



CoronARdx

INSTRUCCIONES DE USO

CoronAR Dx[®]
SARS-CoV-2 RT-PCR KIT
90 Tests





CONTENIDO:

01. Uso previsto.....	3
02. Principio del ensayo.....	3
03. Componentes del kit.....	4
3.1 Descripción de los componentes.....	4
04. Presentación del kit.....	5
05. Equipos, insumos y materiales requeridos no provistos.....	6
06. Manipulación y almacenamiento del Kit.....	7
07. Precauciones generales para el correcto uso.....	7
08. Preparación de la muestra.....	8
8.1 Extracción de muestra.....	8
8.2 Purificación de ARN.....	8
8.3 Preservación de las muestras.....	8
09. Procedimientos del ensayo.....	9
9.1 Preparación de la mix.....	9
9.2 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia.....	10
10. Analisis de datos.....	10
11. Interpretación de resultados.....	11
12. Limitaciones del procedimiento.....	12
13. Control interno de calidad.....	12
14. Solucion de problemas.....	12
15. Desempeño del producto.....	13
15.1 Desempeño analítico y clínico	13
15.2 Compatibilidad de termocicladores de PCR en Tiempo Real.....	17
16. Asistencia Técnica.....	17
17. Referencia de los simbolos.....	17
18. Referencias bibliograficas	18

1. USO PREVISTO

El kit CoronAR dx® está diseñado para la detección específica y cualitativa mediante la tecnología de PCR en Tiempo Real del SARS-CoV-2 responsable de la enfermedad COVID-19 en muestras humanas obtenidas mediante hisopado orofaríngeo y nasofaríngeo. El kit detecta dos diferentes regiones virales del SARS-CoV-2, una ubicada en el gen E y la otra en el gen RdRp.

Los resultados obtenidos mediante el kit CoronAR dx® son utilizados, junto con todos los datos clínicos y epidemiológicos disponibles, el historial del paciente y otros resultados de pruebas de laboratorio para el diagnóstico de COVID-19.

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (control interno) para identificar una posible inhibición de la RT-PCR, evaluar la calidad del ARN purificado y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

Este es un producto médico para diagnóstico de uso *in vitro* (IVD) destinado a profesionales específicamente capacitados en técnicas de biología molecular.

La identificación de casos sospechosos de COVID-19 constituye un evento de notificación obligatoria en el marco de la Ley 15465 y debe ser notificado en forma inmediata y completa al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS2.0) al Grupo de Eventos: Infecciones respiratorias agudas (IRAS), Evento Sospecha de Virus Emergente.

Dentro la Argentina la información a notificar debe ser recopilada de acuerdo a la Ficha de notificación, investigación epidemiológica y pedido de estudios de laboratorio ante caso sospechoso de COVID-19 disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/fichas>

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit CoronAR dx® es un sistema basado en la tecnología One-Step RT-PCR, es decir que combina en un solo paso la retrotranscripción de ARN para generar ADN complementario (ADNc) mediante la enzima Transcriptasa Reversa (RT) y una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias específicas y la hidrólisis de sondas específicas en Tiempo Real, a partir de ARN proveniente de muestras biológicas de origen respiratorio como hisopados orofaríngeo y/o nasofaríngeo.

Durante la reacción en cadena de la Taq polimerasa de ADN con la consecuente amplificación de las secuencias específicas, ocurre la hidrólisis de las sondas específicas, permitiendo finalmente la detección de los fragmentos amplificados de interés. Las sondas de hidrólisis son complementarias a las regiones de interés e hibridan al templado de ADN. Cada sonda de hidrólisis está marcada con un fluoróforo (FAM) en el extremo 5' y un quencher de fluorescencia (BHQ1)



en el extremo 3'. El quencher de fluorescencia impide, por proximidad, que el fluoróforo emita señal mientras forma parte del oligonucleótido de la sonda.

El kit detecta dos diferentes regiones virales del SARS-CoV-2, una ubicada en el gen E (gen de envoltura) y la otra en el gen RdRp (gen de la RNA-polimerasa-RNA dependiente). Además, incluye como control interno un ensayo de amplificación del gen humano RPP30, el cual sirve para:

- (1)** control de extracción permitiendo verificar la existencia de ARN suficiente para la retrotranscripción y amplificación,
- (2)** identificar una posible inhibición en dichas reacciones y
- (3)** verificar el correcto desempeño de los reactivos.

3. COMPONENTES DEL KIT

TUBO	CONTENIDO	NRO. DE VIALES	VOLUMEN μ L/VIAL
1	MasterMix	2	1700
2	OligoMix E	1	250
3	OligoMix RdRp	1	250
4	OligoMix RPP30	1	250
5	Control Pos	1	150
6	Control Int	1	100
7	ROX	1	340
8	H2O	1	1000

3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES

1- La **MasterMix** contiene las enzimas Transcriptasa Reversa (M-MLV) y Taq polimerasa de ADN en solución buffer de PCR, el cual contiene un colorante azul útil para garantizar la trazabilidad del test, sin interferir con la reacción. La M-MLV está modificada para tener muy baja actividad RNasaH y mejor estabilidad y actividad a altas temperaturas (50 a 55°C); esto posibilita que durante el paso de retrotranscripción la reacción sea más específica y además las altas temperaturas permiten desarmar eficientemente la estructura secundaria del ARN. La Taq polimerasa de ADN se encuentra inactivada gracias a la combinación con un anticuerpo monoclonal proporcionando el control denominada como "Hot-Start". A altas temperaturas el anticuerpo se desnatu-



realiza liberando la Taq polimerasa de ADN, permitiendo su activación únicamente cuando inicia la segunda fase de PCR en Tiempo Real.

2 - La OligoMix E contiene en solución *primers forward* y *reverse* que permiten amplificar el Gen E y una sonda que permite la detección de ARN específico del Gen E (*gen contenido en el genoma viral*).

3 - La OligoMix RdRp contiene en solución *primers forward* y *reverse* que permiten amplificar el Gen RdRp y una sonda que permite la detección de ARN específico del Gen RdRp (*gen contenido en el genoma viral*).

4 - La OligoMix RPP30 contiene en solución *primers forward* y *reverse* que permiten amplificar el ARN específico del Gen RPP30 que codifica para la Ribonucleasa P humana (RNasa-P), y una sonda que permite la detección de ARN específico del Gen RPP30.

5 - El Control Pos incluye dos segmentos de ADN sintético correspondientes a una parte de los Genes E y RdRp de SARS-CoV-2 (≈ 2.000 copias/ μl de cada ADN sintético). Permite controlar el funcionamiento de las reacciones de ambos genes.

6 - El Control Int incluye un segmento de ADN sintético (≈ 2.000 copias/ μl) correspondiente a una parte del Gen RPP30.

7 - El ROX es un colorante utilizado como señal de referencia para normalizar los resultados en aquellos equipos de PCR Real Time que lo requieran.

8 - El H2O es agua grado PCR para completar el volumen de cada reacción a $20\mu\text{l}$ y ser utilizada como control negativo.

4. PRESENTACIÓN DEL KIT

El contenido de cada kit es suficiente para realizar hasta 90 tests (muestras) más los controles correspondientes. Por cada muestra se realizan tres reacciones individuales, siendo una reacción por cada gen analizado (gen E, gen RdRp y gen RPP30).

Algunos equipos de Real Time emplean placas de multiwell de 96 pocillos. La cantidad máxima de tests realizable en una placa de 96 pocillos es de 30 tests (muestras) por placa; por lo tanto, un kit CoronAR dx® es suficiente para correr 3 placas de 96 completas donde se analizan 30 muestras por cada corrida. El formato de siembra en una placa multiwell de 96 pocillos es:

- **90 Reacciones correspondientes a las muestras:** 30 reacciones para el gen E, 30 reacciones para el gen RdRp y 30 reacciones para el gen RPP30;
- **3 Reacciones correspondientes a los controles positivos:** 1 reacción para el control positivo gen E, 1 reacción para el control positivo gen RdRp y 1 reacción para el control positivo gen RPP30; y



- **3 Reacciones correspondientes a los controles negativos:** 1 reacción para el control negativo gen E, 1 reacción para el control negativo gen RdRp y 1 reacción para el control negativo gen RPP30.

Algunos equipos de Real Time PCR emplean placas de 48 pocillos, por lo que el esquema de siembra es el siguiente:

- **42 Reacciones correspondientes a las muestras:** 14 reacciones para el gen E, 14 reacciones para el gen RdRp y 14 reacciones para el gen RPP30.
- **3 Reacciones correspondientes a los controles positivos:** 1 reacción para el control positivo gen E, 1 reacción para el control positivo gen RdRp y 1 reacción para el control positivo gen RPP30; y
- **3 Reacciones correspondientes a los controles negativos:** 1 reacción para el control negativo gen E, 1 reacción para el control negativo gen RdRp y 1 reacción para el control negativo gen RPP30.

En kit CoronAR dx® contiene reactivos suficientes para largar como máximo 6 corridas.

En raros casos, cuando el material de partida es escaso y por lo tanto el resultado es “No concluyente” es necesario repetir el ensayo utilizando un volumen mayor de ARN. Por tal motivo los reactivos del kit disponen de un exceso de volumen para poder realizar un máximo de 9 tests (muestras) en un volumen final de 25µl en lugar de los 20µl estándar. Esto permite que, aproximadamente un 10% de los tests puedan repetirse utilizando más volumen de ARN (*para más detalles ver tabla Sección “Interpretación de Resultados”*).

5. EQUIPOS, INSUMOS Y MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS

- Equipo de PCR real time
- Micropipetas calibradas (1-20 µl, 20-200 µl, 200-1.000 µl)
- Tips con filtro (RNase, DNase-free)
- Tubos de 1.5mL (RNase, DNase-free)
- Guantes descartables libres de talco
- Vórtex
- Tubos de PCR o placas multiplacas
- Microcentrífuga de mesada



6. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL KIT

- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C.
- Debe evitarse el descongelamiento y congelamiento reiterado de los reactivos. Se recomienda fraccionar los reactivos en cantidades apropiadas luego del descongelamiento inicial y almacenar entre -25 y -15 °C.
- Debe evitarse exponer a luz directa los tubos que contienen las OligoMix ya que contienen reactivos fluorescentes que son fotosensibles.
- Agitar y centrifugar los tubos antes de su apertura.
- Se recomienda trabajar en hielo durante la preparación de las mezclas para evitar exponer los componentes del kit a temperaturas inapropiadas que puedan afectar a la performance general del sistema.



PRECAUCIÓN:

Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con coronardx@cromoion.com

7. PRECAUCIONES GENERALES PARA EL CORRECTO USO

- Leer detenidamente las instrucciones antes de procesar las muestras.
- Este es un producto solamente para uso diagnóstico *in-vitro*.
- Descontaminar las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio (0,5% v/v) u otro desinfectante antes de procesar las muestras.
- Los ensayos deben realizarse en laboratorios de análisis clínicos con plataforma de biología molecular que cumplan estrictamente con las prácticas apropiadas de bioseguridad; el procesamiento 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. Para más información referirse a: <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-provisionales-bioseguridad-laboratorio-para-manejo-transporte-muestras>
- Utilizar la máxima precaución en el manejo de las muestras y considerarlas como si fueran potencialmente infecciosas en cada momento.
- Utilizar EPP (*Elementos de protección personal*) en cada momento durante el manejo de las muestras.
- Utilizar tips con filtro en cada momento y cambiar el tip después de cada uso.
- No reutilizar nunca los tips y/o tubos.
- Conservar durante su uso los reactivos del kit en hielo o gradilla térmica.



- No es recomendable mezclar reactivos provenientes de diferentes kits.
- Conservar los kits en lugar alejados de las muestras y/o productos de PCR.
- Utilizar micropipetas que hayan sido calibradas y garanticen una correcta dispensación de los reactivos.
- No modificar los reactivos y/o volúmenes para la preparación de los ensayos.
- No utilizar el kit luego de la fecha de vencimiento reportada en los rótulos.

8. PREPARACIÓN DE MUESTRA

La muestra de origen es ARN obtenido mediante algún método de extracción y purificación partiendo de muestras biológicas de origen respiratorio como hisopados orofaríngeo y nasofaríngeo.

8.1 EXTRACCIÓN DE MUESTRA

Muestra de hisopado nasofaríngeo: para recoger la muestra mediante hisopado nasofaríngeo, inserte suavemente el hisopo en la cavidad nasal hasta que encuentre resistencia a nivel del cornete nasal. Gire suavemente y retire el hisopo, asegurándose que la punta del hisopo esté mojada.

Muestra de hisopado orofaríngeo: para recoger la muestra mediante hisopado orofaríngeo, frote vigorosamente un hisopo estéril en ambas superficies de las amígdalas y la faringe posterior, evitando la lengua y retire el hisopo.

8.2 PURIFICACIÓN DE ARN

La calidad del ARN extraído afecta de forma significativa al rendimiento del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología PCR en tiempo real y también compatible con hisopos orofaríngeos y nasofaríngeos.



PRECAUCIÓN:

Si su sistema de extracción de ARN utiliza soluciones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

8.3 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Procese las muestras para purificación y detección de ARN lo antes posible. En el caso de no ser procesadas de inmediato, las muestras se pueden almacenar a 2-8°C durante 24 horas, o congelar a -70°C o menos para un almacenamiento más prolongado. Evite ciclos repetidos de congelamiento / descongelamiento durante el transporte y almacenamiento de las muestras.



9. PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

9.1. PREPARACIÓN DE LA MIX

Todos los reactivos del kit CoronARdx® deben descongelarse completamente, mezclarse mediante agitación suave y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El volumen final de cada reacción es de **20 µl**; en caso de que el equipo de PCR no requiera ROX, reemplazar ese volumen con Agua. En caso de repetir algunos tests en un volumen final de reacción de **25 µl** escalar proporcionalmente las cantidades de cada componente.

De acuerdo a la cantidad de muestras (N) que se van a correr, preparar el volumen de reacción suficiente para cada target, teniendo en cuenta adicionar volumen para 2 reacciones por los controles positivo/interno y negativo (N+2); además, hasta 15 muestras totales, sumar volumen extra para 1 muestra más (N+2+1); si se van a correr más de 15 muestras, el volumen de reacción extra sugerido es de 2 muestras (N+2+2).

En la tabla se indican a modo de ejemplo los volúmenes necesarios por cada componente de la mix, en el hipotético caso de una corrida que requiera testear 15 muestras de ARN.

REACTIVO	1X	GEN E (19X)	GEN RDRP (19X)	RPP30 (19X)
MasterMix	10µl	190µl	190µl	190µl
OligoMix	2.0µl	38µl	38µl	38µl
Rox (50X)*	0.4µl	7.6µl	7.6µl	7.6µl
H₂O	2.6µl	49.4µl	49.4µl	49.4µl

* En caso de que el equipo de PCR no requiera ROX, reemplazar ese volumen con Agua. Para el StepOne el volumen de ROX recomendado es de 1.0µl; por lo tanto, en este caso el volumen de Agua necesario será de 2.0 µl.

Finalmente fraccionar 15µl de volumen de cada mix y agregar 5µl del ARN correspondiente a cada muestra o 5µl de cada control sintético según corresponda. Mezclar con la pipeta tratando de evitar la formación de burbujas y luego centrifugar (*Spin*) los tubos o placa antes de largar la reacción (NO vortex).

En la figura de abajo se indican a modo de ejemplo la disposición de las muestras y controles en una placa de 96 pocillos de acuerdo al código de colores de cada tubo que se encuentra en el kit, en el hipotético caso de una corrida que requiera testear 15 muestras de ARN.



Gen E Muestra 1	Gen E Muestra 9	Gen E Muestra 17	Gen E Muestra 25	Gen RdRp Muestra 1	Gen RdRp Muestra 9	Gen RdRp Muestra 17	Gen RdRp Muestra 25	Gen RPP30 Muestra 1	Gen RPP30 Muestra 9	Gen RPP30 Muestra 17	Gen RPP30 Muestra 25
Gen E Muestra 2	Gen E Muestra 10	Gen E Muestra 18	Gen E Muestra 26	Gen RdRp Muestra 2	Gen RdRp Muestra 10	Gen RdRp Muestra 18	Gen RdRp Muestra 26	Gen RPP30 Muestra 2	Gen RPP30 Muestra 10	Gen RPP30 Muestra 18	Gen RPP30 Muestra 26
Gen E Muestra 3	Gen E Muestra 11	Gen E Muestra 19	Gen E Muestra 27	Gen RdRp Muestra 3	Gen RdRp Muestra 11	Gen RdRp Muestra 19	Gen RdRp Muestra 27	Gen RPP30 Muestra 3	Gen RPP30 Muestra 11	Gen RPP30 Muestra 19	Gen RPP30 Muestra 27
Gen E Muestra 4	Gen E Muestra 12	Gen E Muestra 20	Gen E Muestra 28	Gen RdRp Muestra 4	Gen RdRp Muestra 12	Gen RdRp Muestra 20	Gen RdRp Muestra 28	Gen RPP30 Muestra 4	Gen RPP30 Muestra 12	Gen RPP30 Muestra 20	Gen RPP30 Muestra 28
Gen E Muestra 5	Gen E Muestra 13	Gen E Muestra 21	Gen E Muestra 29	Gen RdRp Muestra 5	Gen RdRp Muestra 13	Gen RdRp Muestra 21	Gen RdRp Muestra 29	Gen RPP30 Muestra 5	Gen RPP30 Muestra 13	Gen RPP30 Muestra 21	Gen RPP30 Muestra 29
Gen E Muestra 6	Gen E Muestra 14	Gen E Muestra 22	Gen E Muestra 30	Gen RdRp Muestra 6	Gen RdRp Muestra 14	Gen RdRp Muestra 22	Gen RdRp Muestra 30	Gen RPP30 Muestra 6	Gen RPP30 Muestra 14	Gen RPP30 Muestra 22	Gen RPP30 Muestra 30
Gen E Muestra 7	Gen E Muestra 15	Gen E Muestra 23	Gen E Control Positivo	Gen RdRp Muestra 7	Gen RdRp Muestra 15	Gen RdRp Muestra 23	Gen RdRp Control Positivo	Gen RPP30 Muestra 7	Gen RPP30 Muestra 15	Gen RPP30 Muestra 23	Gen RPP30 Control Positivo
Gen E Muestra 8	Gen E Muestra 16	Gen E Muestra 24	Gen E Control Negativo	Gen RdRp Muestra 8	Gen RdRp Muestra 16	Gen RdRp Muestra 24	Gen RdRp Control Negativo	Gen RPP30 Muestra 8	Gen RPP30 Muestra 16	Gen RPP30 Muestra 24	Gen RPP30 Control Negativo

9.2. PERFIL DE TEMPERATURA Y DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO (MIN:SEG)
Transcripción reversa	1	50°C	10:00
Desnaturalización	1	95°C	05:00
Amplificación	45	95°C	00:15
		58°C	01:00

Setting de la fluorescencia: las 3 sondas TaqMan están marcadas con FAM (5' 6- FAM (Fluorescein), por lo tanto, el kit se puede correr en equipos con 1 solo canal de detección de la fluorescencia (Absorbancia Max: 495 nm; Emisión Max: 520 nm)

10. ANALISIS DE DATOS

- Durante el análisis es importante ajustar la escala del eje Y de acuerdo a la intensidad de la señal obtenida.
- Se recomienda visualizar las curvas en un gráfico semiLog para poder amplificar la fase exponencial y representarla como una línea recta; esto facilita la ubicación del umbral.
- En la tabla son reportados los rangos más representativos para la ubicación del umbral de las plataformas en las cuales se validó el kit CoronAR dx; sin embargo, siempre que sea posible, el umbral tiene que ubicarse en la región central de la fase exponencial de las curvas, no muy cerca del ruido de fondo ni tampoco del plateau.

**TABLA: RANGOS PARA DISTINTAS PLATAFORMAS**

Target	Umbral					Base Line**
	ABI7500	StepOne	RotorGene	COBAS	CFX96	
Gen E	0.1-0.5	2.0-3.0	0.02-0.1	Automático	250	3-15
Gen RdRp*	0.06-0.15	<1.0	<0.1	Automático	134	3-15
Gen RPP30	0.1-0.5	5.0-7.0	0.02-0.1	Automático	134	3-15

*El Umbral para RdRp tiene que ser ajustado cerca del límite inferior en aquellos casos que presenten un Ct>28 ciclos.

** Generalmente el *baseline* es seleccionado automáticamente por el software de análisis de los equipos, y en la mayoría de los casos no es necesario modificarlo (ciclos 3-15). Sin embargo, puede ocurrir que los controles negativos (NTC) y/o muestras negativas para algunos de los targets virales, muestren curvas con un perfil anómalo (la fluorescencia se dispara por encima de *background* promedio a partir de los primeros ciclos (<10) y se mantiene aplanada hasta el final); en estos casos es conveniente revisar y eventualmente modificar el intervalo del *baseline*.

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- **Los controles positivos**, de los genes E, RdRp y RPP30 deben amplificar en un $C_t \leq 32$ para validar la corrida.
- **El control negativo de agua por cada una de las OligoMix debería ser indetectable en cada caso**; es aceptable una amplificación inespecífica siempre y cuando el $C_t > 43$.

Gen E (Ct)	Gen RdRp (Ct)	Gen RPP30 (Ct)	Interpretación	Reporte	Acciones
≤ 37	≤ 40	≤ 35	SARS-CoV-2 detectado	Positivo para SARS CoV-2	Reportar el resultado
> 37	≤ 40	≤ 35	SARS-CoV-2 detectado	Positivo para SARS CoV-2	Reportar el resultado
≤ 37	> 40	≤ 35	SARS-CoV-1 detectado	Negativo para SARS CoV-2*	Reportar el resultado
> 45	> 45	≤ 35	Virus NO detectado	Negativo para SARS CoV-2	Reportar el resultado
$> 37 < 45$	$> 40 < 45$ o indetectable	≤ 35	Material escaso	No concluyente	Repetir RT-PCR con más cantidad de ARN
> 37	> 40	> 35	Resultado Invalido	Invalido	Repetir extracción de ARN y/o RT-PCR



*Seguimiento de pacientes con diagnóstico de COVID-19: teniendo en cuenta la elevada especificidad del Gen E (ver Sección 14, "Desempeño del producto"), sumado a evidencias de carácter bioquímico y biológico de que el Gen RdRp puede dar señal negativa (Ct>40) aun en presencia del virus, la sola positividad del gen E(Ct≤37) es suficiente para informar como positivo el diagnóstico de COVID-19; esto en particular puede ocurrir en los tests de monitoreo de pacientes con diagnóstico previamente confirmado de COVID-19.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El usuario de este kit tiene que ser un operador familiarizado con el uso de este tipo de tecnología.
- Cualquier resultado diagnóstico generado con este kit tiene que ser interpretado en conjunto con otros hallazgos clínicos y/o de laboratorio.
- El kit puede ser utilizado con ARN proveniente de muestras de hisopados orofaríngeo y/o nasofaríngeo.
- Los mejores resultados se obtienen con ARN recién extraído; congelar y descongelar las muestras de ARN pueden afectar a la sensibilidad del método y dar origen a falsos negativos.
- Un resultado negativo no descarta totalmente la posibilidad de infección.

13. CONTROL INTERNO DE CALIDAD

- El kit CoronAR dx contiene un control positivo y negativo para el Gen E y el Gen RdRp y un control interno que deben incluirse en cada corrida para interpretar correctamente los resultados.
- El control positivo es un ADN sintético correspondiente a una parte de los Genes E y RdRp de SARS-CoV-2 (≈2.000 copias/μl de cada ADN sintético) que permite controlar el correcto funcionamiento de las reacciones de ambos genes.
- El control interno es un ensayo de amplificación del gen humano RPP30, el cual sirve para: **(1)** Control de extracción permitiendo verificar la existencia de ARN suficiente para la retrotranscripción y la amplificación, **(2)** Identificar una posible inhibición en dichas reacciones y **(3)** Verificar el correcto desempeño de los reactivos.

14. SOLUCION DE PROBLEMAS

Problema	Posible Causa	Recomendación
<p>No se detecta señal fluorescente en ninguna muestra incluyendo los controles positivos</p> <p><i>(continúa en pág. 10)</i></p>	<p>Error en la preparación de la Mix</p>	<p>Verificar el volumen de los reactivos dispensados durante la preparación de la Mix.</p>
	<p>Agregado involuntario de inhibidores de la reacción de RT-PCR.</p>	<p>Purificar ulteriormente el RNA extraído o bien volver a extraer con nueva muestra teniendo particular cuidado en la purificación del ARN</p>



Problema	Posible Causa	Recomendación
<p>No se detecta señal fluorescente en ninguna muestra incluyendo los controles positivos</p> <p><i>(comienza en pág. 9)</i></p>	Degradación de la sonda.	Probar de nuevo con una nueva alícuota de la sonda y/o cambiar de Kit.
	Errores en el <i>setting</i> del equipo.	Verificar que el perfil de ciclado sea el correcto. Verificar que el <i>setting</i> de adquisición de la fluorescencia sea el adecuado
<p>Se detecta señal en los controles negativos</p>	Contaminación por arrastre	Tenga cuidado al dispensar muestras, controles negativos y controles positivos en la placa/tubos. Siempre cambie los <i>tips</i> entre una muestra y otra. Siempre utilice guantes.
	Error en microplaca/tubos	Tenga cuidado de no derramar el contenido del tubo o placa
	Tapón de tubo mal sellado	Tenga cuidado al sellar la tapa del tubo
	Contaminación de la Mix de amplificación.	Use una nueva alícuota de Mix de amplificación
	Contaminación del área de extracción / preparación para las reacciones de amplificación.	Limpie las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lave los ambos de laboratorio, reemplace los tubos de ensayo y los <i>tips</i> en uso.
<p>La intensidad de la fluorescencia es débil o no detectable solo en las muestras desconocidas</p>	Mala calidad de las muestras de ARN	Extraiga el ARN de las muestras nuevamente a partir de más cantidad y almacene el ARN extraído a -70 °C.
	No se agregó suficiente volumen de muestras de ARN	Repita la reacción de PCR usando mayor volumen de muestras de ARN

15. DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

15.1. DESEMPEÑO ANALÍTICO Y CLÍNICO



-Límite de detección (LOD)

Estos ensayos tienen como objetivo encontrar el Límite de detección (LOD) en un rango dinámico de diluciones del ARN viral en una matriz biológica relevante de ARN total de donantes sanos. A este propósito utilizamos 2 diferentes estándares de ARN viral: ARN viral estándar provisto por ANLIS-Malbrán (4×10^6 copias/ μ l Gen E – 3×10^5 copias/ μ l Gen RdRp) proveniente de un paciente con Covid-19 (amplificado en la línea celular Vero), y ARN sintético estándar del ATCC (VR-3276-SD) (1.45×10^5 copias/ μ l GenE – 1.7×10^5 copias/ μ l Gen RdRp). El número de copias absoluto de cada gen fue reconfirmado en nuestro centro mediante PCR digital (QX200 ddPCR, BioRad)

El ensayo mostró un LOD 15 copias/ μ l para el gen E y de 71 copias/ μ l del gen RdRp en una matriz biológica de hisopado naso u orofaríngeo.

-Sensibilidad y Especificidad Diagnóstica

Estos ensayos tienen el objetivo de determinar la proporción de resultados positivos correctamente identificados por el test en muestras clínicas (sensibilidad), así como la proporción de resultados negativos correctamente identificados por el test en muestras clínicas (especificidad). A los efectos de establecer estos valores se realizaron diferentes pruebas con muestras clínicas tanto enviando el Kit a centros de diagnóstico para Covid-19 reconocidos a nivel nacional (Hospital Italiano de Buenos Aires y el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, INBIRS) así como mediante intercambio de muestras de ARN diagnosticadas como positivas o negativas para SARS-CoV-2 con la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS Malbrán).

En total se analizaron 326 muestras, de las cuales 185 fueron diagnosticadas como SARS-COV-2 positivas y 141 como SARS-COV-2 negativas con un kit IVD utilizado como referencia, mientras que al ser evaluadas con el kit CoronAR dx, 182 muestras fueron identificadas como positivas y 144 como negativas.

En función de los datos obtenidos los parámetros del kit CoronARdx son:

- Sensibilidad: 98.4%
- Especificidad: 100%
- Exactitud: 99.1%
- Valor Predictivo Positivo: 100%
- Valor Predictivo Negativo: 97.9%

-Especificidad Analítica: reacción cruzada

Ensayos in silico

La Reactividad Analítica se evaluó mediante un análisis “in silico” para calcular el porcentaje de homología entre los targets de diagnóstico para SARS-CoV-2; los primers y sondas del gen E y

del gen RdRp versus toda la base de datos de BLASTn (NCBI) filtrando solamente Beta-Coronavirus. Para esto se realizaron 7 queries con los cuales se probó si las secuencias de los oligonucleótidos generaban scores confiables de homología (en la tabla se muestran los E-values y % de identidad)

SARS-CoV-2 (MN908947.3)			SARS-CoV Pangolin (MT072865.1)			SARS-CoV Murcielago (MN996532.1)			MERS-CoV (NC_019843.3)			Human Coronavirus OC43 (AY391777.1)			Human Coronavirus HKU-1 (NC_006577.2)		
Oligo	E Value	% Identity	Oligo	E Value	% Identity	Oligo	E Value	% Identity	Oligo	E Value	% Identity	Oligo	E Value	% Identity	Oligo	E Value	% Identity
E_F	4e-07	100	E_F	4e-07	100	E_F	4e-07	100	E_F	90	100	E_F	356	100	E_F	986	100
E_R	7e-05	100	E_R	7e-05	100	E_R	7e-05	100	E_R	986	100	E_R	986	100	E_R	986	100
E_P1	4e-07	100	E_P1	4e-07	100	E_P1	4e-07	100	E_P1	356	100	E_P1	S.I.	S.I.	E_P1	S.I.	S.I.
RdRP-F	5e-04	95.45	RdRP-F	5e-04	95.45	RdRP-F	5e-04	95.45	RdRP-F	158	100	RdRP-F	650	100	RdRP-F	38	86.36
RdRP-R	4e-07	100	RdRP-R	0.024	92.31	RdRP-R	1e-04	96.15	RdRP-R	0.094	92	RdRP-R	356	100	RdRP-R	356	100
RdRP-P2	2e-06	100	RdRP-P2	23	88	RdRP-P2	2e-06	100	RdRP-P2	356	100	RdRP-P2	S.I.	S.I.	RdRP-P2	S.I.	S.I.

Ensayos in vitro

El ensayo tiene como objetivo descartar la posibilidad de reacción cruzada con el genoma de otros patógenos de las vías respiratorias de origen viral y/o bacteriano para el kit CoronAR dx. El valor de especificidad fue del 100% para los genes testeados con 2 paneles de virus respiratorios (NATrol™ Respiratory Verification Panel, Zeptomatrix, Cat. Number: NATRVP-IDI; y QC Sets and Panels Respiratory Control, Helix Elite™ Catalog No. 8217)

Todos los puntos no dieron señal con ninguno de los genes que se testearon, demostrando que el kit CoronAR dx no tienen reacción cruzada con ningún otro virus respiratorio evaluado.

Zeptomatrix (NATRVP-IDI)	Gen E	Gen RdRp	Gen RPP30	Helix Elite (No. 8217)	Gen E	Gen RdRp	Gen RPP30
Influenza A H1N1	ND	ND	ND	Adenovirus Type 6	ND	ND	ND
Influenza A H3	ND	ND	ND	Bordetella Pertussis	ND	ND	ND
Influenza A 2009 H1N1	ND	ND	ND	Adenovirus Type 6	ND	ND	ND
Influenza B	ND	ND	ND	Chlamydia pneumoniae	ND	ND	ND



Zeptomatrix (NATRV-IDI)	Gen E	Gen RdRp	Gen RPP30	Helix Elite (No. 8217)	Gen E	Gen RdRp	Gen RPP30
Metapneumovirus	ND	ND	ND	Coronavirus229E	ND	ND	ND
Respiratory Syncytial Virus A	ND	ND	ND	Recombinant Coronavirus HKU1	ND	ND	ND
Rhinovirus 1 ^a	ND	ND	ND	Recombinant Coronavirus NL63	ND	ND	ND
Parainfluenza virus	ND	ND	ND	Recombinant Coronavirus OC43 Strain 1 and Recombinant Coronavirus OC43 Strain 2	ND	ND	ND
Type 1	ND	ND	ND	Recombinant Human Metapneumovirus	ND	ND	ND
Parainfluenza virus Type 2	ND	ND	ND	Human Rhinovirus	ND	ND	ND
Parainfluenza virus Type 3	ND	ND	ND	Influenza A	ND	ND	ND
Parainfluenza virus Type 4	ND	ND	ND	Influenza A subtype H1	ND	ND	ND
Adenovirus Type 3	ND	ND	ND	Influenza A subtype H1-2009	ND	ND	ND
Coronavirus NL63	ND	ND	ND	Influenza A subtype H3	ND	ND	ND
Coronavirus 229E	ND	ND	ND	Influenza B	ND	ND	ND
Coronavirus OC43	ND	ND	ND	Mycoplasma pneumoniae	ND	ND	ND
Coronavirus HKU-1	ND	ND	ND	Parainfluenza Virus 1	ND	ND	ND
M.pneumoniae M129	ND	ND	ND	Parainfluenza Virus 2	ND	ND	ND
C.pneumoniae CWL- ND 029	ND	ND	ND	Parainfluenza Virus 3	ND	ND	ND
B.pertussis A639	ND	ND	ND	Recombinant Parainfluenza Virus 4a	ND	ND	ND
Negative	ND	ND	ND	Respiratory Syncytial Virus	ND	ND	ND



15.2. COMPATIBILIDAD DE TERMOCICLADORES DE PCR EN TIEMPO REAL

El kit es compatible con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P^{ISM} QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- StepOne (Applied Biosystems)
- Cobas Z480 (Roche)
- CFX96^{ISM} Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96^{ISM} Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96^{ISM} Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96^{ISM} Dx System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

16. ASISTENCIA TÉCNICA

Para soporte técnico contactarse a coronardx@cromoion.com

Para consultar la versión vigente del Manual visite la página www.coronardx.com/manual

17. REFERENCIA DE LOS SIMBOLOS

Los símbolos utilizados en este manual y en los rótulos del producto corresponden a las siguientes referencias:

Símbolo	Utilizado para
	Producto para diagnóstico de uso <i>in vitro</i>
	Número de lote
	Número de catálogo
	Consultar instrucciones de uso/manual de instrucciones
	Contiene suficiente para <n> unidades de análisis
	Condiciones de conservación. Rango de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Advertencia, consultar documentación anexa.
	Establecimiento Elaborador



18. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19 30 de marzo de 2020 (PAHO).
- Disposición ANMAT 4043/05 Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/ProductosMedicos/Disposicion_ANMAT_4043-2005.pdf - Acceso Junio 2020
- Disposición ANMAT 2674/99 Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/ProductosMedicos/Disposicion_ANMAT_2674-1999.pdf - Acceso Junio 2020
- World Health Organization. Emergencies diseases novel coronavirus 2019 Disponible: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> - Acceso Mayo 2020.
- World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019- nCoV in humans Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> - Acceso Mayo 2020
- Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501> - Acceso Mayo 2020



CROMOION SRL

Roca 1259. Punta Alta.

Provincia de Buenos Aires

Argentina