*) estériles con filtro
- Agua libre de DNAsas y RNAsas
- Reactivo para eliminar ácidos nucleicos contaminantes de superficies y materiales
- Alcohol 70%
- Guantes de nitrilo o látex libres de polvo
- Centrífuga para tubos de microcentrífuga 1,5 mL
- Agitador tipo vórtex
- Freezer -20°C
- Equipo de PCR en Tiempo Real (Rotor Gene, ABI 7500 o 7500 *Fast*, QuantStudio 3 o 5, CFX-96)
- Kit de extracción de ARN

VI) ADVERTENCIAS

- Todo el material utilizado es potencialmente PELIGROSO. Utilizar todas las medidas de bioseguridad correspondientes para realizar el procesamiento de las muestras.
- Antes de utilizar, verificar que las soluciones del kit estén completamente descongeladas y homogeneizadas.
- Realizar el descongelamiento inmediatamente antes de usar a fin de evitar la exposición de los componentes a temperatura ambiente y luz durante períodos prolongados. Una vez descongelados mantener en hielo.

VII) PRECAUCIONES

- Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No tomar de forma simultánea tubos de diferentes cajas para evitar el intercambio de tubos de diferentes lotes.
- El procesamiento de muestras debe llevarse a cabo por personal capacitado en las técnicas utilizadas.
- Es importante familiarizarse con el manual de instrucciones para evitar errores de procesamiento de las muestras.
- La manipulación de las muestras potencialmente infecciosas debe realizarse dentro de una cabina de seguridad biológica de Clase II (o superior).
- Utilice equipo de protección personal como guantes sin polvo, protección para los ojos, cofia, cubrecalzado, sobretúnica y túnica de laboratorio.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder de forma unidireccional para minimizar posibles contaminaciones.
- Cambie las puntas de pipeta entre todas las transferencias manuales de líquidos.
- La presencia de muestras de muy alta carga viral, pueden ocasionar falsos positivos por contaminación cruzada, por tanto, se debe tener especial cuidado durante la manipulación de las muestras.
- Durante la preparación de muestras, el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio es esencial para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras y la introducción accidental de nucleasas después del procedimiento de extracción.
- Cambie los guantes entre muestras siempre que se sospeche contaminación.
- Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible para evitar contaminaciones.
- Las superficies de trabajo, las pipetas y las centrifugas deben limpiarse y descontaminarse con productos como hipoclorito de sodio al 10%, "DNAZap™" o "RNAse AWAY®" para minimizar el riesgo de contaminación. El exceso de hipoclorito debe eliminarse con etanol al 70%.
- Limpie y desinfecte todos los derrames de reactivos o muestras con un desinfectante como hipoclorito de sodio al 0,5% u otro desinfectante adecuado.
- Evite el contacto de la muestra o reactivo con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si la piel, los ojos o las membranas mucosas entran en contacto, enjuáguese inmediatamente con agua y acuda a un médico.
- El ARN debe mantenerse el mínimo tiempo posible a temperatura ambiente para garantizar su estabilidad.
- Deseche los reactivos del kit no utilizados y las muestras humanas de acuerdo con las buenas prácticas de manejo de residuos biológicos.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas y superficies de trabajo.

VIII) CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

- Para su correcto almacenamiento deben seguirse las indicaciones correspondientes a cada componente del Kit en su respectiva etiqueta, respetando la fecha de caducidad indicada.
- Se recomienda almacenar los componentes a -20°C. Los mismos soportan hasta 10 ciclos de descongelado, en caso de ser necesario realizar más descongelados, se recomienda alicuotar en el primer descongelado para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

IX) RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

1) TRACTO RESPIRATORIO BAJO

Lavado bronco-alveolar o aspirado de tráquea

Colectar de 1,5 a 3 mL en un contenedor estéril para colecta de esputo con tapa rosca a prueba de pérdidas o en un tubo seco estéril.

Esputo

Haga que el paciente se enjuague la boca con agua y luego expectore el esputo de tos profunda directamente en un recipiente estéril, a prueba de pérdidas, con tapa rosca o un recipiente seco estéril.

2) TRACTO RESPIRATORIO ALTO

Hisopado Nasofaríngeo y/o Hisopado Orofaringeo

Utilice solo hisopos compatibles con técnicas de biología molecular con varilla de plástico. No utilice hisopos de alginato de calcio o hisopos con marco de madera, ya que pueden contener sustancias que inactivan al virus e inhiben las pruebas de PCR.

HN: inserte un hisopo en la fosa nasal paralela al paladar. Deje el hisopo en su lugar durante unos segundos para absorber las secreciones.

HO (p. Ej., Hisopos de garganta): frote la faringe posterior, evitando la lengua.

Coloque los hisopos inmediatamente en tubos estériles que contengan 2-3 mL de medio de transporte viral. Las muestras de HN y HO pueden mantenerse en viales separados o combinarse en la recolección en un solo vial.

Lavado / aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal

Colectar de 2 a 3 mL del lavado/aspirado en un contenedor estéril para colecta de esputo con tapa rosca o tubo seco estéril.

X) TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- La recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras de manera inapropiada puede dar lugar a la obtención de resultados falsos negativos. La capacitación en la recolección de muestras es muy recomendable debido a la importancia de la calidad de la misma. Siga las instrucciones del fabricante del dispositivo de recolección de muestras para conocer los métodos de recolección adecuados. Las muestras deben transportarse refrigeradas de 2-8°C. El transporte de muestras clínicas debe cumplir con las regulaciones locales, nacionales y estatales para el transporte de agentes biológicos. Almacene las muestras a 2-8 °C por hasta 72 horas después de la recolección. Si se espera un retraso en la extracción del ARN, almacene las muestras a -70 °C o menos.
- El ARN extraído debe analizarse en el momento, de lo contrario debe almacenarse a -70°C o menos. Para la extracción de ARN se recomienda utilizar kits de extracción de ARN comerciales que incluyan tratamiento con DNasa.

XI) PROCEDIMIENTO

Preparación de la mezcla de reacción:

- Descongelar completamente los componentes del kit.
- Mezclar por inversión todos los insumos del kit durante unos segundos.
- Dar un spin con la centrifuga a **todos** los insumos.
- Preparar la mezcla de reacción según la cantidad de reacciones que se van a utilizar (N) de acuerdo a lo indicado en la tabla a continuación. Tomar en cuenta un Control Positivo y un Control Negativo de PCR (buffer de elución de ARN o agua calidad biología molecular, no incluidos en el kit):

	1 rxn (µL)	N rxns
Master Mix 4x	5	5 x N
Mix SARS-CoV-2	10	10 x N

- Alicuotar **15 µl de la mezcla de reacción** en tubos de PCR, *strips*, o placa de acuerdo al equipamiento a utilizar.

- Agregar **5 µl** de **Control Negativo** (buffer de elución de ARN o agua para biología molecular) al tubo de reacción correspondiente al C- de PCR; Agregar **5 µl** de **Control Positivo** al tubo de reacción correspondiente al C+ de PCR; Agregar **5 µl** de cada **muestra de ARN extraído** a cada tubo de reacción (previo a la apertura de cada muestra se recomienda la realización de un *spin* para evitar aerosoles).

- Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ARN debe ser extraído de forma adecuada. Una forma inadecuada de recolección, almacenamiento y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

XII) Configuración del termociclador de Real time

- Colocar los tubos de reacción en el termociclador.
- La técnica contiene las siguientes etapas: 1) Retro-transcripción 2) Inactivación de RT/Desnaturalización inicial 3) Amplificación y Detección. En la tabla a continuación se presenta el programa para el ciclado a configurar:

Etapa	Temp.	Tiempo	Detección	Ciclos
1	50°C	5 min.	-	1
2	95°C	20 seg.	-	1
3	95°C	15 seg.	-	40
	60°C	30 seg.	FAM HEX	

- * En el caso del Rotor-Gene elegir la opción de calibración antes de la primera adquisición en los canales FAM y HEX.
- * En los equipos que así lo requieran indicar como referencia pasiva: Rox

Ajustes sugeridos para el análisis

La línea umbral dependerá del equipo utilizado por lo cual la misma puede ajustarse manualmente ubicándola en la décima parte inferior de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia de FAM/HEX y por encima de cualquier señal de fondo.

Interpretación de Resultados

	FAM (SARS-CoV-2)	HEX (Control Interno)
Control negativo	No amplifica	No amplifica
Control positivo	Ct ≤ 30	No amplifica
Muestra positiva	Ct < 35	Irrelevante
Muestra negativa	> 39 o No amplifica	Ct ≤ 35
Muestra Indeterminada*	35 ≤ Ct ≤ 39	Ct ≤ 35
Muestra Invalida*	No amplifica	>35 o No amplifica

* Repetir extracción y/o PCR

Si el Control Positivo y/o Negativo de PCR, no se encuentran en el rango de valores aceptables, el ensayo no puede ser validado y el mismo deberá ser repetido. Si el resultado del Control Interno de una muestra presuntamente Negativa no cumple con el criterio de aceptación, el resultado no podrá ser validado y la muestra debe ser procesada nuevamente.

Limitaciones de la Prueba

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, signos y los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos de esta prueba no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente.

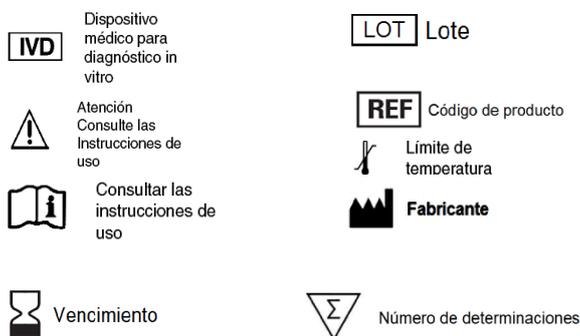
XIII) PROBLEMAS Y SOLUCIONES

- 1. Baja o nula señal del control interno.**
 - **La PCR está inhibida.** Asegúrese que está usando el método de extracción adecuado y que se sigue el protocolo debidamente.
 - **Las condiciones de almacenamiento no se han cumplido correctamente.** Verifique las condiciones de almacenamiento.
 - **El ARN extraído no tiene la calidad y/o cantidad adecuada.** Repita el estudio desde la extracción de ARN.
 - **Las condiciones de la PCR no fueron las adecuadas.** Revise las condiciones de la PCR y que el termociclador haya sido configurado correctamente y se encuentre debidamente calibrado.
- 2. Baja o nula señal del control positivo de PCR.**
 - **Las condiciones de la PCR no fueron las adecuadas.** Revise las condiciones de la PCR y que el termociclador haya sido programado correctamente y se encuentre debidamente calibrado.
 - **Las condiciones de almacenamiento no se han cumplido correctamente.** Verifique las condiciones de almacenamiento del kit.
 - **La cantidad de control positivo de PCR que se agregó no fue la adecuada.** Ponga atención a la cantidad de control positivo que se agrega a la PCR.
 - **Revisar fecha de vencimientos de los reactivos.** NO utilizar reactivos después de su fecha de caducidad.
- 3. Se obtiene señal (en FAM y/o HEX) en los controles negativos de PCR.**
 - **Existe una contaminación durante la preparación de la PCR.** Descontamine todas las superficies de trabajo y los instrumentos con reactivos adecuados para la descontaminación de ADN y ARN, etanol 70% y bajo lámpara de UV. Use *tips* con filtro en todo el proceso de extracción. Cambie los *tips* entre las diferentes muestras. Repita el ensayo. Agregue el control positivo al final.

XIV) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. WHO, Interim Guidance, 19 de marzo de 2020.
- 2) Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. WHO. 2020.

XV) SIMBOLOGÍA UTILIZADA EN EL KIT



ATGen S.R.L., Av. Italia 6201, Parque Tecnológico LATU, Edificio Los Tilos, Montevideo Uruguay. Tel: (+598)26006001 D.T.: QF. Andrés Abin