

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

PROPÓSITO

Proporcionar la metodología para realizar el diagnóstico por RT-PCR en Tiempo Real mediante el Estuche GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit en muestras de (exudado faríngeo y nasofaríngeo, lavado bronquioalveolar, aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo, lavado nasal y biopsia pulmonar) con caso probable de Enfermedad Respiratoria Aguda y/o Defunción por neumonía con sospecha de infección por SARS-CoV-2.

Realizar la confirmación de las muestras con resultado positivo a SARS-CoV-2 mediante la técnica RT-PCR Tiempo Real GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit.

Proporcionar un resultado diagnóstico oportuno para la confirmación o nulidad del probable caso de infección por SARS-CoV-2.

PRINCIPIO DEL METODO

El estuche GeneFinder™ para el diagnóstico in vitro del virus SARS-CoV-2 es fabricado por OSANG-Healthcare y distribuido a nivel mundial por la empresa ELITechGroup. Se utiliza para el análisis de RNA purificado obtenido de muestras respiratorias como líquido de lavado broncoalveolar, exudado nasofaríngeo, orofaríngeo y esputo. Los componentes son: 1. Soluciones amortiguadoras y enzimas necesarias para llevar a cabo una Retro-transcripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR); 2. Controles positivo y negativo y 3. Los iniciadores y sondas para la detección de tres genes virales: Nucleocapside “N”, Polimerasa dependiente de RNA “RdRP” y el gen de la Envoltura “E”; y un control interno “IC”, que es usado para monitorear el proceso de toma de la muestra, extracción y amplificación de la PCR.

GeneFinder™ es una prueba multiplex, es decir, se lleva a cabo en una sola reacción, ya que los cuatro genes blancos están sintetizados con diferentes marcadores fluorescentes y ha sido validado para usarse en los termocicladores Applied Biosystems® 7500 / 7500 Fast Real Time PCR Instrument System y BIO-RAD CFX96 real time PCR system.

SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

Como lo indica el Lineamiento Estandarizado para la Vigilancia Epidemiológica y por Laboratorio de Enfermedad Respiratoria Viral respecto a la toma y tipos de muestras,

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

la matriz para SARS-CoV-2 son extractos obtenidos de los siguientes tipos de muestras:

Exudado faríngeo/nasofaríngeo
Lavado bronquioalveolar
Biopsia pulmonar

TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

Las muestras se colocan en tubos de polipropileno de 16 por 125 mm o 13 por 100 mm con 2.5 mL de medio de transporte viral, los sobrenadantes se colocan en criotubos de 2 mL o en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se conservan de 4 a 8° C antes de procesarse. Posteriormente, se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los extractos se colocan en tubos tipo eppendorf de 0.6 mL o de 1.5 mL y se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su resguardo. Las muestras deberán estar etiquetadas con el número de folio e ir acompañadas del estudio de caso sospechoso de Enfermedad Respiratoria Viral o IRAG disponible en la página de la Dirección General de Epidemiología, apartado Covid-19.

4.1 Condiciones de almacenamiento

El kit debe almacenarse a $-20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$.

ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

Las especificaciones de desempeño son las reportadas por el proveedor en el inserto del estuche comercial GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit para la detección del Novel Coronavirus (COVID-19), Revisión 2, abril-2020.

La sensibilidad analítica para los tres genes virales (RdRP, E, y N) es de 10 copias/prueba.

La especificidad diagnóstica es del 100%

La repetibilidad es con un coeficiente de variación $< 5\%$.

No se tiene reportado reacción cruzada con otros patógenos como Influenza A (H1N1/09), Influenza A H3N2, Influenza A H5N1, Influenza B, RSV A, RSV B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, parainfluenza 4, adenovirus, enterovirus, rinovirus, bocavirus humano, hMPV (metapneumovirus humano), virus del sarampión, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella, Bordetella pertussis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae,

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

Streptococcus pyogenes, Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans, Pneumocystis jirovecii, coronavirus (HKU1, OC43, NL63, 229E), coronavirus SARS ni coronavirus MERS.

EQUIPO

Ver ANEXO 1

MATERIALES

- Bata blanca.
- Zapatos cerrados con suela antiderrapante.
- Bata desechable para cirujano de manga larga estéril.
- Cubrebocas desechables.
- Guantes de nitrilo.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 0.1 - 10 μ L, 40 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.512
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 20 μ L, 53 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.539.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 100 μ L, 53 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.547.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 2 - 200 μ L, 55 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.555.
- Puntas con filtro dual, estéril y libre de pirógenos, marca Eppendorf, de 50 - 1000 μ L, 76 mm, rack de 96 puntas. No. Pedido: 0030 077.571.
- Puntas con filtro, pre-esterilizadas, libres de RNAsa, DNAsa, DNA y Pirógenos, marca Rainin, de 200 μ L, rack de 96 puntas, Catálogo: RT-200F.
- Puntas con filtro, pre-esterilizadas, marca Bioclean Rainin, de 1000 μ L, rack de 96 puntas, Catálogo: RT-1000F.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 μ L.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 600 μ L.
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 200 μ L.
- Gradillas de plástico para tubos de 1500 μ L.
- Papel aluminio.
- Placas de reacción MicroAmp Fast Optical de 96 pozos con código de barras, de 0.1 mL, marca Applied Biosystems, REF: 4346906.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

- Tiras tubos de reacción Fast (tiras de 8 tubos), libres de DNA / RNA, de 0.1 mL marca Applied Biosystems, REF: 4358293.
- Tapas ópticas MicroAmp, tira de 8 tapas para placas de 96 pozos MicroAmp Fast Applied Biosystems, REF: 4323032.
- Caja de almacenamiento para criotubos para temperaturas de hasta -100 °C.
- Bloque de enfriamiento (IsoTherm-System), para microtubos de polipropileno con capacidad de 0.5 µL, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3880 001.160 (0 °C), 3880 001.178 (-21 °C).
- Bloque de enfriamiento (IsoTherm-System), para microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 / 2000 µL, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3880 001.166 (0 °C), 3880 001.174 (-21 °C).
- Bloque de enfriamiento (PCR-Cooler) para placas y tiras de tubos, marca Eppendorf, No. De Pedido: 3881 000.023 (Rosa), 3881 000.031 (Azul), 3881 000.015 (Kit de inicio 1 Rosa, 1 Azul).
- Bolsas de polipropileno.
- Contenedor para puntas desechables.
- Gasa estéril.
- Marcadores indelebles.

REACTIVOS Y MATERIALES BIOLOGICOS

Ver ANEXO 2.

PROCEDIMIENTO

9.1 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 todos los componentes dentro del estuche comercial, 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.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

| Reactivo | Volumen (1 reacción) |
|--------------------------------|----------------------|
| COVID-19 Plus Reaction Mixture | 10 µl |
| COVID-19 Plus Probe Mixture | 5 µl |
| Volumen total | 15 µl |

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

- Mezclar suavemente por pipeteo o vortex y centrifugar brevemente para bajar las gotas que puedan quedar en la pared y tapa del tubo.
- Colocar 15 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 o el Control Negativo que contiene el estuche comercial (COVID-19 Plus Negative Control), 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.

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 20 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).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-----|
| RdRP/E/N/IC | A | NTC | M8 | | | | | | | | | | M88 |
| RdRP/E/N/IC | B | M1 | M9 | | | | | | | | | | M89 |
| RdRP/E/N/IC | C | M2 | M10 | | | | | | | | | | M90 |
| RdRP/E/N/IC | D | M3 | M11 | | | | | | | | | | M91 |
| RdRP/E/N/IC | E | M4 | M12 | | | | | | | | | | M92 |
| RdRP/E/N/IC | F | M5 | M13 | | | | | | | | | | M93 |
| RdRP/E/N/IC | G | M6 | M14 | | | | | | | | | | M94 |
| RdRP/E/N/IC | H | M7 | M15 | | | | | | | | | | PTC |

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 positivo, proporcionado en el kit comercial (COVID-19 Plus Positive Control), para detectar cada gen viral, en el pozo correspondiente. (Figura 1)

El control positivo no necesariamente debe colocarse en el pozo de la columna 12, ya que, si son menos muestras las que se procesarán en la placa, éste puede 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.

9.3 Procedimiento para realizar corridas de qRT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en el equipo AB 7500 Fast.

Encender la Laptop y el equipo AB 7500 Fast colocando la clave y contraseña correspondiente.

Abrir el programa 7500 Fast SDS Software, haciendo doble clic sobre el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora (Figura 2).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

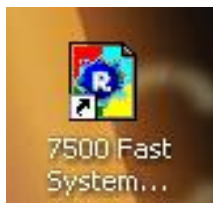


Figura 2.- Reconocimiento del acceso directo al programa

El software abrirá exitosamente presentando una ventana con el nombre “Quick start up document” (inicio rápido de documento, Figura 3).

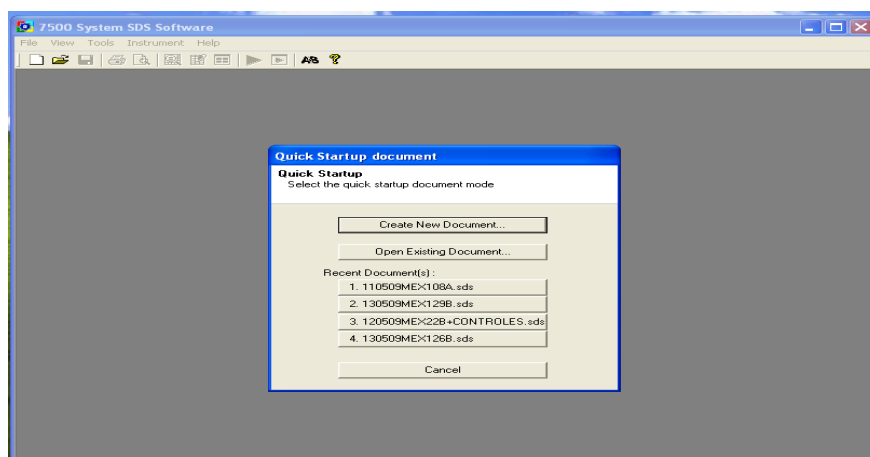


Figura 3.- Ventana de inicio del programa.

En la ventana “Quick start up document” (inicio rápido de documento) hacer clic en la opción Create New Document (crear nuevo documento). Posteriormente abajo de la barra de menús en la parte superior derecha se encuentra el ícono de documento en blanco se hace clic en este ícono y aparece la ventana con el nombre de “New document wizard” (ventana de nuevo documento), como se observa en la Figura 4.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

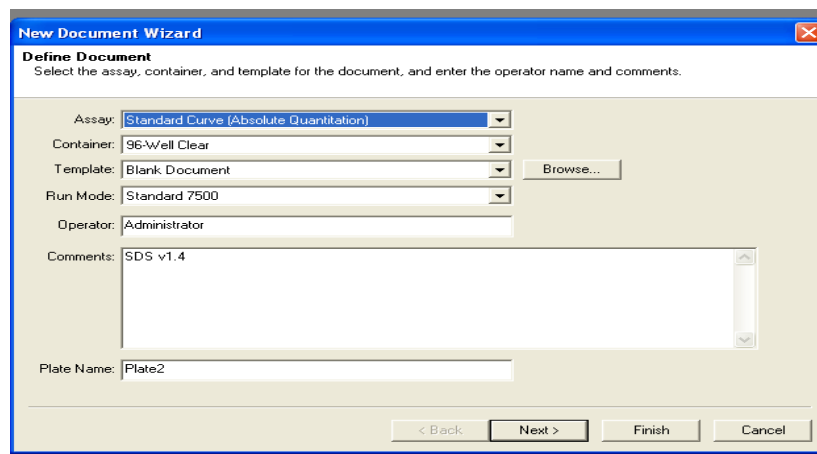


Figura 4.- Ventana para crear un nuevo documento.

En esta nueva ventana se inicia la programación de la corrida, para lo cual en el parámetro de Template (molde o templado), del lado derecho de esta opción encontraremos el botón de Browse (buscar), se da clic para buscar la plantilla previamente programada y posteriormente se selecciona haciendo clic en el botón de Open (abrir) que se encuentra en la parte inferior derecha de la última ventana que se abrió.

En la ventana de “**New document wizard**”, cambia la opción de Template (plantilla), por la del nombre de la plantilla seleccionada, en la opción de Plate name (nombre de la placa), se coloca el nombre de la corrida por programar, se sugiere que sea de la siguiente forma: FECHA (día-mes-año) espacio NOMBRE DE LA CORRIDA espacio NÚMERO DE LA CORRIDA.

Posteriormente de haber verificado los pasos anteriores se da clic en el botón de Finish (finalizar) que se encuentra en la parte inferior derecha de la ventana.

En la pantalla aparece la plantilla elegida con los marcadores por detectar, como se observa en la figura 5 en esta plantilla se programan las claves de los templados o extractos de RNA por analizar.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

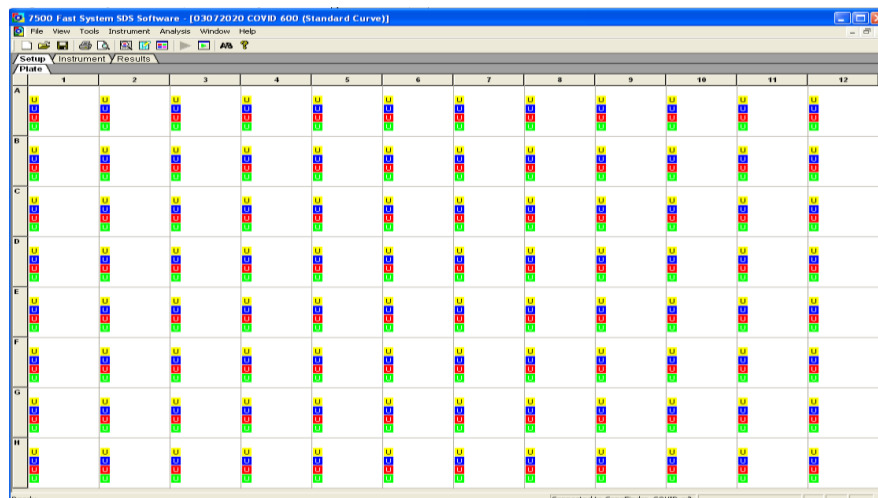


Figura 5.- Diseño de la plantilla para el diagnóstico de SARS- CoV 2

La forma de programar las muestras (figura 5), es abrir la pestaña SETUP (organización) y seleccionar las casillas de la columna 1 para el control negativo, las cuales son nombradas como NTC. Ingresar el número de identificación de los extractos de acuerdo a la hoja de registro. Ingresar el nombre de los controles positivos en la columna 12 o donde corresponda.

Una vez programadas las muestras y verificados los marcadores a detectar, se da clic en la pestaña de Instrument (instrumento) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana por debajo de la barra de menú.

En esta parte de la programación se verifican que las condiciones de termociclado, ajustes de los canales de fluorescencia, volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida, correspondan a las descritas en el protocolo establecido, observar en la tabla 2 y tabla 3.

| Etapas | Repeticiones | Temperatura | Tiempo | Colecta de datos |
|--------|--------------|-------------|--------|------------------|
| 1 | 1 | 50°C | 20 min | |
| 2 | 1 | 95°C | 5 min | |
| 3 | 45 | 95°C | 15 seg | |
| | | 58°C | 60 seg | |

Tabla 2. Programación de las condiciones de termociclado para la amplificación.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

| Detector | Fluorescencia (Dye) | Quencher dye |
|--------------------------|---------------------|--------------|
| Gen RdRP | FAM | None |
| Gen E | Rojo Texas | None |
| Gen N | JOE | None |
| Control Interno (RnasaP) | Cy5 | None |

Tabla 3. Ajustes de los canales de fluorescencia.

CONTROL DE CALIDAD

El control negativo NTC no debe presentar ninguna curva de amplificación en todos los canales de detección. (Figura 6)

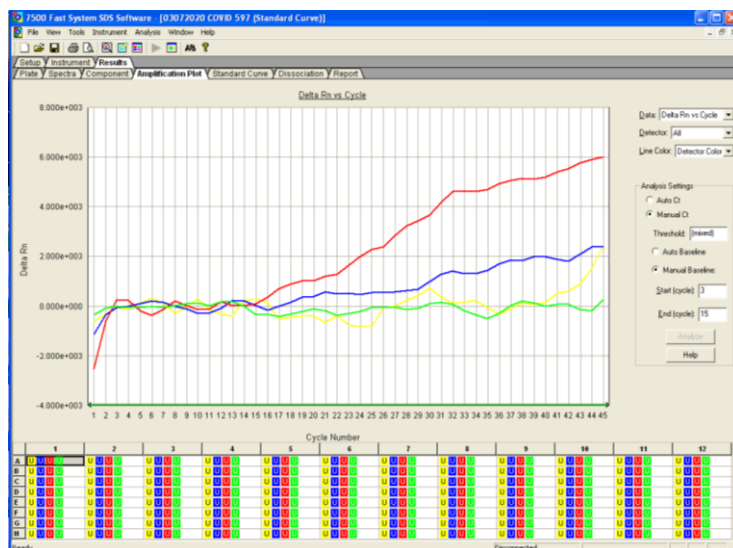


Figura 6.- Gráfico del Control Negativo.

El control positivo PTC; debe presentar curvas de amplificación para los canales que detectan los genes virales (RdRP, E y N) y para el Control Endógeno (IC) (Figura 7).

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

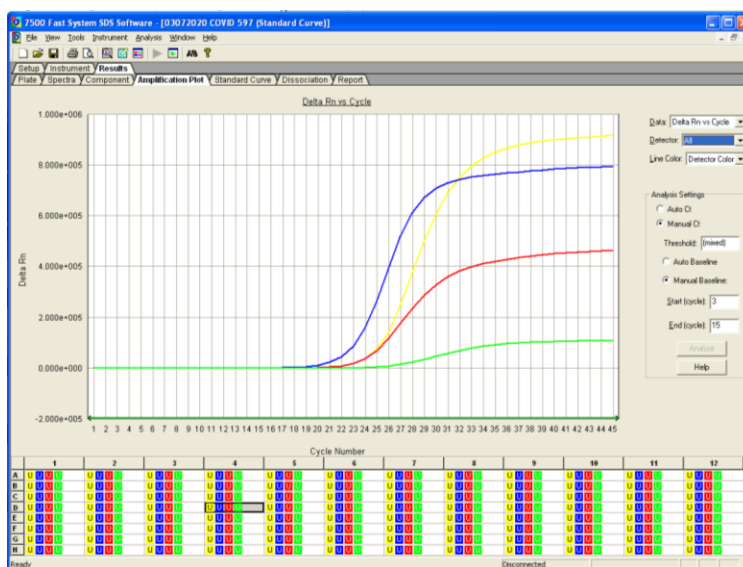


Figura 7.- Amplificación del Control Positivo.

Los controles negativos y positivos deben ser probados en cada experimento. Estos requerimientos deben cumplirse en cada una de las corridas con las muestras, de otra manera, el experimento debe considerarse invalido y deberá correrse de nuevo.

INTERFERENCIAS

Las señales que exceden el límite de fluorescencia normal, pueden indicar la presencia de contaminantes fluorescentes dentro de la placa o del bloque de muestra. Los contaminantes más comunes incluyen residuos de tinta de los marcadores indelebles, talco de los guantes desechables y polvo (Applied Biosystems, 2009).

Hisopos de alginato o algodón.

Toma incorrecta de las muestras (toma de muestra descrita en el Lineamiento Estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de enfermedad viral respiratoria).

Transporte inadecuado de la muestra al no mantenerse la cadena fría.

Extractos de ácido nucleicos y reactivos que no mantengan la cadena fría.

Utilización de equipos y reactivos fuera de los recomendados en el presente procedimiento.

INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA

No aplica

INTERVALO REPORTABLE

Positivo o negativo.

VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

Obtener muestras con resultado inconcluso o dudoso de SARS-CoV-2. Este tipo de muestras puede indicar la presencia de nuevas variantes que no pueden ser detectadas mediante esta técnica. Por lo que al salir este tipo de muestras se envían al Laboratorio de Genoma de Patógenos para realizarles secuenciación y descartar alguna mutación de acuerdo al BIMO-P-02.

INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

Para realizar la interpretación de resultados se deben de ajustar en el software los siguientes valores:

El valor de threshold para los genes virales E y RdRP debe ser ajustado en 30,000 y para el Gen N y el control interno en 10,000.

La línea basal debe ser establecida entre los ciclos 3 y 15 al final para los 4 genes blanco.

El valor de corte es de un Ct ≤ 40 para N, E, y RdRP y ≤ 38 para el IC.

Para emitir un resultado positivo a SARS-CoV-2, es suficiente que presente cinética de amplificación en los genes RdRP o N, si solo hay amplificación para el gen E, deberá de repetirse la muestra y si el resultado es consistente, debe emitirse como positivo a Beta coronavirus. En resultados positivos a COVID19 no es necesaria la amplificación del IC; para resultados negativos debe estar presente el IC; un resultado invalido no presenta cinética en ninguno de los 4 marcadores.

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.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

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 |
|-------------|---------------------|
| Gen RdRP | Amarillo |
| Gen E | Azul |
| Gen N | Rojo |
| RnasaP (IC) | Verde fosforescente |

Si en la corrida de las muestras no existe una curva de amplificación para los genes virales o estas tienen un valor de $C_t > 40$, además de presentar una curva de amplificación para el control interno (IC), la muestra se considera Negativa (Figura 8).

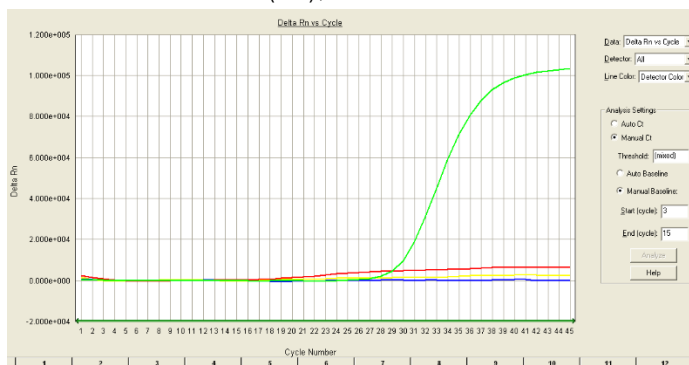
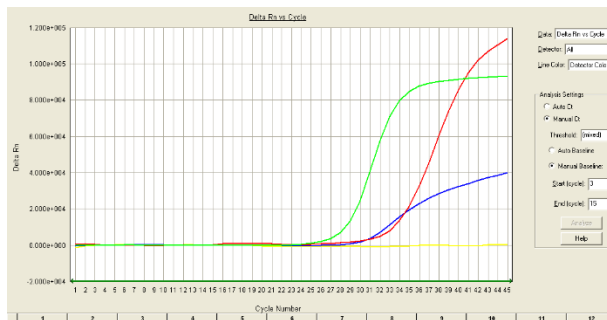
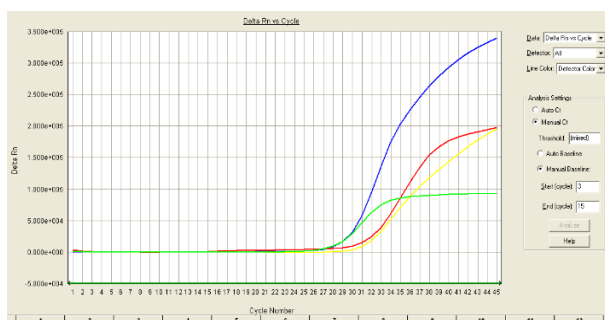


Figura 8.- Ejemplo de una muestra Negativa.

Si la muestra presenta una curva de amplificación en los tres canales de detección de los genes virales o solamente en alguno de ellos, con valores de $C_t \leq 40$, se considera Positiva. (Figura 9). Cuando existe amplificación en uno o los tres canales de los marcadores virales, el resultado del control interno puede ser negativo debido a la competición en el sistema.



LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS

F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

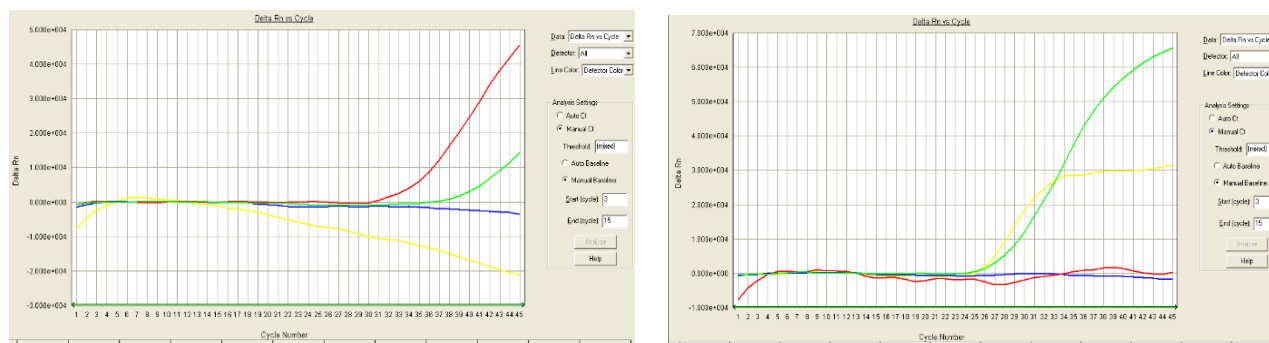


Figura 9.- Amplificación de muestras Positivas.

Cuando en el control interno y en los canales de detección para los genes virales no existe amplificación, 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 en algún marcador viral, la muestra deberá ser reprocesada. (Figura 10)

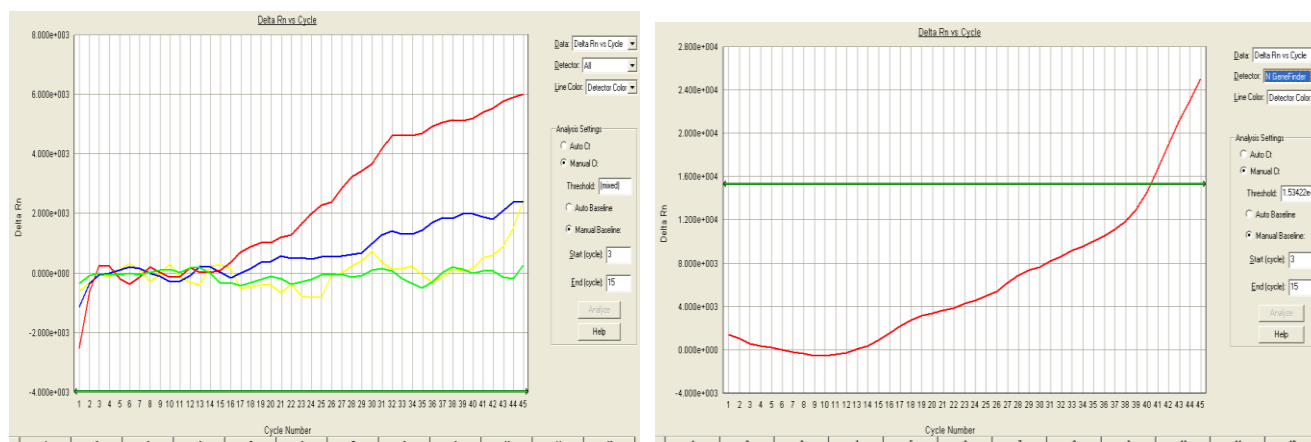


Figura 10.- Ejemplo de muestra para repetición.

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.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

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 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 CGRB-P-03.

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 CGRB-P-02 para la formación de aerosoles.

Mantener los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos cuanto le sea posible y en red fría.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

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 GEAM-P-03.

El almacenamiento de los extractos de trabajo se lleva a cabo en un ultracongelador a -70 ± 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.

El personal debe conocer las HDSQ y HDSB de los agentes químicos y biológicos que manejan, así como el Bio-Ram específico si aplica.

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.

INFORMACIÓN DOCUMENTADA DE REFERENCIA

- Lineamiento Estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de la enfermedad respiratoria viral, DGE-InDRE vigente.
- Instruction for Use of GeneFinder™ covid-19 Plus RealAmp Kit, OSANG Healthcare, April-2020 (rev. 2).
- Estudio Epidemiológico de caso sospechoso de enfermedad respiratoria viral. (DGE-InDRE).
- Introducción al PCR en tiempo real, Sistema 7300, 7500 y 7500 Fast, Applied Biosystems 2009.

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

- NMX-EC-15189-IMNC-2015 Laboratorios Clínicos-Requisitos de la calidad y la competencia (ISO 15189:2012).
- NMX-CC-9001- IMNC-2015 Sistemas de Gestión de calidad- Requisitos (ISO 9001:2015).
- UNE-CWA 15793 Gestión del riesgo biológico en el laboratorio.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Norma Oficial Mexicana. Publicada en el diario oficial el 27/03/2012.
- PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-007-SSA3-2017, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 31-01-2018.
- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. D.O.F. 19-II-2013.

ANEXOS

ANEXO 1: EQUIPOS

| Equipo | | Marca | Modelo |
|---|---|-----------------------|--------------------------------|
| Termociclador AB | 1 | APPLIED BIOSYSTEMS | 7500 Fast Real-Time PCR System |
| | 2 | | |
| | 3 | | |
| Cabinas de bioseguridad II | | LABCONCO | 3970302 |
| | | | 3970302 |
| Estación de trabajo | | PLAS LABS | 825-UVC |
| Micropipetas automáticas de intervalo 0.5 a 10 µL | | EPPENDORF | Research |
| | | BIOPET | Bioselec |
| Micropipetas automáticas de intervalo 0.2 a 2 µL | | SOCOREX | Acura 826 |
| Micropipetas automáticas de intervalo 10 a 100 µL | | BIOPET | Bioselec |
| | | EPPENDORF | Research |

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

| | | |
|---|------------------------------|------------------------------|
| Micropipetas automáticas de intervalo 20 a 200 µL | BIOHIT | Proline |
| | EPPENDORF | Research Plus |
| Micropipetas automáticas de intervalo 100 a 1000 µL | EPPENDORF | Reference |
| Dosificador Combipip (Repetidor) | EPPENDORF | Eppendorf Multipette Xstream |
| Dosificador Combipip (Repetidor) | EPPENDORF | Eppendorf Multipette plus |
| Dosificador Combipip (Repetidor) | EPPENDORF | Eppendorf Multipette plus |
| Centrífuga (minispin) | EPPENDORF | Minispin |
| Agitador vortex | DAIGGER VORTEX GENIE 2 | Scientific G-560 |
| | SCIENIFC INDUSTRIES | G560 |
| Ultracongelador | THERMO SCIENTIFIC | RDE50086FA |
| Congelador | PANASONIC | MDF-U5312-PA |
| Refrigerador | PANASONIC | SR-L6IIIW-PA |
| Congelador | PANASONIC | SF-L6IIIW-PA |
| Refrigerador y Congelador | SANYO | MPR-715F |
| Microcentrífuga | THERMO | Espresso 11210800 |
| Microcentrífuga | THERMO | Espresso 11210800 |
| Microcentrífuga | THERMO | Espresso 11210800 |
| Refrigerador y Congelador | SANYO | MPR-715F |

ANEXO 2: REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE VIRUS RESPIRATORIOS
F. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Gene Finder

RNAse away No. De catálogo 10328-011, Marca Invitrogen.

Etanol 70%

Hipoclorito de sodio 10%

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 ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ , dNTPs. |
| | NC (ORF 1ab/N) PCR reaction solution B | 2x200 µl | Hot Start Taq DNA polimerasa, c-MMLV retrotranscriptasa, Rnasin, etc. |