

**NOMBRE DEL PRODUCTO:**

Kit de RT-qPCR para el virus SARS-CoV-2

APLICACIONES Y USO:

El kit de RT-qPCR para el virus SARS-CoV-2 es utilizado para la determinación de la carga viral de SARS-CoV-2 a partir de muestras clínicas de origen respiratorio.

COMPONENTES:

- Φ Estándar 1 x 10⁸ copias/mL, STD8
- Φ Estándar 1 x 10⁷ copias/mL, STD7
- Φ Estándar 1 x 10⁶ copias/mL, STD6
- Φ Estándar 1 x 10⁵ copias/mL, STD5
- Φ Estándar 1 x 10⁴ copias/mL, STD4
- Φ Estándar 1 x 10³ copias/mL, STD3
- Φ Mezcla Primers/Sonda
- Φ Agua libre de nucleasas

CONTENIDO DEL KIT

El kit de RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 contiene los siguientes componentes:

	Nombre	Cantidad
Caja #1 6 estándares del gen de la nucleocápside (N) de SARS-CoV-2	STD8 (1 x 10 ⁸ copias/mL)	500 µL
	STD7 (1 x 10 ⁷ copias/mL)	500 µL
	STD6 (1 x 10 ⁶ copias/mL)	500 µL
	STD5 (1 x 10 ⁵ copias/mL)	500 µL
	STD4 (1 x 10 ⁴ copias/mL)	500 µL
	STD3 (1 x 10 ³ copias/mL)	500 µL
Caja #2	Mezcla primer/sonda Taqman (Mezcla de primer y sonda para detectar el marcador CDC-N1)	1,5 mL
	Agua libre de nucleasas (PHI0030)	1,5 mL

MATERIALES ADICIONALES NO SUMINISTRADOS:

EQUIPOS	MATERIALES AUXILIARES
Cabinas de flujo laminar	Kit One-Step RT-PCR para sondas Taqman**
Vórtex y microcentrifuga (spin)	Tubos 0,1 mL y 0,2 mL
Congelador -20°C	Micropipetas de 1000 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL
Unidad de enfriamiento (cooler) ó hielo	Puntas para micropipetas de 1000 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL
Sistema de PCR en tiempo real*	Guantes desechables

*El protocolo ha sido probado con los siguientes equipos: Applied Biosystems AB7500 y Step One; QiaGen Rotor Gene Q, Bio Rad CFX96.

**Este protocolo ha sido probado con los siguientes kits: SMOBIO ExcelRTTM One-Step RT-qPCR Kit, Thermofisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Máster Mix, CG, Quantabio qScriptTM XLT One-Step RT-qPCR ToughMix o UltraFlex 1-Step ToughMix, Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System

Nota: Se recomienda realizar control de calidad de la extracción de ARN, amplificando un gen constitutivo (housekeeping) humano como la RNAase P.

METODOLOGÍA:

a) Principio del método. La RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction), es una técnica molecular de amplificación de ácidos nucleicos y constituye la etapa de análisis para algunas pruebas genéticas, la RT-qPCR involucra una serie de pasos básicos, que son independientes del origen de la muestra: (i) preparar la mezcla de reactivos o mezcla maestra, (ii) alícuotar la mezcla maestra en los tubos de reacción, (iii) preparar la curva estándar con el control positivo, (iv) adicionar el ARN (muestra o control positivo), (v) programar los ciclos de amplificación en el termociclador e (vi) interpretar los resultados.

La carga viral es una medida del número de partículas virales presentes en la muestra analizada. La concentración viral inicial, así como la cantidad del virus que tiene un individuo en un momento dado, podrían influir en la gravedad de la enfermedad COVID 19, es decir, las cargas virales de SARS-CoV-2 más altas

Kit de RT-qPCR para el virus SARS-CoV-2

PHI0012 750 reacciones

Mezcla primer/sonda
Estándares gen N1,5 mL
6 x 500 µL

podrían agravar el proceso de recuperación de los pacientes. Por lo anterior, se considera que el periodo de exposición al virus al comienzo de la infección puede aumentar la gravedad de la enfermedad, y a su vez se relaciona directamente con una alta carga viral.

b) Criterios de desempeño y limitaciones del método.

El kit RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 es exclusivo para la determinación de la carga viral de SARS-CoV-2 en muestras de origen respiratorio. No se garantiza que sea eficiente en el procesamiento de muestras de origen diferente. Además, se restringe el procesamiento y detección del virus en estas muestras mediante análisis por RT-qPCR.

c) Preparación de reactivos.

El kit RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 contiene todos los reactivos listos para su uso, no se requieren preparaciones adicionales o modificaciones para ninguno de estos.

d) Condiciones de almacenamiento y estabilidad de los reactivos.

- Todos los reactivos deben almacenarse a -20 ± 5 °C.
- Todos los reactivos pueden usarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta del kit, estos cuentan con fecha de caducidad de 1 año.
- Se deben evitar ciclos de descongelación y congelación repetidas (>3x) ya que esto puede afectar la estabilidad del kit y reducir la sensibilidad del ensayo.
- Descongele y mantenga en cadena de frío todos los reactivos durante los pasos de trabajo.
- Los componentes deben almacenarse protegidos de la luz.

e) Espécimen o muestra

Las muestras deben ser exclusivamente el resultado de extracciones de ARN de muestras de origen respiratorio como hisopados, aspirados nasofaringeos y orofaringeos, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal o esputo.

f) Procedimiento**Pasos previos al desarrollo del método**

Asegúrese de revisar cuidadosamente el protocolo con el fin de conocerlo y saber cuales equipos y reactivos se necesitan para el desarrollo exitoso del mismo.

PROTOCOLO DE RT-qPCR

1. Realizar protocolo de desinfección y limpieza en cabina de flujo laminar antes de introducir el material en ella.
2. Introducir todo el material y los reactivos (excepto la muestra de ARN en el área de mezcla) en la cabina de bioseguridad
3. Asegúrese de mantener la cadena de frío para los reactivos, los tubos de la mezcla maestra y de cada reacción. Realice todas las operaciones con una baja incidencia de luz para evitar que las sondas se degraden. La cadena de frío se debe mantener hasta el final del proceso de preparación de la mezcla y la adición del material genético.
4. En un tubo de 1,5 mL independiente preparar una mezcla maestra utilizando los volúmenes proporcionados en la tabla a continuación. Para escalar el protocolo utilizar la fórmula: volumen *((N*3)+12).

Nota: el control interno es exclusivo de cada laboratorio y no es suministrado en este kit;

One-Step RT-qPCR Kit

Vial	Volumen (µL)	Corrido N1 (10 muestras*) (µL)
2X One-Step Master Mix	10	420
One-Step RT Enzyme Mix	2	84
Mezcla primers/sonda N1	1,5	63
Agua libre de nucleasas	1,5	63
TOTAL	15	630

*Se recomienda evaluar los estándares por duplicado, y las muestras por triplicado. Por ejemplo: # de reacciones = (2 * Estándares) + (3 * # de muestras) = (2 * 6) + (3 * 10) = 42 reacciones

5. Realizar vortex a la mezcla maestra por 5 segundos.

6. Adicionar 15 μ L de la mezcla maestra en cada tubo de 0,1 mL o 0,2 mL (dependiendo del equipo usado para la detección, también pueden usarse tiras de tubos o placas completas de 96 pozos).

7. Centrifugar por 15 segundos.

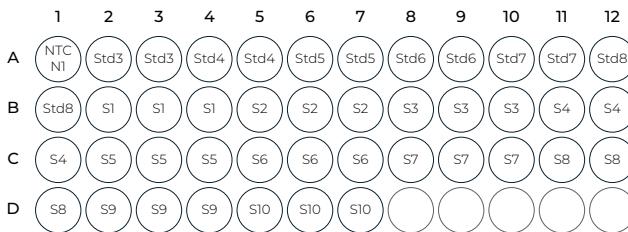
8. Pasar al área de ADN/ARN y dentro de la cabina de esta sección adicionar el ARN de las muestras y los estándares (STD).

9. Adicionar 5 μ L de agua en un tubo control sin molde de amplificación (NTC) y cerrar la tapa del tubo.

10. Adicionar 5 μ L de cada una de las muestras (S) en los tubos correspondientes y cerrar la tapa del tubo. Se recomienda hacer la evaluación de las muestras por triplicado.

11. Adicionar 5 μ L de cada uno de los estándares (STD) en los tubos correspondientes y cerrar la tapa del tubo. Se recomienda hacer el corrido de la curva estándar por duplicado.

El siguiente esquema representa el diseño de PCR para el gen blanco (N1). Para un total de 10 pacientes y 43 reacciones.



12. Centrifugar por 5 segundos.

13. Cerrar los tubos y disponerlos en el equipo de detección de RT-qPCR.

14. Programar el equipo con las siguientes condiciones de PCR.

En el reportero programar FAM o Green (dependiendo del equipo) y volumen 20 μ L.

Etapa 1: 15 minutos a 50°C

Etapa 2: 2 minutos a 95°C

Etapa 3: (45 ciclos)

Paso 1: 3 segundos a 95°C

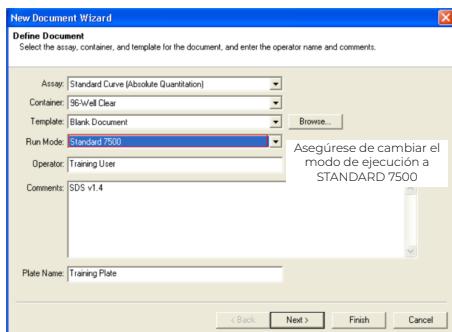
Paso 2: 30 segundos a 55°C (Capturar la señal)

PROTOCOLO DE RT-qPCR APPLIED BIOSYSTEMS® 7500 FAST DX REAL-TIME PCR

Si la plantilla ya existe en su instrumento, vaya a la sección “RUNNING A TEST.”

1. Inicie el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Dx haciendo doble clic en el ícono del sistema Applied Biosystems 7500 Fast Dx en el escritorio.

2. Debería aparecer una nueva ventana, seleccione “Create New Document” en el menú.



3. Aparecerá la pantalla del New Document Wizard. Seleccione:

a. Assay: Standard Curve (Absolute Quantitation)

b. Container: 96-Well Clear

c. Template: Blank Document

d. Run Mode: Standard 7500

e. Operator: Nombre del usuario

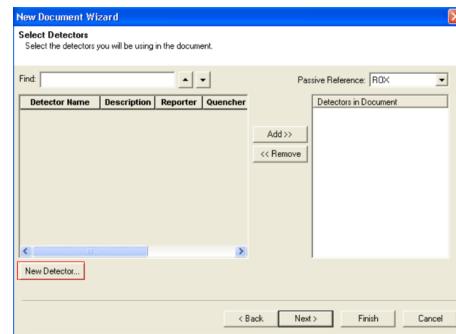
f. Comments: SDS v1.4

g. Plate Name: Nombre del corriente

4. Después de seleccionar, haga clic en “Next” en la parte inferior de la ventana.

5. Despues de seleccionar “Next”, aparecerá la pantalla “Select Detectors.”

6. Haga clic en el botón “New Detector”



7. Aparecerá la ventana “New Detector.” Será necesario definir un nuevo detector para cada conjunto de primer y sonda. La creación de estos detectores le permitirá analizar cada conjunto de primer y sonda individualmente al final de la reacción.

8. Comience creando el Detector N1. Incluya lo siguiente:

a. Name: N1

b. Description: leave blank

c. Reporter Dye: “FAM”

d. Quencher Dye: “(none)”

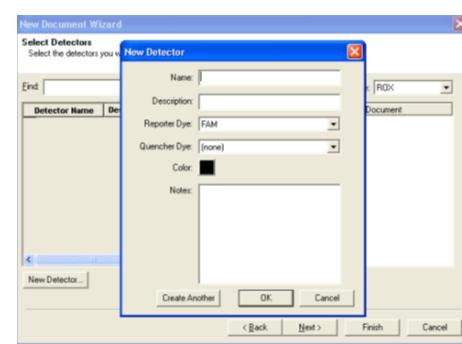
e. Color: Para cambiar el color del indicador del detector, haga lo siguiente:

i. Haga clic en el cuadro de color para mostrar la tabla de colores.

ii. Seleccione un color haciendo clic en uno de los cuadrados.

iii. Después de seleccionar un color, haga clic en “OK” para volver a la pantalla “New Detector.”

f. Haga clic en el botón “OK” de la pantalla “New Detector” para volver a la pantalla que se muestra en la Figura.

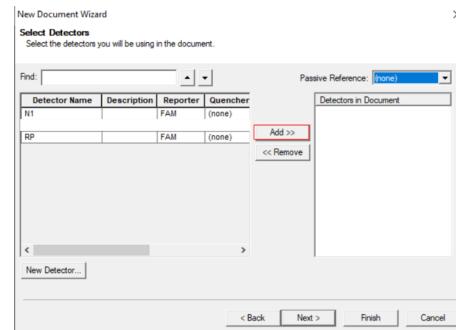


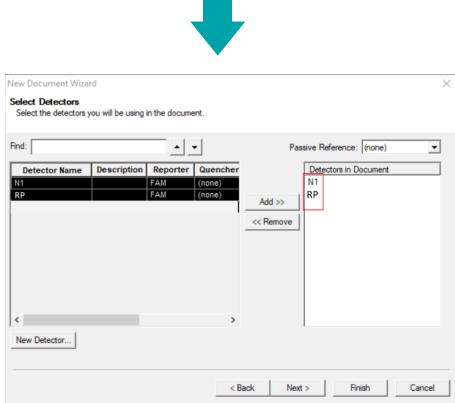
9. Repita los pasos 6-8 para cada marcador (gen) en el panel.

Name	Reporter Dye	Quencher Dye
N1	FAM	(none)
RP	FAM	(none)

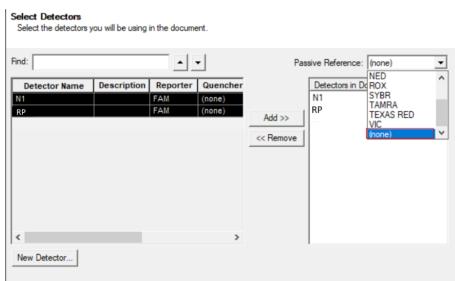
10. Después de agregar cada detector, los campos Detector Name, Description, Reporter y Quencher se completarán en la pantalla “Select Detectors.”

11. Antes de continuar, los detectores recién creados deben agregarse al documento. Para agregar los nuevos detectores al documento, haga clic en ADD como se muestra en la siguiente figura. Los nombres de los detectores aparecerán en el lado derecho de la ventana “Select Detectors”.

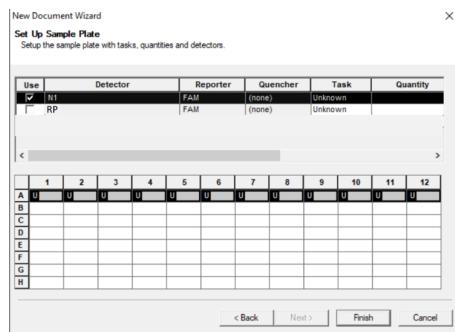




12. Una vez que se hayan agregado todos los detectores, seleccione "(none)" para "Passive Reference" en el menú desplegable de la parte superior derecha.



13. Haga clic en "Next" en la parte inferior de la ventana "Select Detectors" para pasar al Set Up "Sample Plate".

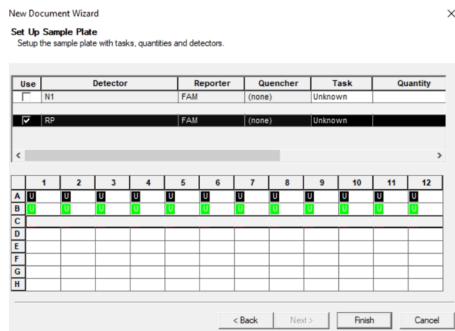


14. En la ventana "Set Up Sample Plate", use su mouse para seleccionar la fila A de la parte inferior de la ventana, en la hoja de cálculo. Para los estándares seleccionar "Standar" en la columna "Task", y escribir la concentración especificada para cada estándar.

15. En la parte superior de la ventana, seleccione el detector **N1**. Aparecerá una verificación al lado del detector que ha seleccionado. También notará que la fila en la hoja de cálculo se completará con un ícono en "U" de color para indicar qué detector ha seleccionado.

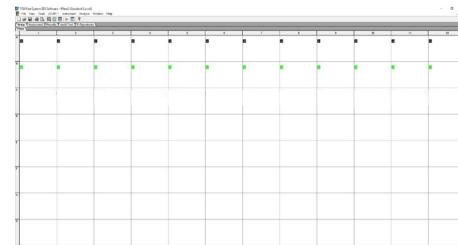
16. Repita los pasos 14-15 para cada detector que se utilizará en el ensayo.

17. Seleccione "Finish" después de que se hayan asignado detectores a sus filas respectivas.



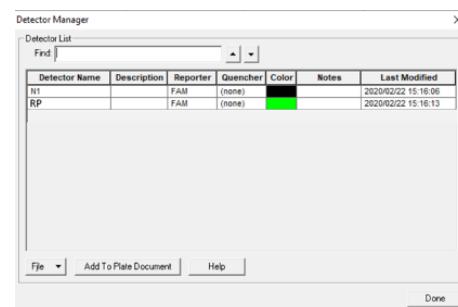
18. Despues de hacer clic en "Finish", habrá una breve pausa que permitirá que el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Dx inicie. Posterior a esto, le sigue un chasquido. Nota: La máquina debe estar encendida para iniciar.

19. Despues de la iniciar, aparecerá la pestaña "**Plate**" de la Configuración (ver siguiente figura).



20. Cada pocillo de la placa debe contener íconos de U en color que corresponden con las etiquetas del detector que se eligieron previamente. Para confirmar las asignaciones de detectores, seleccione "Tools" en el menú de archivo, luego seleccione "Detector Manager".

21. Aparecerá la ventana del Detector Manager.



22. Confirme que todos los detectores están incluidos y que cada objetivo tiene un "Reporter" establecido en FAM y Quencher está configurado en "(none)".

23. Si todos los detectores están presentes, seleccione "Done". La información del detector se ha creado y asignado a los pozos en la placa.

24. Programar el equipo con las siguientes condiciones de PCR.

- Después de que los detectores hayan sido creados y asignados, proceda a la configuración del equipo.
- Seleccione la pestaña "**Instrument**" para definir las condiciones del ciclo térmico.
- Modifique las condiciones del ciclo térmico de la siguiente manera de acuerdo a la enzima RT a utilizar.

SMOBIO ExcelRTTM One-Step RT-qPCR Kit

Etapa 1: 15 min a 45 °C

Etapa 2: 2 min a 95 °C

Etapa 3: (45 ciclos)

Paso 1: 3 segundos a 95°C.

Paso 2: 30 segundos a 55,0°C.

- En "**Settings**", cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- En "**Settings**", la selección del "**Run Mode**" debe ser "**Standard 7500**".
- El Paso 2 de la Etapa 4 debe resaltarse en amarillo para indicar el paso en el que se debe hacer la captura de los datos (Ver la siguiente figura).

Thermofisher TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Máster Mix, CG

Etapa 1: 2 min a 25°C; 1 ciclo.

Etapa 2: 15 min a 50°C; 1 ciclo.

Etapa 3: 2 min a 95°C, 1 ciclo.

Etapa 4: (45 ciclos)

Paso 1: 3 segundos a 95°C.

Paso 2: 30 segundos a 55,0°C.

- En "**Settings**", cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- En "**Settings**", la selección del "**Run Mode**" debe ser "**Standard 7500**".
- El Paso 2 de la Etapa 4 debe resaltarse en amarillo para indicar el paso en el que se debe hacer la captura de los datos (Ver la siguiente figura).

Quantabio qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix or UltraPlex 1-Step ToughMix

Etapa 1: 10 min a 50°C, 1 ciclo.

Etapa 2: 3 min a 95°C, 1 ciclo.

Etapa 3: (45 ciclos)

Paso 1: 3 segundos a 95°C.

Paso 2: 30 segundos a 55.0°C.

- En "Settings", cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- En "Settings", la selección del "Run Mode" debe ser "Standard 7500".
- El Paso 2 de la Etapa 4 debe resaltarse en amarillo para indicar el paso en el que se debe hacer la captura de los datos (Ver la siguiente figura).

Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System

Etapa 1: 15 min a 45 °C, 1 ciclo

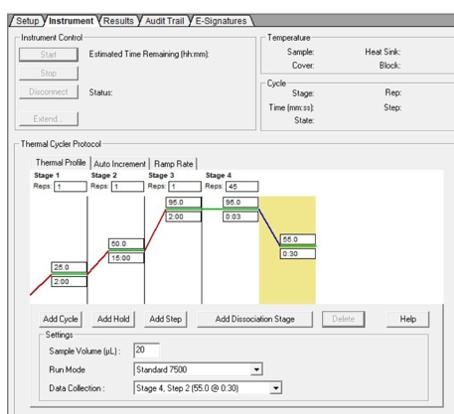
Etapa 2: 2 min a 95 °C, 1 ciclo

Etapa 3: (45 ciclos)

Paso 1: 3 segundos a 95°C.

Paso 2: 30 segundos a 55.0°C.

- En "Settings", cuadro inferior izquierdo, cambie el volumen a 20 µL.
- En "Settings", la selección del "Run Mode" debe ser "Standard 7500".
- El Paso 2 de la Etapa 4 debe resaltarse en amarillo para indicar el paso en el que se debe hacer la captura de los datos (Ver la siguiente figura).



25. Despues de realizar cambios en la pestaña "**Instrument**", el archivo de plantilla está listo para guardarse. Para guardar la plantilla, seleccione "**File**" en el menú superior, luego seleccione "**Save As**". Dado que las opciones de enzima tienen diferentes configuraciones del equipo, se recomienda guardar la plantilla con un nombre que indique la opción de enzima.

26. Guarde la plantilla como "**2019-nCoV Dx Panel TaqPath o 2019-nCoV Dx Panel Quanta o 2019-nCoV Dx Panel Promega**" según corresponda en la carpeta del escritorio con la etiqueta "**ABI Run Templates**" (debe crear esta carpeta). Guardar como tipo SDS Templates (*.sdt).

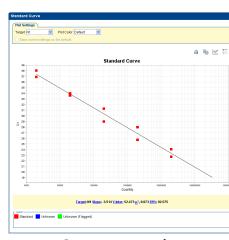
g) Cálculo de los resultados analíticos.

Interpretar como positiva toda lectura que pase el umbral con un CT < 40

Si existe amplificación en alguno de los NTC, invalide el corrido y repítalo siguiendo estrictamente el protocolo.

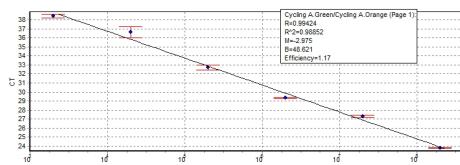
Analizar la curva estándar, siguiendo las recomendaciones para buenas prácticas de qPCR donde una regresión lineal para cuantificar debe cumplir con un $R^2 > 0.95$ y una eficiencia de reacción (E) cercana al 100% (I) (ver la siguiente figura). Si esto no ocurre repetir la RT-qPCR siguiendo estrictamente el protocolo, si continua considere degradación de los reactivos.

RT-qPCR para SARS-CoV-2 en AB7500



Curva estandar

RT-qPCR para SARS-CoV-2 en Rotor Gene Q



Curva estandar

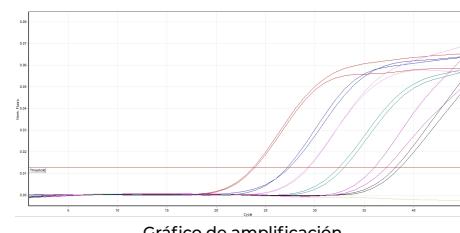


Gráfico de amplificación

Recuerde que al analizar el corrido del equipo, se obtiene una Carga Viral Cruda (CVC) que debe ser ajustada teniendo en cuenta el tipo de muestra, el volumen inicial de la muestra y el volumen utilizado para la extracción de ARN, para poder calcular la Carga Viral Real (CVR) del paciente. Para este cálculo, tenga en cuenta las siguientes fórmulas:

- Para aspirado nasofaríngeo (reportar en copias virales/mL):

$$CVR = \frac{\text{volumen de elución (µL)} \times \text{CVC (copias/mL)}}{\text{volumen utilizado de la muestra (µL)}}$$

Ejemplo: para un aspirado nasofaríngeo de volumen total 3 mL, en donde se utilizaron 400 µL para la extracción de ARN y la muestra fué eluída en 50 µL de agua, la CVC se debe multiplicar por 0,125 para obtener la CVR.

$$CVR = \frac{50 \mu\text{L} * \text{CVC (copias/mL)}}{400 \mu\text{L}} = 0,125 * \text{CVC (copias/mL)}$$

- Para hisopado nasofaríngeo (reportar en copias virales/hisopo):

$$CVR = \frac{\text{volumen de elución (µL)} \times \text{CVC (copias/mL)} \times \text{volumen medio de transporte (mL/hisopo)}}{\text{volumen utilizado de la muestra (µL)}}$$

Ejemplo: para un hisopo que fue preservado en 2 mL de medio de transporte viral, en donde se utilizaron 400 µL para la extracción de ARN y la muestra fué eluída en 50 µL de agua, la CVC se debe multiplicar por 0,25 para obtener la CVR.

$$CVR = \frac{50 \mu\text{L} * \text{CVC (copias/mL)} * 2 (\text{mL/hisopo})}{400 \mu\text{L}} = 0,25 * \text{CVC (copias/hisopo)}$$

Nota: Para que sus resultados puedan ser comparables, por favor estandarice los protocolos de toma de muestra y extracción de ARN, si el volumen de muestra y/o el volumen en el cual se recupera el ARN cambian por favor asegúrese de ajustar el factor de acuerdo a las modificaciones. En este protocolo se recomienda la utilización de las cantidades descritas en el ejemplo.

CONTRAINDICACIONES Y ADVERTENCIAS:

Información contenida en la FICHA DE SEGURIDAD (safety data sheets, SDS) para RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2 a partir de ARN aislado de muestras clínicas.

REFERENCIAS

(I) Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSHL Press.

(2) WHO. (2020). Viral load testing. In vitro diagnostics and laboratory technology; World Health Organization. https://www.who.int/diagnostics_laboratory/faq/viral_load/en/

RT-qPCR para SARS-CoV-2 en AB7500

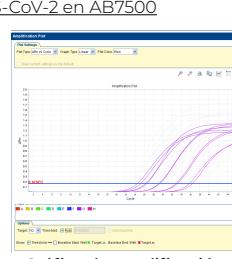


Gráfico de amplificación