



WGene SARS-CoV-2

RT Detection

Método para detección de secuencias de ARN del virus SARS-CoV-2 mediante
Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

SIGNIFICACION CLINICA

El coronavirus es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que puede causar una variedad de enfermedades agudas y crónicas en animales domésticos, mascotas y en humanos.

A fines del 2019 se identificó un nuevo coronavirus a partir de casos de neumonía viral en Wuhan (China). Este nuevo virus fue nombrado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como SARS-CoV-2. La enfermedad causada por el SARS-CoV-2 se denomina COVID-19, la cual presenta desde formas leves con pocos o ningún síntoma hasta cuadros con neumonía y la muerte en los casos de mayor gravedad. Los síntomas más comunes son fiebre, tos, dolor de garganta, pérdida de olfato (anosmia) y del gusto (disgeusia), dificultad para respirar y disnea.

El ARN del SARS-CoV-2 generalmente se detecta en muestras de las vías respiratorias superiores (hisopados nasofaríngeo u oro faríngeo, saliva, etc.) durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2. Se recomienda evaluar la correlación clínica con el historial del paciente y otros parámetros diagnósticos que ayuden a determinar el estado de infección del mismo.

Los resultados positivos no descartan co-infección bacteriana o co-infección con otros virus. Los resultados negativos no excluyen la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para las decisiones de manejo del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** es un ensayo "in vitro" que comprende la retrotranscripción de secuencias específicas del ARN viral, seguida de amplificación por PCR en tiempo real en un paso (one step RT-qPCR). Este ensayo de detección cualitativa de secuencias del genoma viral, se realiza a partir de muestras biológicas de origen respiratorio (hisopados nasofaríngeo u orofaríngeo) y saliva de individuos con sospecha de COVID-19.

El kit detecta dos de los genes virales que presentan mayor relevancia diagnóstica: RdRp (correspondiente a la ARN polimerasa viral dependiente de ARN) y N (correspondiente a la nucleocápside).

El procedimiento completo consiste en la purificación del ARN viral a partir de la muestra biológica, el cual luego se utiliza en la etapa de retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real en un paso utilizando sondas tipo TaqMan®.

El ARN de SARS-CoV-2 se transcribe a ADNc (ADN copia) mediante la enzima transcriptasa reversa, el cual se utiliza como molde para la amplificación por PCR mediante una enzima Hot Start ADN polimerasa. Durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la enzima provoca la degradación de la sonda tipo TaqMan® separándose el fluoróforo del *quencher*. El aumento de la señal de fluorescencia resultante por acumulación del ADN templado, es detectado por el instrumento de PCR en tiempo real: canal FAM para detección conjunta de los genes RdRp y N, y canal YAK (Yakima Yellow, o VIC/JOE/HEX) para detección del gen de la ARNasa P como control interno endógeno. Este control endógeno, asegura la presencia de ácidos nucleicos de la muestra clínica y la ausencia de inhibidores en la reacción de amplificación.

Es necesario además incluir un Control Negativo de reacción (NC) para confirmar la ausencia de contaminación de los reactivos. Para esto se utiliza agua libre de nucleasas (reactivo RNase/DNase-free H₂O) como muestra. En caso de resultado positivo para este control, se debe repetir la prueba buscando previamente las posibles fuentes de contaminación y eliminándolas.

REACTIVOS PROVISTOS

PC SARS-CoV-2/IC: Control Positivo que consiste en secuencias de ADN específicas del SARS-CoV-2. Incluye además, ADN de un Control Interno endógeno (IC). Presentación: seco.

RT Mix SARS-CoV-2 (40x): mezcla de reacción para la retrotranscripción del ARN viral y del IC. Contiene: buffer de reacción, DTT 100 mM, Inhibidores de ARNasas 40 U/μl, Transcriptasa Reversa, agua tratada con DEPC, estabilizantes y conservantes. Presentación: líquido.

Master Mix SARS-CoV-2 (5x): mezcla de reacción para la amplificación/detección del ADNc resultante de la retrotranscripción. Contiene: buffer de reacción, KCl 250 mM, dNTPs 1 mM, Hot Start DNA polimerasa, MgCl₂ 15 mM, agentes reductores, estabilizantes y conservantes. Presentación: líquido.

Oligo Mix SARS-CoV-2: mezcla de oligonucleótidos y sondas para la amplificación específica de las secuencias de SARS-CoV-2 y del IC. Presentación: seco.

RNase/DNase-free H₂O: agua libre de nucleasas. Presentación: líquido.

REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO NO PROVISTOS

- Sistema comercial de purificación de ARN (mediante columnas de sílica o partículas magnéticas).
Nota: si bien el **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** fue validado con los productos que figuran a continuación, pueden utilizarse otros sistemas comerciales similares.
 - MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, Cat. 03 730 964 001)
 - High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Cat. 11 858 874 001)
 - EasyPure Viral DNA/RNA kit (TransGen Biotech, Cat. TGB-ER20102)
 - MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, (Applied Biosystems, Cat. A42352) en equipo automatizado KingFisher™ Flex, (Thermo Scientific, Cat. N07669).
 - TIANamp Virus RNA Kit (TIANGEN, Cat. DP315-R).
- Micropipetas de volumen variable
- Tips con filtro libres de nucleasas
- Tubos de microcentrífuga (x 1,5 o 2 ml) libres de nucleasas
- Gradilla para tubos de 1,5 ml o 2 ml
- Guantes descartables látex, vinilo o nitrilo sin polvo
- Soporte de reacción acorde al Instrumento de PCR en tiempo real que se utilice (ej. microplacas con films ópticos, tubos de qPCR, etc.)
- Termociclador o instrumento de PCR en tiempo real: pueden utilizarse diferentes marcas comerciales, siempre que cuenten con canal de detección de fluorescencia para FAM y YAK/JOE/VIC.
Nota: este producto fue validado en los siguientes termocicladores:
 - QuantStudio® 3 (Applied Biosystems)
 - StepOne Plus® (Applied Biosystems)
 - Applied Biosystems 7500® (Applied Biosystems)
 - CFX96® (Biorad)
 - Rotor Gene Q® (Qiagen)
 - Light Cycler 480® (Roche)
 - Mic® qPCR Thermal Cycler - 4 (Biomolecular Systems)
 - Mastercycler® RealPlex (Eppendorf)
- Agitador vórtex
- Microcentrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 a 2 ml
- Recipiente para el descarte de material biológico
- Equipo de protección personal

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Leer atentamente las instrucciones de uso antes de realizar el ensayo.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente (una vez reconstituidos), homogeneizarse y centrifugarse brevemente antes de iniciar el ensayo. Luego se recomienda mantenerlos refrigerados, especialmente las mezclas de retrotranscripción y amplificación de ácidos nucleicos, las cuales deben homogeneizarse suavemente, evitando formación de espuma.
- No usar los reactivos luego de la fecha de vencimiento.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes ni modificar los procedimientos del ensayo.
- No emplear reactivos de origen diferente al indicado.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.
- Evitar que los componentes sufran contaminación microbiana o con nucleasas, cuando se introduzcan elementos dentro de los mismos.
- Si el sistema de purificación de ARN a utilizar contiene soluciones de lavado con etanol, asegurar la eliminación de posibles trazas del mismo antes de eluir el ARN ya que inhibe la reacción de qPCR.
- Es fundamental para el uso de este producto, contar con los conocimientos básicos en el manejo de técnicas moleculares para diagnóstico. Debido a la alta sensibilidad de la tecnología de amplificación, es necesario respetar las normas de trabajo indicadas para este tipo de análisis (áreas de procesamiento de muestras, pre y post amplificación, flujo del trabajo, uso de material apropiado, etc.).

ESTABILIDAD, TRANSPORTE E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El kit se puede transportar en forma refrigerada (2-10°C). Una vez recibido, almacenar el kit completo a -20°C hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Una vez resuspendidos los reactivos que vienen liofilizados, también conservarlos a -20°C.

Evitar repetidos ciclos de congelamiento/descongelamiento de los reactivos (no más de tres ciclos) ya que pueden causar pérdida de reactividad.

En caso de no usar los reactivos regularmente, es aconsejable dividirlos en alícuotas y colocar las mismas a -20°C , teniendo en cuenta la utilización de material libre de nucleasas y que el reactivo Oligo Mix SARS-CoV-2 contiene sondas que requieren estar protegidas de la luz.

MUESTRA

ARN purificado a partir de hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo y saliva

a) Recolección y transporte de la muestra:

Las muestras deben ser recolectadas y transportadas según las recomendaciones de las autoridades sanitarias locales (<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/laboratorio>).

b) Purificación del ARN:

El ARN se purifica según los requerimientos e instrucciones del fabricante del kit de extracción de ARN utilizado, el cual debe ser compatible con la metodología qPCR, asegurando una alta calidad del ARN purificado.

El procedimiento se realiza en condiciones de seguridad adecuadas para manejo de material infeccioso (según el documento M29-Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections del NCCLS).

c) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento del ARN:

Los ensayos moleculares son particularmente sensibles a las condiciones preanalíticas subóptimas, por lo cual la calidad de la muestra a utilizar es fundamental.

El ARN purificado debe mantenerse en baño de hielo y/o bloque frío hasta el momento de su utilización. Si es necesario conservarlo por un período mayor de tiempo, se debe guardar a $\leq -70^{\circ}\text{C}$. En caso de ser necesario, para evitar más de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, se recomienda alicuotarlo.

PROCEDIMIENTO COMPLETO DEL ENSAYO

1- Extracción del ARN (ver MUESTRA)

2- Reconstitución de los reactivos liofilizados

Hacer una breve centrifugación de los mismos para evitar pérdidas al abrir los tubos.

En el área de pre-amplificación:

Reconstituir el reactivo Oligo Mix SARS-CoV-2 utilizando 110 μl del reactivo RNase/DNase-free H_2O . Homogeneizar con vórtex por 30 segundos, dejar 5 minutos a temperatura ambiente, volver a homogeneizar y hacer una breve centrifugación antes de su uso. Mantener el reactivo reconstituido refrigerado (en hielo o bloque frío) durante su uso.

Guardar el reactivo reconstituido a -20°C luego de su uso.

En el área de amplificación:

Reconstituir el reactivo PC SARS-CoV-2/IC utilizando 500 μl del reactivo RNase/DNase-free H_2O . Homogeneizar con vórtex por 30 segundos, dejar 5 minutos a temperatura ambiente, volver a homogeneizar y hacer una breve centrifugación antes de su uso.

Guardar el reactivo reconstituido a -20°C luego de su uso.

3- Preparación de la mezcla de reacción

En el área de pre-amplificación:

Descongelar los reactivos por completo y mezclar.

Los reactivos RT Mix SARS-CoV-2 (40x) y Master Mix SARS-CoV-2 (5x), deben mezclarse suavemente evitando formación de espuma y colocarse inmediatamente en frío (hielo o bloque frío), una vez descongelados.

Hacer una breve centrifugación de los mismos para evitar pérdidas al abrir los tubos.

Preparar la mezcla de reacción siguiendo las proporciones que indica la tabla, teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar en el ensayo.

Reactivo	Volumen por reacción (μl)	Volumen por n reacciones (μl)
RT Mix SARS-CoV-2 (40x)	0,5	
Master Mix SARS-CoV-2 (5x)	4	
Oligo Mix SARS-CoV-2	1	
RNase/DNase-free H_2O	9,5	

$n = \text{N}^{\circ}$ de muestras clínicas a analizar + PC SARS-CoV-2/IC (duplicado) + NC (Control Negativo) + 10%

Dispensar 15 µl de la mezcla de reacción en cada tubo/pocillo de reacción.

Agregar 5 µl de la muestra clínica o de los controles a los correspondientes pocillos/tubos de reacción, según lo siguiente:

- Muestras a analizar: 5 µl de los ARN purificados correspondientes a cada muestra

- NC: 5 µl del reactivo RNase/DNase-free H₂O

- PC: 5 µl del reactivo PC SARS-CoV-2/IC

El volumen final de reacción es de 20 µl.

Se recomienda en todo momento, manipular las muestras en el área destinado para tal fin y el PC en el área de amplificación, para evitar contaminar el resto de los reactivos.

Cerrar los tubos/pocillos de reacción e iniciar la reacción en el termociclador.

4- Programación del termociclador

Es necesario tener información básica respecto al manejo y programación del termociclador a utilizar, por lo cual se recomienda referirse al manual del instrumento correspondiente.

Las condiciones generales para llevar a cabo la reacción qPCR, son las siguientes:

Condiciones generales	
Programa	Cuantificación absoluta
Volumen de reacción	20 µl
Colorante de referencia pasivo*	No contiene
Tipo de enzima (Taq)	Standard
Tipo de química	Sonda de hidrólisis

*Solo en equipos que utilizan colorantes pasivos (Applied Biosystems® 7500, StepOne™, StepOnePlus™, QuantStudio™, etc.)

Detectores de fluorescencia	
Detección	Fluoróforo (absorción/emisión)
SARS-CoV-2	FAM (492 nm / 516 nm)
IC	YAK* (530 nm / 550 nm)

*El espectro de absorción/emisión es similar a JOE/VIC

Programa de amplificación y detección				
Etap	Temperatura	Tiempo (min:seg)	Ciclos	Adquisición
Retrotranscripción	50°C	10:00	1	
Desnaturalización/ Activación Taq	95°C	10:00	1	-
Amplificación	95°C	0:15	45	Si*
	58°C	0:30		

*Los datos de fluorescencia se deben registrar durante el paso de extensión (58°C).

5- Análisis de los resultados

Es importante tener información básica respecto al procedimiento de análisis de datos del termociclador utilizado en la reacción de qPCR, por lo cual se recomienda referirse al manual del instrumento.

Para analizar las curvas de amplificación, es necesario fijar correctamente los siguientes parámetros: línea de base (*baseline*) y valor umbral de fluorescencia (*threshold*). Estos parámetros pueden ser seleccionados de forma automática por el programa, de acuerdo al algoritmo que utiliza, o de forma manual.

Ambos parámetros influyen en la determinación del valor de Ct (ciclo que supera el valor umbral de fluorescencia) para cada muestra.

- La línea de base debe comprender los ciclos de PCR en los cuales la señal de fluorescencia se encuentra por debajo de los límites de detección del instrumento (normalmente un rango de valores de Ct desde 3 a 15).

- El valor umbral de fluorescencia se debe fijar en la fase exponencial de las curvas de amplificación de las muestras positivas para el templado que se analiza. Por lo general, se fija alrededor del 10% respecto a la fluorescencia máxima del plateau general de las curvas de amplificación.

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

Una vez definidos los parámetros anteriores, el ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

Control	Detección en FAMTM (Ct)	Detección en YAKTM (Ct)
PC	≤ 32	≤ 32
NC	> 40	$> 35^*$

* Eventualmente se pueden observar señales inespecíficas en el NC en el canal YAK, que no poseen forma sigmoidea y suelen aparecer en Ct >35.

INTERPRETACION DE RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS CLINICAS

- Se considera **muestra detectable para SARS-CoV-2** cuando, en el canal de fluorescencia FAM, se observa una curva de amplificación que cruza el umbral (*threshold*) dando lugar a un valor de Ct ≤ 40 .
- Se considera **muestra no detectable para SARS-CoV-2** cuando, en el canal de fluorescencia FAM, la curva de fluorescencia no cruza el umbral dando lugar a la ausencia de Ct o lo cruza con un valor mayor a 40.
- Las muestras deben además detectar el IC, presentando una curva de amplificación en el canal YAK que cruce el umbral de fluorescencia con un Ct ≤ 35 . Sin embargo, puede ocurrir para muestras detectables para SARS-CoV-2 (canal FAM), que se inhiba la amplificación del IC (no detectable en canal YAK), no invalidando el resultado (Ver nota 1 en la tabla que figura a continuación).

En caso que una muestra resulte de dudosa interpretación o inválida, se recomienda repetir el ensayo a partir de una nueva purificación del ARN o recolectar una nueva muestra respiratoria del paciente.

Muestra	Detección en FAM	Detección en YAK	Interpretación del resultado
A	Detectable (Ct ≤ 40)	Detectable (Ct ≤ 35) / No Detectable (Ct > 35) ¹	Presencia de ARN de SARS-Cov-2
B	No Detectable (Ct > 40)	Detectable (Ct ≤ 35)	Ausencia de ARN de SARS-Cov-2
C	No Detectable (Ct > 40)	No Detectable (Ct > 35)	Inválido ²

¹ La detección del IC en el canal de YAK (YAK detectable) no es requerida para resultados detectables en el canal de FAM.

² Inhibición de la qPCR, problema con la purificación del ARN y/o en la recolección de la muestra clínica.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Cualquier resultado diagnóstico obtenido con este kit debe ser interpretado en conjunto con otros hallazgos clínicos y/o de laboratorio.
- Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben ser la única base de decisión de manejo del paciente.
- Un resultado positivo indica la detección de ácido nucleico del SARS-CoV-2.
- Pueden surgir resultados falsos positivos debido a contaminación cruzada por SARS-CoV-2, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de ARN viral o contaminación debido a productos de PCR de reacciones anteriores.
- Los resultados falsos negativos pueden deberse a: recolección inadecuada de muestras; degradación del ARN viral durante el envío/almacenamiento; la presencia de inhibidores de qPCR, etc.

ESPECIFICACIONES DEL ENSAYO

1- Sensibilidad Analítica - Límite de Detección (LOD)

Se determinó la sensibilidad analítica mediante la evaluación de muestras de distintas concentraciones de SARS por octuplicado, repitiendo el esquema durante 4 días (32 datos por cada concentración). Las muestras se prepararon a partir de un ARN viral completo de SARS-CoV-2 cuantificado (AMPLIRUN® CORONAVIRUS SARS-CoV-2 RNA CONTROL, Vircell, Ref. MBC137-R) en un pool de muestras de hisopado orofaríngeo negativas para SARS-CoV-2. Un resumen de los resultados positivos obtenidos, son los que figuran a continuación:

Controles SARS-CoV-2 (copias/reacción)	N° de positivos					% de positivos
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	TOTAL	
50	8	8	8	8	32	100
25	8	8	8	8	32	100
10	8	8	8	8	32	100
5	4	2	6	5	17	53,13
2,5	3	1	0	2	6	18,75
1	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0

Con los datos anteriores, se llevó a cabo un análisis de regresión Probit. El **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** presentó un LOD de 9,6 copias/reacción para un IC95%.

2- Especificidad Analítica

Análisis *in silico*

El análisis *in silico* se realizó comparando las secuencias de los oligonucleótidos/sondas utilizadas en el **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** con las secuencias ácidos nucleicos de microorganismos filogenéticamente relacionados y/o que puedan estar presentes en la muestra clínica. Se definió como reactividad cruzada como la presencia de identidad nucleotídica superior al 80% entre los oligonucleótidos y cualquier secuencia presente en el microorganismo objetivo. Tras este análisis no se encontró reactividad cruzada con especies distintas al SARS-CoV-2, excepto con la secuencia del virus SARS-CoV-1. Se identificó que los oligonucleótidos del gen RdRp presentaron una identidad mayor al 80%, teniendo la sonda una identidad del 88%. Basado en este análisis, no se puede descartar que este virus sea amplificado y detectado por el **WGene SARS-CoV-2 RT Detection**. Sin embargo, el virus SARS-CoV no ha sido detectado en población humana desde el año 2004 (<https://www.cdc.gov/sars/index.html>).

En la tabla siguiente se detallan los patógenos incluidos en el análisis de especificidad analítica *in silico*.

Microorganismo	Número de acceso GenBank
Human coronavirus 229E	NC_002645.1
Human coronavirus HKU1	NC_006577.2
Human Coronavirus NL63	NC_005831.2
Human coronavirus OC43 strain ATCC VR-759	NC_006213.1
Middle East respiratory syndrome coronavirus	NC_019843.3
SARS coronavirus	NC_004718.3
Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008	NC_014470.1
Human adenovirus type 1	AC_000017.1
Human parainfluenza virus 1 isolate NM001	KX639498.1
Human parainfluenza virus 2 isolate VIROAF10	KM190939.1
Human parainfluenza virus 3 strain HPIV3/AUS/3/2007	KF530243.1
Respiratory syncytial virus strain B/WI/629-Q0190/10	JN032120.1
Human enterovirus D	NC_001430.1
Human rhinovirus 14	NC_001490.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapi-ens/PER/FPP00726/2011/A	KJ627437.1
Influenza A virus (A/New York/PV305/2017(H1N1))	MH798556.1
Influenza B virus (B/Nicaragua/8689_13/2017)	MK969560.1
Bordetella pertussis strain B3921	CP011448.1
Candida albicans strain L757 mitochondrion	NC_018046.1
Haemophilus influenzae PittGG	CP000672.1
Legionella pneumophila strain Philadelphia_1_CDC chromo-some	CP015928.1
Mycobacterium tuberculosis DNA strain: HN-506	AP018036.1
Mycoplasma pneumoniae strain 14-637 chromosome	CP039772.1
Pneumocystis jirovecii isolate SW7_full mitochondrion	MH010446.1
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14	CP000438.1

Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325 chromosome	NC_007795.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	NC_004461.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-01	NC_005008.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-02	NC_005007.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-03	NC_005006.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-04	NC_005005.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-05	NC_005004.1
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 plasmid pSE-12228-06	NC_005003.1
Streptococcus pneumoniae strain D39V chromosome	CP027540.1
Streptococcus pyogenes MGAS8232	AE009949.1
Streptococcus salivarius strain FDAARGOS_259 chromosome	CP020451.2

Ensayo *in vitro*

Se evaluaron muestras de ácidos nucleicos de otros patógenos respiratorios que podrían presentar reactividad cruzada y generar resultados falsos positivos con el kit **WGene SARS-CoV-2 RT Detection**.

En la tabla siguiente figuran los patógenos analizados:

Patógeno identificado	Resultado SARS-CoV-2	Resultado IC
Adenovirus humano TIPO A/B/C/D/E	Negativo	Positivo
Rhinovirus TIPO A/B/C	Negativo	Positivo
Moraxella catarrhalis	Negativo	Positivo
Haemophilus influenzae	Negativo	Positivo
Influenza A	Negativo	Positivo
Rhinovirus TIPO A/B/C	Negativo	Positivo
Streptococcus pneumoniae	Negativo	Positivo
Coronavirus 229E/NL63	Negativo	Positivo

El producto no presentó reactividad cruzada con ninguno de los patógenos evaluados en el ensayo.

3- Estudio de Inclusividad

El análisis *in silico* se realizó utilizando las 16.378 secuencias del virus SARS-CoV-2 disponibles a nivel mundial en la base de datos GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, <https://www.gisaid.org>), acceso 13 de mayo de 2020. Teniendo en cuenta las identidades presentadas por los oligonucleótidos diseñados en los genes RdRp y N, 16.347 (99,8%), las secuencias presentaron 100% de identidad con al menos uno de los genes. Las 31 secuencias restantes presentaron 1 base no apareada (mismatch) en algunos de los oligonucleótidos involucrados.

4- Estudio de Precisión

La precisión se determinó a través de la evaluación de una muestra clínica diluida en matriz negativa (MC-1), el control positivo (PC) y una muestra de ARN de SARS de 50 copias/reacción, en 3 instrumentos diferentes (QuantStudio® 3 (Applied Biosystems), Mic qPCR Thermal Cycler - 4 (Biomolecular Systems) y Mastercycler® RealPlex (Eppendorf)) repitiendo el esquema durante 5 días.

Un resumen de los parámetros obtenidos, es el siguiente:

Muestra	Ct SARS-CoV-2 Promedio	Repetibilidad DS	Repetibilidad CV	Intra instrumento DS	Intra instrumento CV	Reproducibilidad DS	Reproducibilidad CV
CP kit	28,78	0,16	0,6%	0,22	0,8%	0,45	1,6%
MC-1	29,50	0,11	0,4%	0,21	0,7%	0,35	1,2%
SARS-CoV-2	32,40	0,26	0,8%	0,34	1,1%	0,49	1,5%

El producto **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** presenta para todas las muestras evaluadas un coeficiente de variación (CV) < 2% en las determinaciones intra e inter instrumento, confirmando la robustez del producto.

5- Validación Clínica

La validación clínica del **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** se realizó mediante el análisis de 185 muestras clínicas previamente testeadas con un método de referencia y que es utilizado habitualmente para el diagnóstico de infección por virus SARS-CoV-2. Se ensayaron 113 muestras negativas y 72 positivas para SARS-CoV-2. En la tabla se muestra el resumen de los resultados obtenidos:

		Método de Referencia		
		Positivo	Negativo	TOTAL
WGene SARS-CoV-2 RT Detection	Positivo	72	0	72
	Negativo	0	113	113
	TOTAL	72	113	185

% concordancia +	100%
% concordancia -	100%

El producto **WGene SARS-CoV-2 RT Detection** presentó una concordancia del 100% con el método de referencia en las muestras analizadas.

PRESENTACION

- Kit para 100 determinaciones (Cód. 1060080)



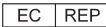













BIBLIOGRAFIA

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020, May 13th). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CDC. (2020, August 16th). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - Information for Laboratories: Real-Time RT-PCR Resources: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CDC. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS): <https://www.cdc.gov/sars/index.html>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.
- CLSI. Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID): <https://www.gisaid.org>, acceso 13 de mayo de 2020.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223):497e506.
- World Health Organization (WHO). Q&A on coronaviruses (COVID-19): <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses>. Revisado el 3 de Septiembre, 2020.


TaqMan y Light Cycler 480 son marcas registradas de Roche Molecular Systems, Inc.
StepOne Plus, Applied Biosystems 7500 y QuantStudio son marcas registradas de Applied Biosystems by Thermo Scientific.
CFX96 es marca registrada de Biorad
Mic es marca registrada de biomolecular systems
Rotor Gene Q es marca registrada de Qiagen.
Mastercycler RealPlex es marca registrada de Eppendorf

Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Cáustico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

Producto autorizado en el contexto a la emergencia sanitaria por COVID-19

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-211



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina