



Kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™



Biotecnología INTRON
(# 701 - 704, Jling-Ang Indonesia V,
Sangdaewon-dong)
137, Saemhagui-ro, Jungwon-gu,
Sungnam-si, Gyeong-do, Corea

Antecedentes de desarrollo

Hay cuatro genes en la familia Coronavirus. Son conocidos como alfa, beta, gama y delta. Los virus alfa y beta pueden ocasionar enfermedades tanto en humanos como en animales, mientras que otros, tales como coronavirus gama y delta, sólo infectan animales. Las enfermedades informadas han oscilado desde síntomas de resfío suave por Coronavirus 229E, NL63, OC43, o HKU1 hasta enfermedades severas (ej. neumonía) por MERS-CoV y SARS-CoV. SARS-CoV-2 es un coronavirus nuevo que no ha sido identificado previamente. El coronavirus nuevo (SARS-CoV-2) pertenece a beta y es uno de los nuevos virus corona infecciosos que infecta el tiempo humano como un patógeno de neumonía masiva que ocurrieron en Wuhan, Hubei, China en diciembre de 2019. Es muy importante diagnosticar rápidamente una infección, porque no hay vacunas o antivirales aprobados con propósitos terapéuticos o profilácticos.

En consecuencia, para aumentar la velocidad, exactitud y conveniencia del diagnóstico molecular para el nuevo coronavirus, fue diseñado un producto capaz de detectar simultáneamente genes RdRP, N y E específicos del nuevo coronavirus.

Principio

- El kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™ puede detectar el nuevo coronavirus usando método sonda de RT-PCR tiempo real, a través de la reacción de la sonda fluorescente y cebador específico en la muestra.
- El kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™ puede detectar gen E y RdRP, marcadores para detectar los nuevos coronavirus. También son adoptados y diseñados para detección simultánea el gen N sugerido por el US CDC y gen RNaseP, que pueden confirmar la validez de todas las reacciones de prueba.

Ingredientes de los componentes

Contenidos	Ingredientes
Mezcla 2X RT-PCR	< 0.01% polimerasaTaq DNA arranque en caliente < 0.01% transcriptasa inversa, < 0.01% dNTPs
Solución de detección RdRP/E	< 0.005% cebador directo RdRP, < 0.005% cebador inverso RdRP < 0.005% sonda RdRP < 0.005% cebador directo E, < 0.005% cebador inverso E < 0.005% sonda E
Solución de detección N/RNaseP	< 0.005% cebador directo N, < 0.005% cebador inverso N < 0.005% sonda N < 0.005% cebador directo RNaseP < 0.005% cebador inverso RNaseP < 0.005% sonda RNaseP
Control positivo	< 0.001% plásmido no infeccioso DNA(microbiano) conteniendo secuencias de unión de genes RdRP, E, N, RNaseP parcialmente recombinadas.
Agua residual DNase/RNase	Control sin plantilla, 100% agua residual DNase/RNase

Descripción

- Mezcla 2X RT-PCR: Líquido transparente incoloro en microtubo incoloro.
- Solución de detección: líquido transparente e incoloro (coloreado rosa claro) en tubo ámbar coloreado marrón claro.
- Control positivo: líquido transparente e incoloro en microtubo incoloro.
- Agua residual DNase/RNase: líquido transparente e incoloro en microtubo incoloro.

Método de preservación y período de uso

No	Componente	Método de preservación	Período de uso
1	Mezcla 2X RT-PCR		
2	Solución de detección RdRP/E	Almacenaje congelado, debajo de -20°C	12 meses desde la fecha de fabricación
3	Solución de detección N/RNaseP		
4	Control positivo		
5	Agua residual DNase/RNase		

Propósito

Colección simultánea del tracto respiratorio superior de muestra bucofaringea (hisopo bucofaringeo, OS) e hisopo nasofaringeo (NS), fluido de lavado bronco alveolar (BAL) o esputo en el tracto respiratorio inferior. Reactivos de testeo in vitro que ayudan a detectar infección del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) detectando cualitativamente los genes RdRP, E y N del nuevo coronavirus (2019-nCoV) en la muestra.
*Las muestras deben limitarse al tipo de muestra especificada en los "Procedimientos de infección de Corona virus".

Uso previsto

El kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™ es un dispositivo médico de diagnóstico in vitro basado en método PCR de transcripción inversa en tiempo real prevista para la detección cualitativa de ácido nucleico del 2019-nCoV en hisopos bucofaringeos y nasofaringeos y esputos de individuos con signos y síntomas de infección que están sospechados de COVID-19.

Precauciones de uso

- Este producto no debe ser objeto de más de 4 ciclos de congelamiento/descongelamiento.
- Este producto debe ser usado para test in vitro únicamente y debe ser usado por especialistas (incluyendo personal médico).
- Todos los procedimientos deben ser realizados en un banco limpio y se recomienda que el banco limpio sea limpiado con alcohol luego del uso.
- El experimentador debe vestir guantes, bata de laboratorio y máscara, y siempre tener cuidado.
- El espécimen tiene el riesgo de ocasionar infección y enfermedad desconocida, por lo tanto debe ser cuidadoso al manipular, con el objeto de evitar infección por parte de usuarios y contactos indirectos.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes de este producto.

- Manipule cuidadosamente los reactivos y muestras de este producto para evitar rociado al abrir la tapa del contenedor y para evitar que reactivos y muestras se adhieran a su boca por uso de una máscara.
- Mientras manipule este producto y especímenes, no coloque instrumentos que puedan lastimar al usuario, tales como agujas o cuchillos, y evite accidentes no usando tales instrumentos.
- Si el ácido nucleico objetivo está en altas concentraciones o hay inhibidores presentes, el IPC puede no ser amplificado. Diluya el ácido nucleico con agua estéril y realice un nuevo test.
- Si quiere eliminar especímenes sospechosos, materiales de prueba contaminados e instrumentos, inactívelos con autoclave y elimínelos. Si quiere desinfectar, trátelos por 10 - 30 minutos usando solución de 0,5% hipoclorito de sodio y 70% etanol.
- Basado en los resultados del estudio acelerado de estabilidad de vida útil, la vida útil de la prueba debe ser fijada en 12 meses.

Instrumentos

- Instrumento PCR tiempo real
- Pipetas y puntas de filtro desechables
- Guantes de látex desechables
- Kit de extracción de ADN/ARN del virus
- Centrífugos de tubo PCR de mesa
- Mezclador vórtice

Procedimiento

- Colección y envío del espécimen
 - La colección, almacenaje y transporte inadecuados o incorrectos son propensos a mostrar resultados de test falsos. Es altamente recomendado adiestrar en la colección del espécimen debido a la importancia de la calidad del espécimen.
- Colectando el espécimen: Refiera a los lineamientos internos para colectar, manipular y testear especímenes clínicos de pacientes bajo investigación (PUIs) para el Coronavirus nuevo 2019 (2019-nCoV).
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
Cumpla las instrucciones del fabricante del dispositivo de colección de espécimen para métodos de colección correctos. Los especímenes de hisopos deben ser colectados únicamente usando hisopos con una punta sintética y un eje de plástico o aluminio. Los hisopos de alginato de calcio son inaceptables y los hisopos de algodón con ejes de madera no son recomendados. Coloque inmediatamente los hisopos en tubos estériles conteniendo 2-3 ml de medio de transporte viral.
- Envío: Los especímenes deben ser embalados y transportados de acuerdo a la edición actual de la Norma de Mercancías Peligrosas de la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA). Almacene especímenes de 2-8° C y envíe de noche al laboratorio en compresa de hielo. Si un espécimen está congelado a -70° C envíe de noche al laboratorio en hielo seco. Información detallada y útil adicional sobre embalaje, envío y transporte de especímenes puede encontrarse en los Lineamientos Interinos de Bioseguridad de Laboratorio para Manipulación y Procesamiento de Especímenes Asociados con la Enfermedad del Coronavirus 2019 (COVID-19).
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

Servicio técnico y al cliente

shop.intronbio.com

Tel : +92-505-550-5800

Fax : +92-505-550-5660

Correo electrónico: intronbio@intronbio.com

Guía rápida

Belief & Relief, kit MDx de diagnostics IIF

Procedimiento (continuado)

2. Preparación antes del test

1) El kit de extracción/detección ARN viral utiliza ARN extraído de muestras nasofaríngeas u bucofaríngeas, lavado bronco alveolar o esputo para detección PCR. Este kit no incluye reactivos para extracción de ARN viral. Los reactivos para extracción ARN tienen nombres y características diferentes para cada fabricante, los reactivos deben ser utilizados cumpliendo las instrucciones del fabricante. Los resultados experimentales pueden ser variados dependiendo de los reactivos y métodos de extracción. (Ex. kit de extracción ARN/AND Patho Gene-spin (No. Cat. 17154, biotecnología INTRON), Mini kit ARN Viral QIAamp (No. Cat. 52904, QIAGEN))

2) Instrumento recomendado

Modelo	Fabricante
Sistema de detección PCR tiempo real CFX96™	Bio-Rad
Sistema PCR tiempo real rápido ABI 7500	Thermo

3. Preparación de la reacción rRT-PCR

1) Prepare la mezcla PCR de acuerdo a la siguiente tabla

Una cantidad adecuada de tubos significa una combinación de dos tubos en el número de muestras, que incluye un control positivo y un control negativo. En caso de PCR tiempo real, la señal fluorescente es pasada a través de la tapa transparente del tubo PCR. Asegure no etiquetar la tapa y poder identificarla de un modo separado.

Contenidos	Muestra		Positiva		NTC	
	RdRP/E	N/RNaseP	RdRP/E	N/RNaseP	RdRP/E	N/RNaseP
Mezcla 2X RT-PCR	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Sol. detección RdRP/E	5 µl	-	5 µl	-	5 µl	-
Sol. detección N/RNaseP	-	5 µl	-	5 µl	-	5 µl
Muestra	5 µl	5 µl	-	-	-	-
Control positivo	-	-	5 µl	5 µl	-	-
Agua residual DNase/RNase	-	-	-	-	5 µl	5 µl
Volumen total	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

2) Agregue 5 µl de agua destilada (NTC), muestra gen (ARN) y control positivo a cada premezcla preparada y cierre la tapa del tubo.

- Controles negativos usan 5 µl de agua residual DNase / RNase en lugar de muestras genéticas y controles positivos usan 5 µl de muestras AND control positivo incluidas en el producto.
- El PCR tiempo real (o RT-PCR tiempo real) es muy sensible, por lo tanto la contaminación puede ser fácilmente identificada en controles negativos. Por lo tanto, recomendamos que preste atención a la contaminación tal como el uso de una punta de filtro y una pipeta para control positivo.

3) Mezcle la solución de reacción uniformemente y gire hacia abajo para remover la solución de reacción de la pared del tubo y burbujas de aire del fondo.

- El PCR de tiempo real no etiqueta los tubos, así que tenga cuidado de no mezclar los tubos en este proceso.

4) Proceda con PCR de acuerdo a la configuración del programa como sigue.

Paso	Ciclo	Temp	Tiempo	Configuración de canal	
Transcripción inversa y activación Taq	1	50 °C	30 min.	Gen RdRP y N	FAM
		95 °C	10 min.	Gen E y RNase P (IPC)	HEX(JOE)
		94 °C	15 seg.		
Detección de señal y PCR	40	60 °C	60 seg.	= sección detección de señal	

4. Análisis del resultado

- 1) Confirme nuevamente la designación de fluorocromo
- 2) Configure umbral de la siguiente tabla.

[Configuración de parámetro]					
Instrumentos	Canal	Configuración de partida		Umbral	
		RdRP/E	N / RNaseP	RdRP/E	N / RNaseP
CFX-96	FAM	3-15	3-15	200	200
	HEX	3-15	3-15	100	200
ABI 7500	FAM	3-15	3-15	20,000	20,000
	JOE	3-15	3-15	10,000	20,000

3) Verifique la curva de amplificación y valor Ct.

4) Determine la presencia de cada genes basado en el valor Ct de acuerdo a lo siguiente. Valor Ct ≤ 35 : positivo, valor Ct > 35 o N/A : negativo* Si el valor Ct de RNase P es " > 35", se requieren nueva extracción y testeo.* N/A : No analizado.

5. Precauciones para resultado del análisis

Este kit no puede excluir completamente la posibilidad de resultados falso positivo y falso negativo debido a varios factores. El diagnóstico final no debe ser solamente determinado por el kit, y debe ser combinado con observación clínica, historial del paciente e información epidemiológica.

6. Interpretación del resultado

Caso	Control positivo	Control negativo	Prueba 1		Prueba 2		Interpretación
			RdRP	E	N	RNaseP	
1	+	-	+	+	+	+/-	COVID-19 detectado
2	+	-	+	+	-	+/-	
3	+	-	-	+	+	+/-	
4	+	-	+	-	+	+/-	
5	+	-	+	-	-	+/-	
6	+	-	-	+	+	+/-	
7	+	-	-	+	-	+/-	Beta coronavirus positivo, pero COVID-19 no detectado
8	+	-	-	-	-	+/-	Negativo
9	-	-	-	-	-	-	Inválido (testear nuevamente)

- Recomendado hacer nuevo testeo incrementando la concentración de muestra.
- Recomendado proceder con secuenciación.

• RNaseP en la prueba 2 es un control interno y la amplificación es confirmada si el ARN extraído de las muestras humanas es adecuado, RNaseP negativo cuando otros resultados positivos no afectan la interpretación de los resultados, pero si ambos negativos y RNaseP también son negativos, la extracción arroja un rendimiento bajo o sustancias inhibitoras de reacción. Puede sospechar y recomendar un nuevo testeo.

7. Control de calidad

1) Dado que el juicio del resultado depende de la máquina PCR utilizada, se recomienda referir al manual del dispositivo. Para criterio en la interpretación de resultados, por favor refiera a 'Configuración de parámetro'.

2) Este producto contiene control positivo, Por lo tanto, la efectividad de este producto puede ser juzgada como el resultado normal al reaccionar control positivo y control negativo respectivamente. Puede referir a los valores Ct en la tabla debajo cuando evalúe la validez.

Contenidos	FAM	HEX
Control positivo ; PC	20 - 25	20 - 25
Control negativo (Sin control de plantilla ; NTC)	-	-

3) Si se obtienen resultados anormales dentro de la vida útil y ambiente de almacenaje correcto del producto, el fabricante puede requerir un reemplazo.

Rendimiento

Criterio	Resultado
Especificidad analítica	31 muestras AND/ARN fueron testeadas en el kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™ para evaluar la posibilidad de reactividad cruzada. 31 muestras AND/ARN que no tenían problemas con el objetivo de detección del kit fueron negativas. * Especificidad : 100%
Sensibilidad analítica	Diluciones serie (1000, 100 copias/test) de COVID-19 ARN (3 lotes, 24 veces de repetición de test cada uno) fueron testeadas. * Sensibilidad analítica : RdRP : 100 copias/test, N : 10 copias/test, E : 100 copias/test.
Repetibilidad	Repetibilidad fue confirmada con sustancias normales idénticas en diferentes condiciones; diferente lugar, momento y persona para testeo de 3 lotes. El criterio de repetibilidad fue CV < 1% de valor Ct.
Seguridad congelamiento/deshielo	La seguridad de congelamiento/deshielo del kit RT-PCR tiempo real COVID-19 LiliF™ fue confirmada por 8 veces de repetición de test de congelamiento/descongelamiento El criterio de seguridad fue CV < 5% de valor Ct.

Contenidos del kit

No	Contenidos	50 tests/kit
1	Mezcla 2X RT-PCR	1120 µl x 1 tubo
2	Solución de detección RdRP/E	280 µl x 1 tubo
3	Solución de detección N/RNaseP	280 µl x 1 tubo
4	Control positivo	450 µl, 1 tubo
5	Agua residual DNase/RNase (Control negativo)	1 ml x 1 tubo

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

