

ECUGEN SARS-CoV-2 RT-qPCR kit, es una prueba de RT-PCR (One-Step) en tiempo real en formato "triplex" para el diagnóstico in vitro del virus SARS-CoV-2 en muestras respiratorias.

USO PREVISTO

El kit de diagnóstico ECUGEN SARS-CoV-2 RT-qPCR, es una prueba de RT-PCR en tiempo real para la detección del ARN del virus SARS-CoV-2 en muestras clínicas procedentes del tracto respiratorio: hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos, lavado/aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado bronco-alveolar y esputo. Los resultados positivos son indicativos de infección activa con SARS-CoV-2 pero no descartan infección bacteriana o co-infección con otros virus. Los resultados negativos de esta prueba no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el diagnóstico. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas del paciente e información epidemiológica.

INTRODUCCIÓN

El 30 de diciembre de 2019 fue reportado 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 o SARS-CoV-2. La alta tasa de contagio resultó en la explosiva expansión del virus hasta la declaración mundial de pandemia. Se han reportado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muerte.

El kit ECUGEN SARS-CoV-2 RT-qPCR 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 ARN 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 de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias.

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 nucleocápsida del SARS-CoV-2. 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. Las secuencias específicas del gen N se denominan N1 y N2, y las sondas para su detección están marcadas con FAM y HEX, respectivamente. La secuencia específica del gen RNasaP se denomina RP, y la sonda para su detección está marcada con Cy5.

PRESENTACIÓN

El kit ECUGEN SARS-CoV-2 RT-qPCR contiene todos los reactivos necesarios para realizar la determinación del ARN de SARS-CoV-2 en muestras del tracto respiratorio. El kit rinde 100 reacciones, incluyendo controles y muestra.

Componente	Presentación
Master Mix 4x	390 uL
RNase FREE WATER	800 uL
Primers+Probes Mix	120 uL
Positive Control (20.000copies/uL)	30 uL

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizando el kit ECUGEN SARS-CoV-2 RT-qPCR que no se incluyen en el mismo:

- Tubos de microcentrífuga 1,5 mL (libre de DNAsas y RNAsas)
- Tubos o placas para la PCR en tiempo real
- Micropipetas
- Puntas de pipeta (tips) estériles con filtro
- Alcohol 70%
- Guantes de nitrilo o látex libres de polvo
- Termobloque
- Centrífuga para tubos de microcentrífuga 1,5 mL
- Agitador tipo vórtex
- Freezer -20°C
- Equipo de PCR en Tiempo Real (CFX96 de Biorad o similar)
- Kit de extracción de ARN

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

- Todo el material utilizado es potencialmente peligroso. Utilice todas las medidas de bioseguridad correspondientes para realizar el procesamiento de las muestras.
- Verifique que las soluciones del kit estén completamente descongeladas y homogeneizadas previo a su utilización.
- Realice 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.

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 con las adecuadas medidas de bioseguridad.
- Es importante familiarizarse con el manual de instrucciones para evitar errores de procesamiento de las muestras.
- 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 e incluir los pertinentes controles de contaminación de extracción de RNA y controles de contaminación en PCR.
- El ARN debe mantenerse el mínimo tiempo posible a temperatura ambiente para garantizar su estabilidad.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Se recomienda almacenar los componentes a -20°C. Los mismos soportan hasta 5 ciclos de descongelación. Se recomienda que en caso de ser necesario realizar más ciclos de descongelación, se proceda a alicuotar los reactivos del kit para minimizar los ciclos de descongelación.

PROCEDIMIENTO

A. Mezcla de reacción:

En la siguiente tabla se detalla la mezcla de reacción, indicando los volúmenes de cada componente para una sola muestra.

Componente	Volumen
Master Mix 4x	3.75 uL
RNase FREE WATER	6.13 uL
Primers + robes Mix	1.12 uL
Muestra de ARN o control positivo	4 uL
TOTAL	15 uL

Para X muestras, se recomienda multiplicar el volumen de cada componente por un factor (X+1), y una vez mezclados todos los volúmenes con excepción del ARN de cada muestra, proceder a alicuotar el volumen de mezcla de reacción correspondiente a cada muestra (11 uL). Se recomienda dar un golpe de centrifuga a todos los viales de reactivos previo a su uso

B. Programación del termociclador (Optimizado para CFX96 de Biorad)

En la siguiente tabla se detalla el protocolo de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 con el kit ECUGEN. Hay que seleccionar los canales FAM, HEX y Cy5 para la detección de las sondas N1, N2 y RP, respectivamente. Se seleccionará la detección de las 3 sondas al final de cada ciclo de amplificación.

Etap	Temperatura	Tiempo	Deteccion	Ciclos
Retrotranscripción	50°C	5 min.	No aplica	1
Desnaturalización	95°C	1 min.	No aplica	1
Ciclado y detección	95°C	15 seg.	No aplica	42
	55°C	1 min.	FAM/HEX/Cy5	

C. Interpretación de los resultados

Se recomienda correr una reacción de control positivo para cada serie de reacciones de RT-PCR. Si el protocolo ha sido aplicado correctamente y los reactivos han sido usados de forma adecuada, para considerar valida una serie de reacciones de RT-PCR, los valores de Ct esperados para N1 y N2 para el control positivo deben ser menores a 30. En la siguiente table se detalla las combinaciones de resultados posibles para las sondas N1, N2 y RP, y la interpretación del resultado diagnóstico de la muestra.

N1 (FAM)	N2 (HEX)	RP (cy5)	Resultado
no amplific	no amplifica	Ct ≤ 40	SARS-CoV-2 Negativo
Ct ≤ 40	Ct ≤ 40	irrelevante ¹	SARS-CoV-2 Positivo
Ct ≤ 40	no amplifica	irrelevante ¹	Indeterminado ²
no amplifica	Ct ≤ 38	irrelevante ¹	Indeterminado ²
no amplifica	Ct ≥ 38	Ct ≤ 40	SARS-CoV-2 Negativo ³
no amplifica	no amplifica	no amplifica	Invalido ⁴

(1). Las muestras positivas presentan normalmente amplificación de RP con Ct≤40, aunque puede haber ocasiones en que amplifiquen N1 y N2 pero no RP, sin que esto afecte a interpretar la muestra como SARS-CoV-2 positiva.

(2). Las muestras indeterminadas son aquellas donde sólo amplifica una de las sondas virales. Se recomienda repetir la extracción de ARN y/o PCR. Si tras la repetición la muestra vuelve a ser positiva para al menos una de las sondas N1 o N2, el resultado es SARS-CoV-2 positivo.

(3). La sonda N2 puede generar en ocasiones una amplificación inespecífica con valores de Ct mayores a 38. Por tanto, si una muestras es negativa para N1 y positiva para N2 pero con Ct mayor a 38, el resultado es SARS-CoV-2 negativo.

(4). Si ninguna de las sondas amplifica, la muestra se considera inválida y hay que repetirla extracción de RNA y/o la toma de muestra.

EVALUACIÓN CLÍNICA Y SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La evaluación clínica de ECUGEN SARS-CoV-2 RT-PCR kit para detección de SARS-CoV-2 a partir de muestras respiratorias fue determinada por comparación con el protocolo del CDC de Atlanta (USA) (Referencia 1). Para un total de 172 muestras clínicas evaluadas, se obtuvieron valores de 97.7% para la sensibilidad y 100% para la especificidad (ver Referencia 2).

El límite de detección para ECUGEN SARS-CoV-2 RT-PCR kit es de 1000 copias de ARN viral por cada mL de muestra. Para un protocolo standard de extracción de ARN empleando 0.2mL de muestra y un volumen de elución de 40 uL, el límite de detección sería de 5 copias/uL de solución de extracción de ARN. Dado que se emplean 4 uL de ARN por reacción de PCR, el límite de detección puede expresarse también como 20 copias de ARN viral por reacción de PCR.

El Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación "Leopoldo Izquieta Pérez" de Ecuador realizó una evaluación clínica comparativa de ECUGEN SARS-CoV-2, utilizando el protocolo Charité de Berlín como referencia. Para un total de 185 muestras clínicas evaluadas, se obtuvo un valor de sensibilidad de 98% y especificidad de 100%.

LIMITACIONES DEL TEST

- Los resultados negativos de este test 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.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra y de una adecuada extracción del ARN.

REFERENCIAS

- Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Center for Diseases Control and Prevention, USA. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (last access 09/05/20).
- Freire-Paspuel B. and Garcia-Bereguain MA. Analytical sensitivity and clinical performance of a triplex RT-qPCR assay using CDC N1, N2 and RP targets for SARS-CoV-2 diagnosis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. Oct 25: S1201-9712(20)32250-5. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.047. O