



COVID-19 NEOKIT

TECNOAMI

COVID-19 NEOKIT-TECNOAMI ES UN TEST DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR SIMPLIFICADA DEL VIRUS SARS-COV-2, AGENTE ETIOLÓGICO DE LA NEUMONÍA ATÍPICA O SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE COVID-19.

PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO INDUSTRIA ARGENTINA

Fecha de caducidad	REF. Número de catálogo	Referencias bibliográficas:
SN. Número de serie	STERILE A. Esterilizado usando técnicas asepticas	1- Informe SARS-CoV-2 de Sociedad Argentina de Virología, División de la asociación Argentina de Microbiología, 26 de Marzo 2020 (1-31)
STERILE. Producto sometido a un proceso de esterilización	Rango de temperatura	2-Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28 (12):E63
STERILE R. Esterilizado por radiación	Límite superior de temperatura	3-World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Situation dashboard.
IVD. Diagnóstico in vitro	Límite inferior de temperatura	World Health Organization website. https://who.sprinklr.com/ . Accessed 17 April, 2020.
Producto de uso exclusivo de evaluación de desempeño	CONTROL. Control	4- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Biotechniques 46(3):167–172
Consulte la instrucciones de uso	CONTROL+. Control positivo	5- Bhadra, S., Jiang, Y.S., Kumar, M.R., Johnson, R.F., Hensley, L.E., Ellington, A.D., 2015. Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). PLoS One 10, e0123126.
Riesgo biológico	CONTROL-. Control negativo	
No reutilizar	STERILEEO. Esterilizado con óxido de etileno	
LOT. Código de lote	STERILE L. Esterilizado por vapor de agua o calor seco	
Fecha de fabricación	Precaución	
Fabricante	Contenido suficiente para <n> ensayos	

DESCRIPCIÓN DEL PRINCIPIO DE ACCIÓN O APLICACIÓN DEL PRODUCTO:

El método de detección de COVID-19 se basa en la retrotranscripción del genoma del SARS-CoV-2 (ARN) seguida de una amplificación molecular específica de cuatro fragmentos del ADN resultante, a partir del ARN aislado de la muestra clínica (hisopado nasofaríngeo / orofaríngeo, saliva o esputo). La síntesis de un ADNc (retrotranscripción) seguida de la amplificación específica del fragmento (amplificación molecular isotérmica) ocurren a temperatura constante (64°C), en un único paso operativo. El resultado se revela a través de un simple cambio de color. En la mezcla de reacción se encuentra presente el Azul de hidroxinaftol (Hydroxynaphthol blue - HNB), un colorante indicador que vira de color violeta a color azul cuando la reacción de amplificación es positiva. Dicho viraje, se debe al cambio de concentración del Mg2+ libre en solución conforme disminuyen los dNTPs y aumenta el pirofosfato producto de la polimerización. El kit cuenta con cuatro juegos de cebadores (genes ORF 1Aa y 1Ab, E y N) que presentan 100% de homología con la secuencia de los genomas evaluados de SARS-Cov-2.

PARA REALIZAR EL TEST SON NECESARIOS Y NO SON PROVISTOS POR EL KIT LOS SIGUIENTES MATERIALES Y EQUIPOS:

- Micropipeta apta para 5 µl
- Tips con filtro para la micropipeta
- Gradillas para tubos de polipropileno (tipo eppendorf)
- Dispositivo térmico adecuado, que mantenga la temperatura estable a 64°C (termobloque para tubos de 0,5/0,6 ml, etc).
- Rotulador (o sistema de rotulación de tubos).

CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO:

Mantener el envase gotero (MIX Enzimas) siempre cerrado entre 2° y 8°C, protegido de la luz. Mantener los tubos para las determinaciones y los blancos de reacción cerrados, en un rango de temperatura entre 15 y 25°C, en la bolsa contenedora, en lugar seco y protegidos de la luz. Mantener los tubos de control positivo cerrados y aislados del resto, en su envase original, en un rango de temperatura entre 15 y 25°C, en la bolsa contenedora, en lugar seco y protegidos de la luz.

PRECAUCIONES DE USO Y ADVERTENCIAS:

1. La muestra para realizar el test COVID-19 NEOKIT-TECNOAMI debe ser ARN aislado a partir de muestras clínicas, mediante el uso de kit comercial de purificación / extracción por método de columna. Es conveniente procesar la muestra inmediatamente luego de purificada para evitar su degradación.
 2. El aislamiento de ARN a partir de las muestras clínicas (hisopado nasofaríngeo / orofaríngeo, saliva o esputo) debe ser realizado bajo normas de bioseguridad indicadas por la OPS / Organización Mundial de la Salud <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-provisionales-bioseguridad-laboratorio-para-manejo-transporte-muestras>.
 3. No usar el gotero o los tubos del COVID-19 NEOKIT-TECNOAMI si no han sido mantenidos en las condiciones de almacenamiento adecuadas.
 4. Considerando que la amplificación molecular isotérmica ocurre a temperatura constante de 64°C, es indispensable el uso de un termobloque cuyo diseño asegure el cumplimiento de dicho requisito.
 5. Deben mantenerse físicamente separadas dos áreas de trabajo para evitar potenciales contaminaciones cruzadas entre los componentes del kit y sucesivas reacciones de prueba:
- Área 1:** manipulación de reactivos, blanco, muestras y control positivo (en ese orden).
- Área 2:** incubación y lectura de resultados.
- El flujo de material es unidireccional. No intercambie material entre las áreas.**
6. Todos los tubos de reacción deben descartarse cerrados, en recipiente ubicado en el área 2.

EL COVID-19 NEOKIT - TECNOAMI ES UN TEST CONFORMADO POR LOS SIGUIENTES COMPONENTES:

Presentación por 100 determinaciones:

- 100 determinaciones
- 10 controles positivos
- 10 blancos

	Cantidad	Volumen
Gotero Mix Enzimas	1	5 ml
	Cantidad	
Tubos para determinaciones	100	
Tubos de control positivo	10	
Tubos para blanco de reacción	10	

Presentación por 200 determinaciones:

- 200 determinaciones
- 20 controles positivos
- 20 blancos

	Cantidad	Volumen
Gotero Mix Enzimas	2	5 ml
	Cantidad	
Tubos para determinaciones	200	
Tubos de control positivo	20	
Tubos para blanco de reacción	20	

ESPECIFICIDAD:

INCLUSIVIDAD: Este kit fue desarrollado para detectar COVID-19 y el diseño de sus cebadores se realizó mediante un análisis exhaustivo por comparación de las secuencias de SARS-CoV-2 (GenBank MN908947) proveniente de Wuhan, China y otras 10 secuencias más del virus obtenidas de GenBank, que corresponden a China, Japón y USA, que incluyen las secuencias de los virus circulantes en Argentina.

Se definió el uso de cuatro juegos de cebadores (**genes ORF 1Aa y 1Ab, E y N**) que presentan 100% de homología con la secuencia de los genomas evaluados de SARS-Cov-2.

EXCLUSIVIDAD: Se realizó un exhaustivo análisis in silico de comparación de secuencias, donde se incluyeron otros coronavirus: SARS (NC_004718.3), MERS (NC_019843.3), Bat-SARS (MG772846) y virus de diferente género: PDCoV (KX022605.1), TGEV (NC_038861.1) y PEDV(NC_003436.1). Además, se incluyeron los genomas de virus de concomitancia regional como Dengue (cuatro serotipos), Zika, Chikungunya, Influenza (H1N1), y genomas de potenciales contaminantes de la muestra, como levaduras, bacterias y humano.

A través de este estudio, se confirmó que las secuencias de los cebadores seleccionados en este kit son específicas e inequívocas para la detección de SARS-CoV-2, por lo que no se esperan reacciones cruzadas (falsos positivos) ni de interferencia (falsos negativos).

Asimismo, se realizaron ensayos de especificidad in vitro con múltiples genomas, incluyendo humano, de levaduras, bacterias y virus regionalmente concomitantes (Influenza, Dengue, Zika y Chikungunya), confirmando que el kit es específico para SARS-CoV-2.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA:

Para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica se analizaron 150 muestras obtenidas de la purificación del ARN de 100 muestras clínicas en las que se detectó presencia de SARS-CoV2 utilizando la metodología rt-PCR y 50 muestras en las que no se detectó presencia del virus con dicha metodología.

Las muestras se analizaron con COVID-19 NEOKIT Tecnoami obteniéndose una especificidad clínica del 100% y una sensibilidad clínica del 94%.

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN (SENSIBILIDAD ANALÍTICA) Y PRECISIÓN:

Se realizó la determinación del límite de detección y precisión con diluciones de la referencia de ARN purificado de SARS-CoV-2, con tres operarios en tres días diferentes. La reproducibilidad analítica (repetitividad) fue adecuada, obteniéndose con 12,5 copias de genoma viral un resultado positivo en el 100% de los casos ensayados.

Con una dilución al medio, 6,25 copias de genoma viral, los estudios funcionaron bien en la mayoría de los casos (80%), conservándose la proporcionalidad con diluciones menores.

Teniendo en cuenta los resultados de sensibilidad y de repetitividad, se estableció que el límite de sensibilidad del kit es 12,5 copias del genoma viral.

El método es preciso ya que todos los resultados por encima del límite de sensibilidad definido son coincidentes en el 100% de los casos.

LIMITACIONES DE USO:

El kit aporta un resultado cualitativo. Por lo tanto no está recomendado para el seguimiento del curso de la infección.

Los resultados deben ser evaluados e interpretados por un profesional de la salud en el contexto clínico y epidemiológico del paciente.

INTERFERENCIAS:

Datos experimentales y bibliográficos indican que no hay interferencias en los resultados obtenidos con el kit. Los principales contaminantes factibles de ser encontrados en las muestras, como células y ADN humano, levaduras (Saccharomyces cerevisiae) u otros microorganismos, no dan reacción cruzada con el kit.

PROCEDIMIENTO:
I. PREPARACIÓN:
I.1- Sacar el gotero de la heladera antes de usar y dejar templar a temperatura ambiente 15 minutos.
NO AGITAR para evitar la formación de burbujas y la desnaturalización de las enzimas.
I.2- Asegúrese de tener el dispositivo térmico estable a la temperatura de reacción (64°C) antes de comenzar el protocolo.
I.3- En el Área 1 disponer en una gradilla un tubo por cada muestra a analizar (“**Tubos para determinaciones**”), más un tubo identificado como “**BLANCO**”.
Rotular adecuadamente los tubos de cada una de las muestras.

IMPORTANTE: El **CONTROL POSITIVO** debe permanecer cerrado hasta que hayan sido preparados y cerrados el blanco y las muestras a ensayar.

II- PREPARACIÓN DEL BLANCO Y MUESTRAS:
Se recomienda manipular el tubo del BLANCO primero en la serie.
II.1- Destapar el tubo blanco. Sin tocar los bordes del tubo, colocar una gota (35 microlitros) del **Gotero Mix de Enzimas** en todos el tubo abierto asegurando que la misma no contenga burbujas. De preferir reemplazar la gota por un volumen equivalente, transfiera cantidad suficiente del gotero (sin sacar el pico dosificador) a un tubo limpio y seco, y pipetee con tip estéril los 35 microlitros de **Mix de Enzimas** en el tubo blanco y cerrarlo inmediatamente.
II.2- Repetir el paso **II.1** para cada tubo de determinación en forma independiente. Una vez utilizado el **Gotero Mix de Enzimas**, cerrarlo inmediatamente.
En caso de disponer una cabina UV-C puede realizar los pasos **II.1** y **II.2** en forma conjunta.
II.3- Resuspender suavemente el contenido de cada tubo de reacción y blanco. Debe verse color violeta/lila. Si no se observa dicho color debe descartarse el tubo y utilizar otro.
II.4- En cada tubo de determinación dispensar 5 µl de la muestra correspondiente de ARN purificado. Cerrar y homogeneizar suavemente.
Proseguir del mismo modo con la siguiente muestra, hasta completar el número de muestras que desea analizar.
II.5- Chequear que todos los tubos estén correctamente cargados y cerrados. Asegúrese que no han quedado gotas en las paredes o tapa del tubo.

III- PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO:
CHEQUEAR QUE TODOS LOS TUBOS (BLANCO Y DETERMINACIONES) ESTÁN CERRADOS ANTES DE ABRIR EL TUBO DEL CONTROL POSITIVO.
III.1- Abrir el tubo del **CONTROL POSITIVO**.
III.2- Sin tocar los bordes del tubo, colocar una gota (35 microlitros) del **Gotero Mix de Enzimas** asegurando que la misma no contenga burbujas. De preferir reemplazar la gota por un volumen equivalente, transfiera cantidad suficiente del gotero (sin sacar el pico dosificador) a un tubo limpio y seco, y pipetee con tip estéril los 35 microlitros de **Mix de Enzimas**. Cerrar inmediatamente el tubo.
III.3- Resuspender suavemente el contenido del tubo **CONTROL POSITIVO**. Debe verse color violeta / lila. Si no se observa dicho color debe descartarse el tubo y utilizar otro.

IV- INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REVELADO DE LA REACCIÓN:
IV.1- Trasladarse al Área 2.
IV.2- Homogeneizar suavemente todos los tubos, verificar que todo el volumen quede en la base del tubo, sin burbujas ni partículas. Verificar que la mezcla de reacción presente una coloración violeta. Chequear que todos los tubos permanecen correctamente cerrados.
IV.3- Disponer los tubos en dispositivo térmico equilibrado a 64°C.

NOTA: controlar que los tubos no se abran durante la incubación, y que la temperatura se mantenga constante durante todo el período incubado.

IV.4- Incubar la reacción por un período de tiempo de 60 minutos. Observar la coloración obtenida en cada tubo (sin interrumpir la incubación) y en aquellas muestras que presenten coloración correspondiente a un resultado negativo o indeterminado continuar la incubación 30 minutos más.

IV.5- Transcurrida la incubación, retirar los tubos del dispositivo térmico y dejar enfriar unos segundos.
Si observa condensación en la tapa o paredes del tubo, se recomienda dar un golpecito seco o un spin en microcentrífuga.

IV.6- Observar a simple vista:
Color VIOLETA/LILA = Negativo.
Color AZUL= Positivo.
Tomar una foto y registrar los resultados.
Todo cambio en la coloración de los tubos que ocurra pasados los 15 minutos de finalizada la incubación no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: Si la reacción da un resultado indeterminado, repetir el ensayo con 90 minutos de incubación.

IV.7- Descartar todos los tubos cerrados en Área 2. Limpiar y desinfectar adecuadamente con soluciones que eliminen ARN residual (solución alcalina de SDS o similar), las superficies y los materiales utilizados, particularmente aquellos que luego deban retornar al área 1 (por ejemplo, gradillas).
IV.8- Informe los resultados según protocolo de su institución.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:
Control Positivo: coloración AZUL.
Una coloración diferente invalida el ensayo. Debe repetirse el ensayo en su totalidad.
Blanco de reacción (control negativo): coloración VIOLETA / LILA.
Una coloración diferente invalida el ensayo. Debe repetirse el ensayo en su totalidad.
Tubos de determinaciones:
Coloración AZUL: Reacción positiva - indica presencia del agente infeccioso.
Coloración VIOLETA / LILA: Reacción negativa - indica ausencia de agente infeccioso.
Una coloración indefinida o diferente a la de los controles positivo y blanco de reacción (negativo) invalida el resultado de dicha muestra, siendo necesaria su repetición.

Este kit está diseñado como técnica cualitativa de presencia del virus SARS-CoV-2. La identificación de un resultado positivo constituye un evento de notificación obligatoria en el marco de la Ley 15.465 y deber ser notificado en forma inmediata y completa al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS).

CONTROL INTERNO DE CALIDAD
El kit está provisto por tubos de control positivo adecuadamente rotulados. Cada uno de estos tubos de control positivo contiene una secuencia molecular con identidad SARS-CoV-2 equivalente a 100 copias de genoma viral.
Además del control positivo, en cada medición el usuario debe incluir un tubo para el blanco de la reacción (o “control negativo”).
Los controles positivos y blancos son utilizados como controles internos de calidad del kit en cada medición que se realice.



NEOKIT S.A.S.
Saladillo 2452. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Teléfono: (011) 4105-4100.
DT: Farmacéutico, Sergio Pallotto.
Autorizado por el ANMAT. Registro N° PM 2576-01.

