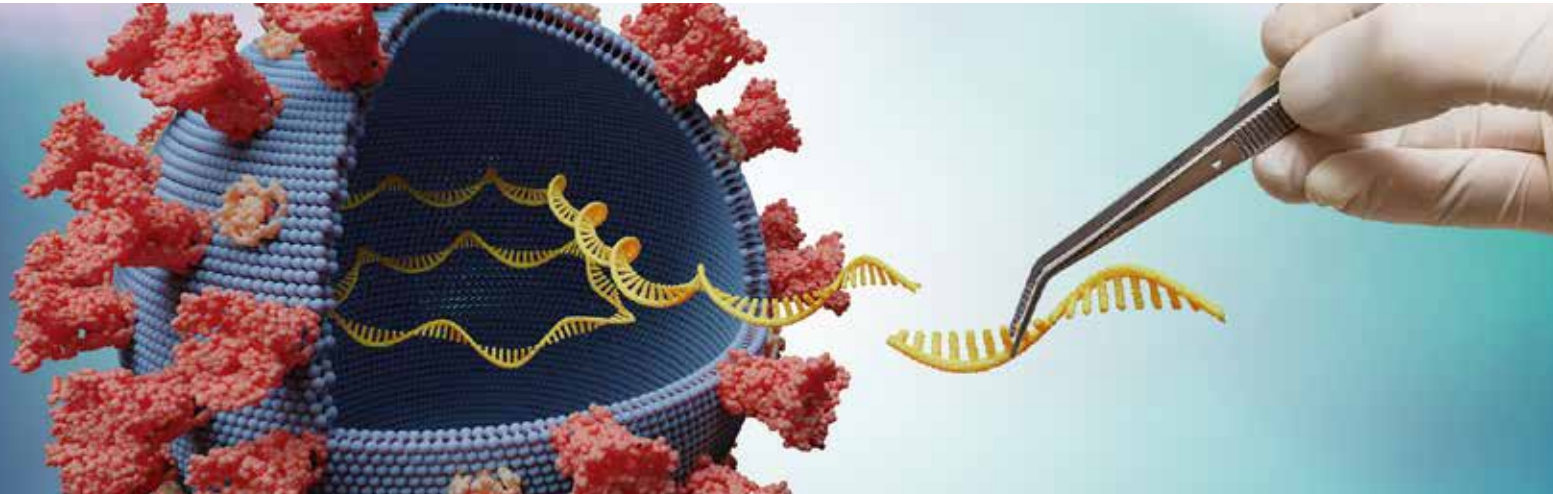




COVID-19 NEOKIT

TECNOAMI

100/200
DETERMINACIONES

**PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO
DE USO IN VITRO**

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
INDUSTRIA ARGENTINA

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.

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.

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.

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

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Micropipeta p10
- Tips con filtro para p10
- Gradillas para tubos de polipropileno (tipo eppendorf)
- Dispositivo térmico de cualquier tipo, que mantenga la temperatura adecuada y constante de 64°C (baño termostático, termobloque o baño de bloque en seco, estufa, etc.).
- Gradilla o soporte para disponer los tubos de reacción en el dispositivo térmico.
- Rotulador (o sistema de rotulación de tubos).
- Microcentrifuga de mesada.

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 degradación o bien almacenarla en un recipiente cerrado a la temperatura de conservación aconsejada (2 y 8°C a tiempos inferiores a 8 hs o -70°C por períodos más prolongados). Es indispensable evitar contaminación cruzada entre las muestras.

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. 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.

5. 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	1	10 ml
Cantidad		
Tubos para determinaciones	200	
Tubos de control positivo	20	
Tubos para blanco de reacción	20	

COMPOSICIÓN CUALI-CUANTITATIVA:

Gotero Mix Enzimas	Concentración por unidad
Tris-HCl pH 8.8	20 mM
Solución iónica con MgSO ₄	8 mM
dNTPs (mix equimolar por 4)	1.4 mM
Polisorbato	0.1 %
Bst I	320 U/ml
Warm Start RT Transcriptasa Reversa	300 U/ml
Betaina	c.s.p. saturación
KOH	c.s.p. pH 8.8
Agua	c.s.p.

*c.s.p.: "cantidad suficiente para"

Tubos para determinaciones	Contenido por unidad
Set de cebadores gen E	130 picomoles
Set de cebadores gen N	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Aa	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Ab	130 picomoles
HNB	c.s.p.

Tubos de control positivo	Contenido por unidad
Set de cebadores gen E	130 picomoles
Set de cebadores gen N	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Aa	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Ab	130 picomoles
HNB	c.s.p.
Secuencia con identidad con el SARS-CoV-2	Equivalente a 50 copias de genoma viral

Tubos para blanco	Contenido por unidad
Set de cebadores gen E	130 picomoles
Set de cebadores gen N	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Aa	130 picomoles
Set de cebadores ORF 1Ab	130 picomoles
HNB	c.s.p.

PROCEDIMIENTO

Uso del gotero MIX Enzimas:

- Sacar el gotero de la heladera antes de usar y dejar templar a temperatura ambiente 5 minutos
- Mezclar suavemente SIN AGITAR, antes de usar.

IMPORTANTE:

- Asegúrese de tener el dispositivo térmico estable a la temperatura de reacción (64°C) antes de comenzar el protocolo.
- El tubo del CONTROL POSITIVO se abre y manipula únicamente una vez que todos los tubos de blanco y muestras se encuentran preparados y cerrados.

I- DISPOSICIÓN DE LOS TUBOS DE REACCIÓN:

- I.1- En el Área 1 disponer en una gradilla un tubo por cada muestra a analizar (“Tubos para determinaciones”), más un tubo para el “BLANCO” y el tubo identificado como “CONTROL POSITIVO” todos provistos en el kit.
- I.2- Rotular adecuadamente los tubos de cada una de las muestras y el BLANCO.

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 los tubos de blanco y muestras a ensayar.
- II.2- Sin tocar los bordes de los tubos u otro elemento, colocar una gota del Gotero Mix de Enzimas en todos los tubos abiertos.
- Una vez utilizado el Gotero Mix de Enzimas, cerrarlo inmediatamente.
- II.3- Resuspender suavemente el contenido de cada tubo de reacción y blanco. Debe verse color violeta / lila.
- Si la mezcla se ve incolora o de cualquier otro color distinto de violeta / lila (por ejemplo azul o fucsia intenso) debe descartarse el tubo y utilizar otro tubo.
- II.4- Cerrar la tapa del tubo que rotuló como blanco
- II.5- Para cada determinación: dispensar en el tubo correspondiente 5 µl de muestra de ARN purificado. Cerrar el tubo.
- II.6- Proseguir del mismo modo con la siguiente muestra, hasta completar el número de muestras que desea analizar.
- II.7- Chequear que los tubos del blanco y de todas las muestras están correctamente cargados y cerrados.
- Se recomienda realizar un spin de 5 - 10 segundos, para asegurar 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 u otro elemento, colocar una gota del Gotero Mix de Enzimas. Cerrar inmediatamente el tubo.
- III.3- Resuspender suavemente el contenido del tubo CONTROL POSITIVO. Debe verse color violeta / lila.
- Si la mezcla se ve incolora o de cualquier otro color distinto de violeta / lila (por ejemplo, azul o fucsia intenso) debe descartarse el tubo y utilizar otro tubo.

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 presenta 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.
- 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, preferentemente, un spin en microcentrifuga.

- IV.6- Observar a simple vista:
color VIOLETA = Negativo
color AZUL= Positivo
Tomar una foto y registrar los resultados.

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, y limpiar y desinfectar muy bien 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.

	No reutilizar		Fecha de caducidad		Número de catálogo
	Código de lote		Número de serie		Esterilizado usando técnicas asépticas
	Fecha de fabricación		Producto sometido a un proceso de esterilización		Rango de temperatura
	Fabricante		Esterilizado por radiación		Límite superior de temperatura
	Esterilizado con óxido de etileno		Diagnóstico in vitro		Límite inferior de temperatura
	Esterilizado por vapor de agua o calor seco		Producto de uso exclusivo de evaluación de desempeño		Control
	Precaución		Consulte la instrucciones de uso		Control positivo
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Riesgo biológico		Control negativo

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 50 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.

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.

PRECISIÓN Y SENSIBILIDAD ANALÍTICA:

Se realizó un ensayo con una muestra de 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.

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.

Referencias bibliográficas:

- 1- Informe SARS-CoV-2 de Sociedad Argentina de Virología, División de la asociación Argentina de Microbiología, 26 de Marzo 2020 (1-31)
- 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
- 3- World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Situation dashboard. World Health Organization website. <https://who.sprinklr.com/>. Accessed 17 April, 2020.
- 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
- 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.

“ANTE CUALQUIER DUDA PUEDE COMUNICARSE A NEOKIT S.A.S. TE: (011) 4105-4100”

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

