

## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

### 1. Principio

El procedimiento para la detección y caracterización de SARS-CoV-2 mediante este kit, es un ensayo de PCR en Tiempo Real de un solo paso, donde los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante la detección por fluorescencia, se puede medir durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de cDNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Para éste kit las regiones en ORF1ab y el gen N son los blancos de amplificación para la identificación del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2), utilizando iniciadores y sondas específicas para su detección. El reactivo también cuenta con la detección de un control endógeno, que es usado para monitorear el proceso de toma de la muestra, extracción y amplificación de la PCR.

### 2. Condiciones de almacenamiento

- El kit debe almacenarse a -20°C +/- 10°C.
- Los reactivos del kit pueden almacenarse a 4°C durante 3 días, el congelar y descongelar repetidamente puede dañar los componentes del kit.

### 3. Contenido del kit

Kit	Especificaciones	Cantidad	Principales componentes
Reactivos para detección por PCR (96 pruebas por kit)	NC (ORF 1ab-VIC / N-FAM) PCR reaction solution A	2x900 µl	Iniciadores específicos, sondas, Tris-HCl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> , dNTPs.
	NC (ORF 1ab/N) PCR reaction solution B	2x200 µl	Hot Start Taq DNA polimerasa, c-MMLV retrotranscriptasa, Rnasin, etc.

## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

### 4. Tipo de muestra

Exudados faríngeos y/o nasofaríngeos, lavado bronquioalveolar, aspirado traqueal y biopsia de pulmón.

### 5. Preparación de la mezcla de reacción

*NOTA: Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba.*

- Descongelar el tubo A y el tubo B, centrifugarlos brevemente para eliminar las gotas que puedan quedar en las paredes y tapas.
- La preparación de la mezcla de reacción se lleva a cabo en el área del laboratorio asignada para "Master Mix". Se realiza de acuerdo a la tabla 1, los valores en la tabla sólo son para una reacción, se deberán de realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se requiera trabajar, además se debe considerar los controles positivo y negativo por cada corrida de PCR, tomando en cuenta que es necesario que se prepare una reacción extra de la mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen por 1 reacción
Tubo A	17 µl
Tubo B	3 µl
Volumen total	20 µl

**Tabla 1.-** Cantidades para la preparación de la mezcla de reacción.

- Mezclar suavemente por pipeteo o vortex y centrifugue brevemente para bajar las gotas que puedan quedar en la pared y tapa del tubo.
- Coloque 20 µl de la mezcla de reacción en los pozos de la placa o tubos de PCR que empleara en el ensayo.
- Posteriormente colocar 5 µL de agua grado biología molecular en el pozo 1A, que servirá como control negativo (NTC, Negative Template Control) de reactivos de la mezcla de reacción.
- Se coloca la tapa óptica únicamente en el pozo marcado como NTC y se cubre toda la placa con papel aluminio para protegerla de la luz, manteniéndola en red fría (4 °C) hasta su uso.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

6. Adición de moldes a la mezcla de reacción

Al término de la preparación de la mezcla de reacción, la placa cubierta con papel aluminio y en red fría se pasará al área del laboratorio asignada para “Templados”, en donde se colocará 5 µL del extracto en el pozo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 µL. Cabe señalar que conforme se vaya adicionando el extracto a la columna correspondiente, se colocará una tapa óptica, esto se repetirá hasta completar todas las muestras incluyendo el Control de Reactivos de Extracción (CRE). Este paso se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II o cabina de PCR. (Figura 1)

		1	2	4	5	6	7	8	9	1	1	1
									0	1	2	
IC/N/ORF1	A	N	M									M
ab		TC	8									88
IC/N/ORF1	B	M	M									M
ab		1	9									89
IC/N/ORF1	C	M	M									M
ab		2	10									90
IC/N/ORF1	D	M	M									M
ab		3	11									91
IC/N/ORF1	E	M	M									M
ab		4	12									92
IC/N/ORF1	F	M	M									M
ab		5	13									93
IC/N/ORF1	G	M	M									I
ab		6	14									C
IC/N/ORF1	H	M	M									P
ab		7	15									TC

Figura 1.- Ejemplo de una placa de 96 microtubos para PCR.

Finalmente se pasará la placa cubierta con papel aluminio y en red fría al área del laboratorio asignada para “Controles Positivos”, en donde se colocará 5 µL del control Interno (IC: NC (ORF 1 ab/N) “negative control”) y del control positivo (PTC: NC (ORF 1 ab/N) “positive control”), proporcionados en el kit de detección, en el pozo correspondiente. (Figura 1)

## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

Cabe hacer mención de que el Control Interno y el control positivo no necesariamente deben colocarse en los pozos de la columna 12, ya que, si son menos muestras las que se procesarán en la placa, éstos pueden recorrerse.

Posteriormente se deberá de trasladar la placa de microtubos cubierta con el papel aluminio al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real de la marca Applied Biosystems 7500 Fast System.

Antes de introducir la placa al termociclador se centrifuga a 1400 rpm durante 1 min o en su defecto se sacude la placa con la mano y con fuerza de arriba hacia abajo las veces necesarias para permitir que baje el contenido retenido en las orillas de los pozos, evitando que se quede el líquido en las tapas o paredes de los tubos de reacción.

### 7. Condiciones de amplificación

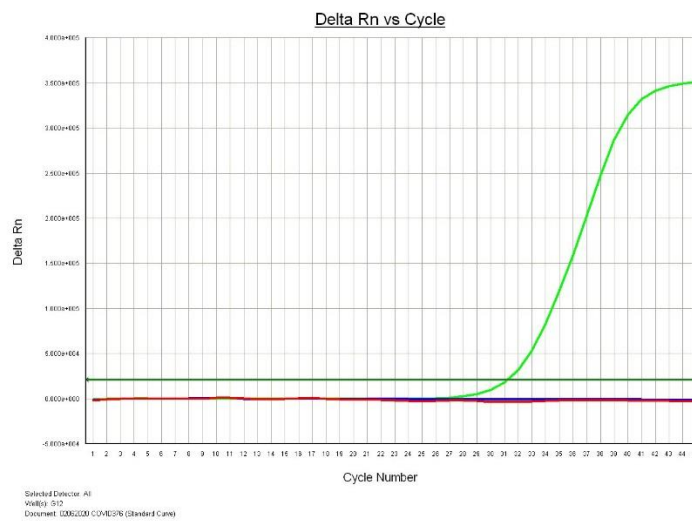
Etapas	Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Colecta de datos
1	1	50	00:15:00	
2	1	95	00:15:00	
3	45	94	00:00:15	
		55	00:00:45	✓

### 8. Control de calidad

- El control negativo NC (ORF1 ab/N) no debe presentar ninguna curva de amplificación para los canales FAM y VIC, pero debe presentar curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5. (Figura 2)

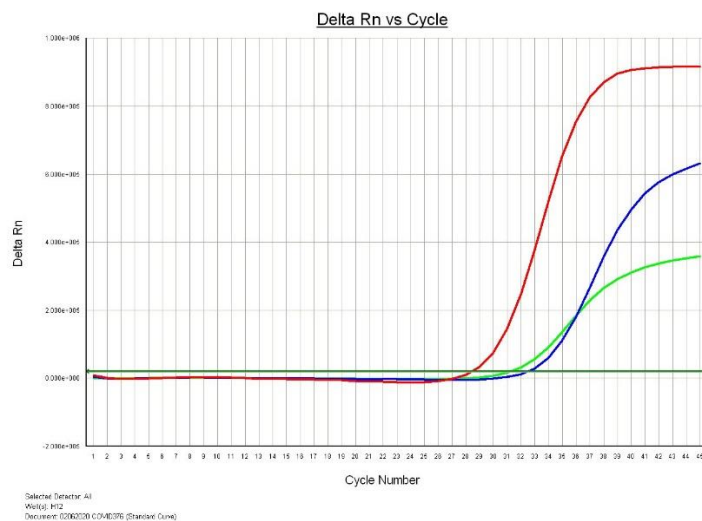
LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene



➤ Figura 2.- Amplificación del Control Interno.

- El control positivo NC (ORF 1 ab/N) positive control; debe presentar curvas de amplificación para los canales FAM y VIC con un valor de Ct  $\leq 32$  y puede o no presentar curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5. (Figura 3)



**Figura 3.- Amplificación del Control Positivo.**

Los controles negativos y positivos deben ser probados en cada experimento. Estos requerimientos deben cumplirse en cada una de las

## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

corridas con las muestras, de otra manera, el experimento debe considerarse invalido y deberá correrse de nuevo.

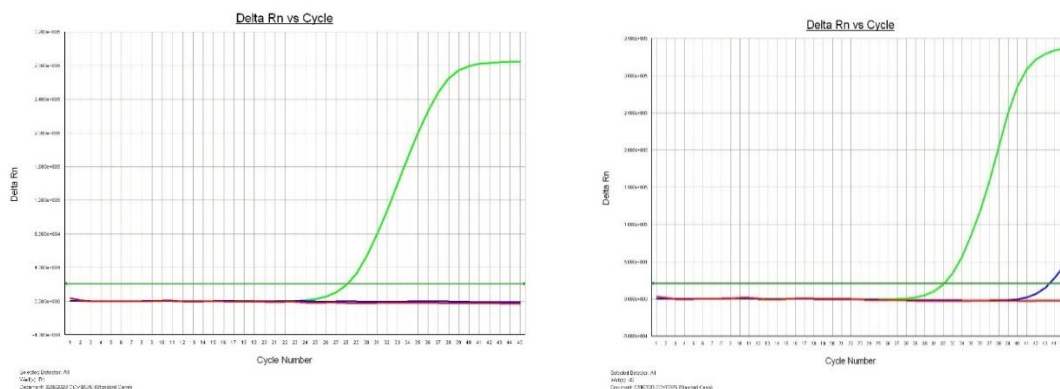
### 9. Interpretación de resultados

Los gráficos que a continuación se presentan son representativos de los resultados obtenidos durante las diferentes corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Los valores positivos reportables pueden emitirse con  $Ct \leq 40$ .

Cuando se observen las amplificaciones o las curvas sigmoideas de los marcadores con base en los siguientes colores, se tienen los siguientes resultados:

Marcador	Color
N (FAM)	Rojo
ORF1ab (VIC)	Azul
Control Interno (CY5)	Verde fosforescente

- Si en la corrida de las muestras no existe una curva de amplificación o estas tienen un valor de  $Ct > 40$  en los canales de FAM y VIC, además de presentar una curva de amplificación para el control endógeno en el canal de CY5, la muestra se considera Negativa. (Figura 4)



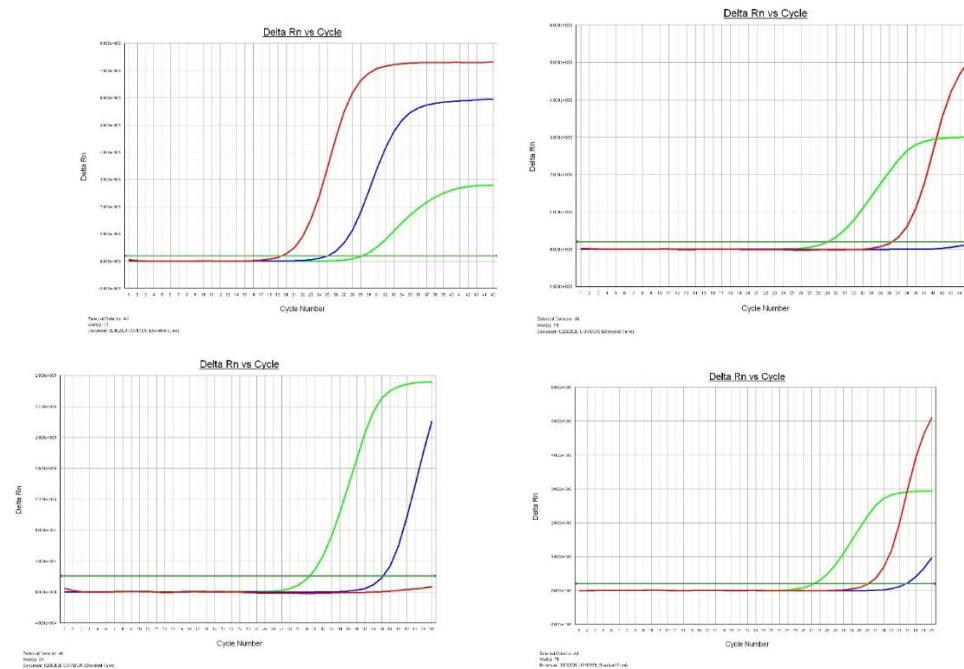
**Figura 4.- Ejemplo de muestras Negativa.**

- Si la muestra presenta una curva de amplificación en los canales de FAM y VIC o solamente en uno de los dos canales, con valores de  $Ct \leq 40$ , se considera Positiva. (Figura 5). Cuando la detección en los canales de FAM y VIC son positivos, el resultado del canal de CY5

# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

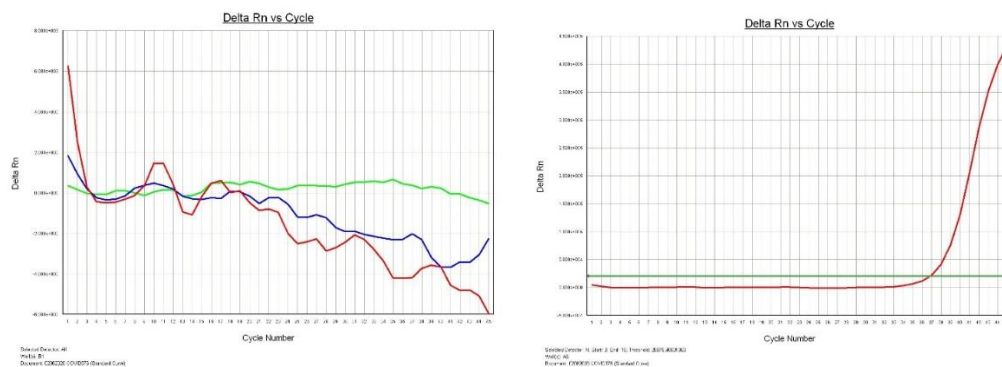
## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

(control endógeno) puede ser negativo debido a la competición en el sistema.



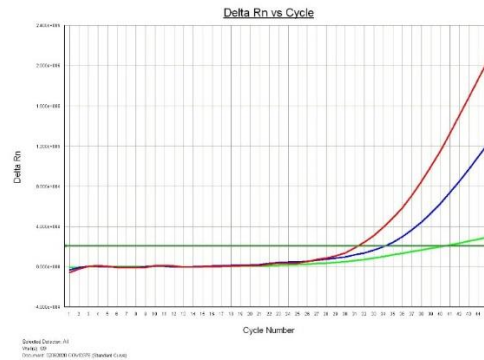
**Figura 5.- Amplificación de muestras Positivas.**

- Cuando el control endógeno resulta negativo y los canales de FAM y VIC también son negativos entonces indica que la reacción se ha inhibido o existe algún error en el proceso, por lo que la corrida debe ser invalidada, así mismo, si no existe amplificación del control interno, pero sí de FAM o VIC, la muestra deberá ser reprocesada. (Figura 6)



LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene



**Figura 6.-** Ejemplo de muestras para repetición.

## 10. Valor de corte para muestras positivas

- El fabricante determinó el valor de  $Ct \leq 40$  para considerar una muestra como positiva.

## 11. Medidas de Bioseguridad

- Para el desarrollo de esta técnica se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:
- En ésta técnica, únicamente se manejan materiales genéticos sin ningún riesgo, por lo tanto, no hay probabilidad de contagio con este tipo de muestras y reactivos, no obstante, las medidas de seguridad son las utilizadas para un patógeno de riesgo biológico de tipo II.
- Para realizar ésta metodología, el personal debe tener conocimiento del Reglamento de Seguridad, así como de las Hojas de Seguridad Química, para que, en caso de ocurrir un derrame, sepa actuar de manera correcta.
- El flujo de trabajo deberá llevarse a cabo según lo establecido en el reglamento de bioseguridad GABI-L-02 Sección V del Manual de Bioseguridad, donde se hace mención del equipo de protección personal que debe portarse, competencia del personal que trabaja dentro de cada una de las áreas, acceso a áreas restringidas, etc.
- Antes y después de utilizar los gabinetes de seguridad biológica, los equipos médicos, las micropipetas y las mesas de trabajo, debe realizarse una limpieza de los mismos, utilizando etanol al 70% o



## G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

RNase-Away diariamente y realizar la limpieza exhaustiva una vez cada 15 días, utilizando hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% y eliminar inmediatamente residuos con agua destilada.

- Mantener las áreas separadas entre el lugar de preparación de los reactivos de la mezcla de reacción para el PCR, colocación de ácidos nucleicos y adición de controles positivos.
- Mantener separados los equipos médicos (como pipetas, vortex y microcentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga, placas para PCR, tapas ópticas y puntas de pipeta) en cada una de las áreas, por buenas prácticas de laboratorio y para evitar contaminaciones cruzadas.
- Realizar la técnica adecuada de lavado de manos, antes y después de realizar las actividades dentro del laboratorio, según lo establecido en el procedimiento GABI-P-21.
- Utilizar el equipo de protección personal (bata blanca y zapatos cerrados) al acceder al laboratorio. Al ingresar a cada área, además del equipo de contención primaria de seguridad, se deberá utilizar bata desechable, guantes y cubrebocas exclusivos para cada una de las áreas, de acuerdo a lo establecido en el GABI-P-20.
- Evitar abrir o cerrar la puerta cuando algunos de los operarios estén usando la cabina de PCR o de bioseguridad.
- Evitar ingresar en áreas anteriores al proceso, en caso de usar el área Post-PCR, ya no se podrá ingresar a ninguna otra.
- Se recomienda que por cada placa completada con los extractos de material genético se utilicen guantes nuevos, o en su defecto limpiar con abundante alcohol al 70% o solución de RNase away los guantes ya utilizados, con el fin de evitar contaminación cruzada o cada vez que se sospeche que pudo haberse contaminado y se toman en cuenta las medidas que se establecen en el GABI-P-27 para la formación de aerosoles.
- Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible y en red fría.
- Cada vez que se coloque un extracto por pozo, debe cambiarse la punta para micropipeta empleada.
- Asegurarse que las tapas ópticas se encuentren perfectamente bien selladas después de adicionar los extractos y controles positivos, antes de introducir la placa al termociclador.
- El material de desecho generado debe ser colocado en el contenedor para manejo especial con bolsa transparente para su eliminación, de acuerdo al procedimiento GABI-P-12.

G. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Da An Gene

- El almacenamiento de los extractos de trabajo se lleva a cabo en un ultracongelador a  $-70 \pm 10$  °C, en el cual, sólo personal autorizado puede tener acceso, ya que estos ejemplares se encuentran bajo llave. Ésta actividad se lleva a cabo conforme lo establecido en el procedimiento LVIR-P-05.
- 
- **Fuentes de Variabilidad**
- 
- El desarrollo del proceso debe ser realizado en forma unidireccional para evitar la contaminación de las áreas contiguas.
- Almacenamiento de reactivos inadecuado, contaminación de reactivos, incorrecta preparación de reactivos, contaminación cruzada en áreas.
- Utilización de equipos de amplificación y reactivos para PCR en tiempo real fuera de los evaluados por el InDRE para esta técnica.
- El no seguimiento estricto de los Lineamientos establecidos para el diagnóstico.
- Caducidad de los reactivos.
- **Referencias**
- Instruction for Use of Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing), Da An Gene Co., Ltd. of SunYat-sen University. Version 1, January, 2020.