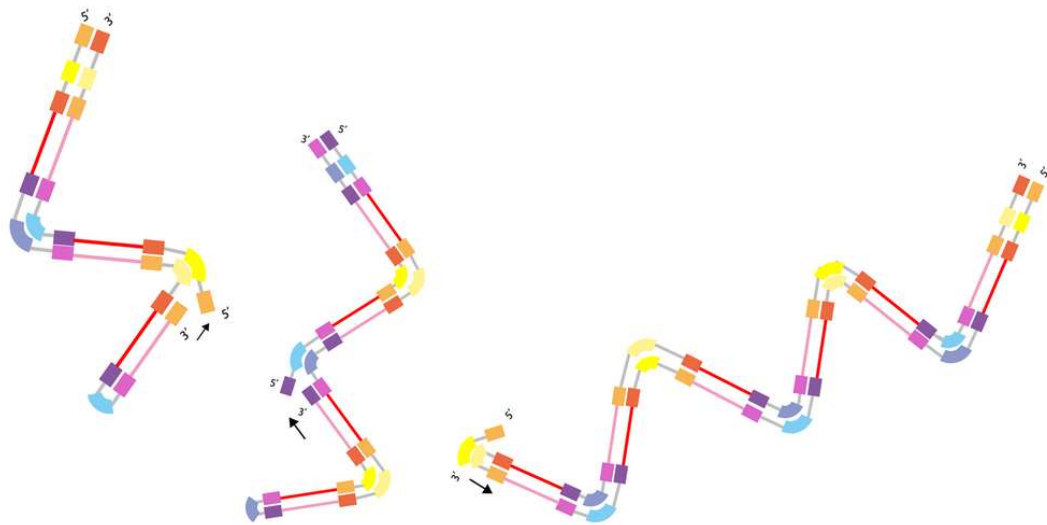


SARS-CoV-2 por RT-LAMP

Para detección cualitativa del virus SARS-CoV-2 por
RT-LAMP



Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.

Almacenamiento a -20 °C.

Tabla de contenido

1.	Uso deseado	3
2.	Resumen	3
2.	Principio de la prueba	3
3.	Reactivos y materiales suministrados	4
5.	Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados	4
6.	Manejo de muestras	4
7.	Almacenamiento y estabilidad del kit	4
8.	Preparación de reactivos suministrados	5
9.	Procedimiento del ensayo	6
10.	Resultados esperados	7
11.	Control de calidad	7
12.	Precauciones del procedimiento	7
13.	Características de desempeño	8
14.	Precauciones y seguridad	9
15.	Resumen del procedimiento de la prueba	10
16.	Resolución de problemas	11
17.	Referencias	12
18.	Fecha de emisión	12
19.	Simbología utilizada	13

Este kit es fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.

1. Uso deseado

El kit para detección del virus SARS-CoV-2 por RT-LAMP es una prueba cualitativa para la detección molecular simplificada del virus SARS-CoV-2 agente etiológico del Síndrome Respiratorio Agudo Grave de COVID-19, mediante amplificación isotérmica mediada por bucles acoplada con transcripción inversa (RT-LAMP), en muestras de hisopado nasofaríngeo/ nasal /orofaríngeo, esputo y saliva con o sin purificación de ARN.

"Solo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico".

2. Resumen

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una pandemia en curso causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). El primer caso conocido de COVID-19 se identificó en diciembre de 2019 y el SARS-CoV-2 ahora se ha extendido por todo el mundo al menos a 188 países [1].

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto con un genoma de ARN de cadena positiva, del género betacoronavirus. Para su diagnóstico molecular se tienen como genes diana el ORF 1a, N, E, RdRP y S. Esto se realiza empleando un molde de ARN proveniente de una muestra nasofaríngea, orofaríngea, nasal o saliva para después, someterla a una reacción de RT-LAMP de un solo paso, finalmente se puede visualizar el resultado por la presencia de fluorescencia en muestras positivas [2,3].

2. Principio de la prueba

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 de ARN proveniente de la muestra clínica (hisopado nasofaríngeo / orofaríngeo / saliva o esputo) [4].

La amplificación isotérmica mediada en lazo (LAMP, por sus siglas en inglés) es una prueba molecular, cuyo método se basa en la amplificación del ácido nucleico empleando una ADN polimerasa y un conjunto de seis cebadores por cada gen que reconocen secuencias distintas del ADN viral en condiciones isotérmicas. Actualmente, es posible combinar la prueba LAMP y la transcripción inversa en una sola reacción (RT-LAMP) [5,6,7].

La síntesis de ADNc (transcripción inversa) seguida de la amplificación específica del fragmento (amplificación molecular isotérmica) ocurren a una temperatura constante (65°C), en un único paso operativo. El resultado se revela con un cambio de color de rosa a amarillo por un indicador de pH.

Este sistema proporciona una detección visual rápida y clara de la amplificación basada en la producción de protones y la posterior caída del pH que se produce por la extensa actividad de la ADN polimerasa en una reacción LAMP. La disminución del pH produce un cambio en el color de la solución de rosa a amarillo. El tiempo total del protocolo es de 25 minutos y solo requiere un simple dispositivo de calentamiento que puede alcanzar los 65 °C [8].

Una detección positiva de la secuencia de ARN del SARS-CoV-2 estaría indicada por un color amarillo (se produjo amplificación, se liberaron protones, cambio de color dependiente del pH de rosa a amarillo), mientras que un resultado negativo estaría indicado por un color rosa (no se produjo amplificación, no se liberaron protones, no hay cambio de pH, no hubo cambio de color) [9].

3. Reactivos y materiales suministrados

Reactivos y materiales del kit	No. de contenedores/ unidades	Cantidad/unidades
Agua grado biología molecular (libre de nucleasas)	1 tubo	1 mL
Mix individual de reacción RT-LAMP	5 tiras/40 microtubos ^[1]	40 reacciones
Control positivo SARS-CoV-2	1 tubo	20 µL
Control negativo SARS-CoV-2	1 tubo	50 µL
Primer mix SARS-CoV-2	1 tubo	100 µL
Primer mix gen Actina	1 tubo	50 µL
Buffer LAMP	1 frasco	15 mL
Estabilizador de muestra A	1 tubo	400 µL
Estabilizador de muestra B	1 tubo	400 µL

[1] Las tiras de microtubos se pueden usar por separado. Coloque los microtubos no utilizados en la bolsa de almacenamiento plástica sellable y almacene a -20 °C +/- 5°C. Una vez abierto, su estabilidad se mantiene hasta por 6 meses a -20 °C +/- 5°C

5. Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados

- Guantes de látex o nitrilo desechables
- Micropipetas
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Microcentrífuga
- Puntas con filtro para micropipeta
- Kit de purificación de RNA viral
- Vórtex
- Enfriador para tubos de PCR

6. Manejo de muestras

- Todas las muestras deben ser manipuladas como si contuvieran agentes infecciosos. Observe las precauciones establecidas contra riesgos microbiológicos antes de realizar la prueba y siga los procedimientos estándar para la eliminación adecuada de las muestras.
- Las muestras de hisopado nasofaríngeo y nasal a las que no se les realice purificación de ARN, pueden ser recolectadas en 300 a 500 µL de solución salina, o bien en seco (sin la adición de algún buffer).
- Las muestras de hisopado nasofaríngeo / nasal /orofaríngeo, saliva y esputo recolectadas en buffer LAMP pueden almacenarse en un rango de temperatura de 2 a 8 °C hasta por 7 días. La reacción de RT-LAMP de un solo paso debe realizarse lo más pronto posible.
- Para realizar la manipulación de muestras se requiere de los mecanismos y métodos apropiados de bioseguridad para la prevención y el control del riesgo biológico.
- Si se hace purificación de ARN de la muestra (hisopado nasofaríngeo / nasal /orofaríngeo, saliva y esputo), el ARN purificado debe ser almacenado de -20 °C a -80 °C hasta su uso, dependiendo de las instrucciones indicadas por el kit de purificación empleado.

7. Almacenamiento y estabilidad del kit

El kit debe almacenarse a -20 °C a su recepción, en su caja, evitando exposiciones de luz. El mix de reacción es fotosensible, por lo que deberá evitar el contacto con la luz hasta su uso. Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso. Se deben conservar los tubos con mix de reacción no utilizados y devolverlos a su empaque hasta su uso. Para asegurar el máximo rendimiento, proteja los reactivos de la contaminación con microorganismos o productos químicos durante el almacenamiento, además de evitar procesos de congelación y descongelación continuos.

8. Preparación de reactivos suministrados

Los reactivos se proporcionan listos para utilizarse. En la **tabla 1** se proporcionan las condiciones experimentales y de control de calidad para una corrida de RT-LAMP.

- Poner a temperatura ambiente los reactivos proporcionados por 5 minutos antes de abrir el empaque
- No utilizar los mix de reacción si no han sido almacenados a una temperatura adecuada (congelación).
- Se recomienda hacer alícuotas de los reactivos para evitar procesos continuos de descongelación y degradación, (primers y buffer LAMP). El buffer LAMP debe mantener un pH entre 8 y 9.5 para ser funcional.
- Proteger de la luz los tubos con el mix de reacción hasta su uso. Los mix de reacción deben tener un color de rojo a rosa para su uso adecuado.

9. Procedimiento del ensayo

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante al menos 10 minutos, antes de usar.

usar.

Número de paso	Actividad																																																												
Paso 1: Preparación de la muestra	• Hisopado nasofaríngeo / orofaríngeo / nasa/ saliva I 1. Agregar 400 µL de buffer LAMP y homogenizar por vórtex.																																																												
Paso 2: Preparación de mezcla de reacción	2. Preparar el mix de reacción de RT-LAMP de acuerdo con la Tabla 1 . Se recomienda incluir un control positivo, un control negativo, la muestra por duplicado y un control interno por cada muestra, en cada corrida.																																																												
	Tabla 1. Condiciones experimentales																																																												
	<table><tr><th></th><th>Control positivo</th><th>Control negativo</th><th>Muestra con pretratamiento (paso 1)</th><th>Control interno, muestra con pretratamiento (paso 1)</th><th>Muestra de ARN purificado</th></tr><tr><th>Componente</th><th>Cantidad (µL)</th><th>Cantidad (µL)</th><th>Cantidad (µL)</th><th>Cantidad (µL)</th><th>Cantidad (µL)</th></tr><tr><td>Agua libre de nucleasas</td><td>12.0</td><td>12.0</td><td>9.5</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr><tr><td>Mix de reacción RT-LAMP</td><td>5 (1 tubo)</td><td>5 (1 tubo)</td><td>5 (1 tubo)</td><td>5 (1 tubo)</td><td>5 (1 tubo)</td></tr><tr><td>Primers mix 10X SARS-CoV-2</td><td>2.5</td><td>2.5</td><td>2.5</td><td>-</td><td>2.5</td></tr><tr><td>Primers mix 10X Actina LAMP (Control interno)</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>2.5</td><td>-</td></tr><tr><td>Muestra preparada</td><td>-</td><td>-</td><td>5</td><td>5</td><td>-</td></tr><tr><td>Muestra de ARN</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>5</td></tr><tr><td>Control Positivo SARS-CoV-2</td><td>2.5</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>Control Negativo SARS-CoV-2</td><td>-</td><td>2.5</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>		Control positivo	Control negativo	Muestra con pretratamiento (paso 1)	Control interno, muestra con pretratamiento (paso 1)	Muestra de ARN purificado	Componente	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Agua libre de nucleasas	12.0	12.0	9.5	9.5	9.5	Mix de reacción RT-LAMP	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	Primers mix 10X SARS-CoV-2	2.5	2.5	2.5	-	2.5	Primers mix 10X Actina LAMP (Control interno)	-	-	-	2.5	-	Muestra preparada	-	-	5	5	-	Muestra de ARN	-	-	-	-	5	Control Positivo SARS-CoV-2	2.5	-	-	-	-	Control Negativo SARS-CoV-2	-	2.5	-	-	-
		Control positivo	Control negativo	Muestra con pretratamiento (paso 1)	Control interno, muestra con pretratamiento (paso 1)	Muestra de ARN purificado																																																							
	Componente	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)																																																							
	Agua libre de nucleasas	12.0	12.0	9.5	9.5	9.5																																																							
	Mix de reacción RT-LAMP	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)	5 (1 tubo)																																																							
	Primers mix 10X SARS-CoV-2	2.5	2.5	2.5	-	2.5																																																							
	Primers mix 10X Actina LAMP (Control interno)	-	-	-	2.5	-																																																							
	Muestra preparada	-	-	5	5	-																																																							
Muestra de ARN	-	-	-	-	5																																																								
Control Positivo SARS-CoV-2	2.5	-	-	-	-																																																								
Control Negativo SARS-CoV-2	-	2.5	-	-	-																																																								
Volumen final de reacción: 22 µL																																																													
Paso 3: Reacción RT-LAMP	3. Incubar los microtubos en un termobloque / Baño seco / Baño maría a 65 °C de 25 - 30 minutos. 4. Enfriar inmediatamente después de la incubación en un baño de hielo. En caso de utilizar termociclador programar 65 °C por 30 minutos y enfriar a 4 °C.																																																												
Paso 4: Revelado	5. Visualizar los resultados, el cambio de color de rosa a amarillo es indicador de un resultado POSITIVO, si la reacción se conserva rosa es indicador de un resultado NEGATIVO.																																																												

10. Resultados esperados

Los controles positivos y negativos deberán cumplir con los resultados esperados, de lo contrario se invalidará el ensayo. Se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras de control en el ensayo.

Muestra	Indicador
Control NEGATIVO	Rosa
Control POSITIVO	Amarillo
Muestras de pacientes POSITIVOS a SARS-CoV-2	Amarillo
Muestras de pacientes NEGATIVOS a SARS-CoV-2	Rosa
Control interno	Amarillo

11. Control de calidad

- Cada ensayo debe considerarse por separado al interpretar los resultados.
- En caso de que los controles positivo y negativo no den los resultados esperados, se deberá repetir el ensayo, con previa verificación individual de los controles verificando su integridad y descartar presencia de contaminación por manipulación (Ver tabla de resolución de problemas / Apartado 16).
- Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad. Se recomienda que cada laboratorio establezca un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra analizada.

12. Precauciones del procedimiento

A continuación, se mencionan las precauciones del procedimiento:

- No haber ingerido alimentos, bebidas con alto contenido calórico o colorantes artificiales en el transcurso de las dos horas anteriores a la toma de muestra.
- No haber realizado lavado bucal con enjuagues o cepillado en las últimas dos horas antes de la toma de muestra.
- La presencia de azida de sodio en la muestra afecta los resultados del ensayo. La azida de sodio no se debe utilizar como conservador de muestras.
- Considerando que la reacción molecular isotérmica ocurre a una temperatura constante de 65 °C, es indispensable contar con un instrumento que pueda asegurar esta condición.
- Evitar el uso de agua libre de nucleasas tratada con DEPC.

13. Características de desempeño

Reactividad cruzada

La reactividad cruzada del kit para la detección de SARS-CoV-2 por RT-LAMP se evaluó por duplicado para distintos microorganismos enumerados en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Reactividad cruzada

Sin reactividad cruzada	Sin reactividad cruzada
Influenza A H1N1 (A/ NewCaledonia/20/99)	Adenovirus tipo 3
Influenza A H3 (A/Brisbane/10/07)	Coronavirus NL63
Influenza A 2009 H1N1pdm (A/NY/02/09)	Coronavirus 229E
Influenza B (B/Florida/02/06)	Coronavirus OC43
Metapneumovirus 8 (Peru6-2003)	Coronavirus HKU-1
Virus sincitial respiratorio A	M. pneumoniae (M129)
Rhinovirus 1 ^a	C. pneumoniae (CWL-029)
Virus Parainfluenza tipo 1	B. pertussis (A639)
Virus Parainfluenza tipo 2	Adenovirus tipo 31
Virus Parainfluenza tipo 3	Adenovirus tipo 1
Virus Parainfluenza tipo 4	B. parapertussis (A747)

Ninguno de los genomas de los microorganismos enumerados reaccionó de forma cruzada con el kit para la detección cualitativa del SARS-CoV-2 por RT-LAMP y por lo tanto no se generan resultados falsos positivos.

- Sensibilidad y Especificidad:**

El kit para detección del virus SARS-CoV-2 ha sido analizado utilizando muestras negativas extraídas de las membranas mucosas, faríngeas y saliva, las cuales no presentan amplificación de ningún tipo contra RNA obtenido de estas muestras ni de su correspondiente flora bacteriana.

El kit puede detectar de forma confiable y reproducible el virus SARS-CoV-2 dentro de la primera semana de infección, incluso antes de presentarse síntomas. Su sensibilidad abarca a partir de 250 copias del genoma viral en muestras purificadas dependiendo del estado de la muestra, carga viral al momento de la toma de la misma y RNA total purificado.

La especificidad se garantiza mediante la selección exhaustiva de los primers, los cuales se validaron mediante un análisis comparativo con secuencias públicas disponibles. Se aseguró la detección de distintos genotipos de SARS-CoV-2.

Se hizo la determinación con 10 muestras de ARN positivas para SARS-CoV-2 y 15 muestras de ARN negativas obtenidas de muestras nasofaríngeas, las cuáles fueron previamente confirmadas por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). Obteniendo los siguientes resultados:

Método		qRT-PCR		Total
SARS-CoV-2 por RT-LAMP	RESULTADO	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Positivo (+)	9	1	10
	Negativo (-)	0	15	15
Resultados totales		9	16	25

Sensibilidad Relativa: 100% (95% CI *: 86.68% ~ 100%)

Especificidad Relativa: 93.75% (95% CI *: 77.34% ~ 100%)

Precisión Global: 96.0% (95% CI *: 80.46% ~ 100%)

*Intervalo de Confianza

Se analizaron 19 muestras de saliva confirmada negativa por qRT-PCR recolectadas de individuos sanos y 10 muestras de pacientes confirmados positivos por qRT-PCR, las cuales fueron sometidas a pretratamiento descrito en el **paso 1 del procedimiento del ensayo**, considerando como positivo muestras con Ct <30 de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Método		qRT-PCR		Total
SARS-CoV-2 por RT-LAMP en saliva	RESULTADO	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Positivo (+)	9	1	10
	Negativo (-)	0	19	19
Resultados totales		9	20	29

Sensibilidad Relativa: 100% (95% CI *: 88.3% ~ 100%)

Especificidad Relativa: 95.00% (95% CI *: 80.61% ~ 100%)

Precisión Global: 96.55% (95% CI *: 82.82% ~ 100%)

*Intervalo de Confianza

14. Precauciones y seguridad

1. Los ensayos RT-LAMP son sensibles al tiempo y a la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.
2. No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo de los ensayos.
3. Asegúrese de que todos los reactivos no presenten fecha de caducidad vencida (indicada en la caja del kit). No use reactivos con fecha de caducidad vencida (indicada en las etiquetas o cajas).
4. Manipular y preparar las reacciones en un gabinete de seguridad con flujo laminar.
5. Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con Luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpias con cloro y etanol asegurándose de no dejar residuos.
6. Se recomienda el uso de gabinetes de bioseguridad para la preparación de mezcla de reacción.
7. PRECAUCIÓN: Paso crítico. Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a -20 °C inmediatamente después de su uso.
8. Manipule los reactivos en baño de hielo o en un enfriador de tubos de PCR.
9. Use solo el volumen suficiente de muestra cómo se indica en los pasos del procedimiento de ensayo, de lo contrario, puede provocar baja sensibilidad del ensayo.
10. Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
11. Calibre micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivos para evitar contaminaciones cruzadas.
12. La actividad enzimática de la ADN polimerasa podría verse afectada por el polvo y los químicos reactivos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas con filtro.
13. Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
14. Nunca coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio de análisis.
15. Los productos químicos deben manipularse y eliminarse solo de acuerdo con las reglamentaciones locales o nacionales aplicables.
16. Las puntas de las pipetas, los viales, las tiras y los recipientes de muestras deben disponerse de acuerdo a la NOM 087 sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos. Las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) se encuentran disponibles a solicitud del interesado.

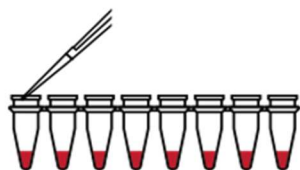
15. Resumen del procedimiento de la prueba

1 Preparación de la muestra



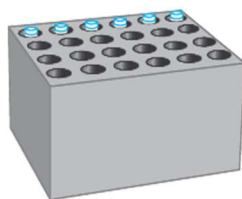
Agregar 400 μ L de **Buffer LAMP**

2 Preparación de la mezcla de reacción



Agregar los componentes en el microtubo de acuerdo a la **tabla 1**

3 Reacción de RT-LAMP



Incubar a **65 °C** de 25 a 30 minutos



Después de la incubación, **enfriar** en un baño de hielo

4 Revelado visual de resultados. Generación de color



Control Negativo (rosa)



Muestra Negativa (rosa)



Control Interno inválido (rosa)



Control positivo (amarillo)



Muestra positiva (amarillo)



Control interno (amarillo)

16. Resolución de problemas

Observación	Causas del problema	Solución
Muestra positiva sin vire amarillo	Almacenamiento incorrecto del kit o vencimiento de la fecha de caducidad.	Revisar las condiciones de almacenamiento correcto y la fecha de caducidad del kit y usar un nuevo kit si es necesario.
	Fallo en la extracción de ácidos nucleicos.	Si se trabajó un control interno, si no cambia el color a amarillo puede indicar la pérdida de los ácidos nucleicos durante la extracción. Asegurarse de usar un método de extracción o pretratamiento de la muestra descrito en el manual, tomando en cuenta las precauciones preanalíticas que pudieran causar la presencia de inhibidores de la reacción. Si existe la presencia de inhibidores se recomienda repetir la extracción o en su caso repetir la toma de muestra tomando en cuenta las recomendaciones al paciente.
	pH muy ácido en la muestra	Agregar de 1 a 5 µL de Buffer de pretratamiento directamente a la reacción hasta que adquiera un tono rosa tenue similar al de las demás reacciones.
	Posible contaminación / degradación de primers	Se recomienda hacer una corrida solo del control interno con diferentes muestras y asegurar que los primers se encuentren íntegros y funcionales. Verificar las condiciones de almacenamiento de los primers, se recomienda hacer alícuotas de éstos cuando la carga de trabajo no es amplia, para evitar una posible contaminación y repetidos ciclos de congelación y descongelación.
Vire a Amarillo o naranja previo a la reacción RT-LAMP	pH ácido en la muestra	Agregar de 1 a 5 µL de estabilizador de muestra B hasta se vea con una tonalidad rosa tenue similar al de las otras reacciones.
Control interno sin vire amarillo	pH muy elevado en la muestra	Medir el pH de la muestra con una tira indicadora de pH, si la muestra excede 9, diluir en agua 1:5 y repetir la extracción o el ensayo.
	Contaminación	Descontamine todas las superficies e instrumentos con solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y etanol al 70%. Solo use puntas con filtro durante el procedimiento, utilizar diferentes puntas para cada muestra, no reutilizar puntas. Repetir todo el procedimiento desde la extracción de ácidos nucleicos con nuevos reactivos.
	Error en la recolección de la muestra	Revisa el método de recolección de la muestra y recolecta la muestra y repite el procedimiento entero.
Falso positivo o señal en el control negativo	Almacenamiento incorrecto de la muestra	Recolecta la muestra y repite el procedimiento. Asegure que la muestra se almacene de manera correcta.
	Contaminación de reactivos o controles	Se recomienda hacer una corrida solo con el control negativo y un Blanco (utilizar agua libre de nucleasas en lugar de muestra), para verificar que los reactivos no encuentren contaminados. Si solo el control negativo da un falso positivo, se deberá reemplazar el control y repetir la nuevamente la corrida. Si tanto el blanco como el control negativo dan un falso positivo, deberá repetir la corrida con nuevos reactivos. IMPORTANTE: Verificar que el vire a amarillo es posterior a la incubación de la reacción, en su caso seguir la resolución de problemas 2 (Vire a Amarillo o naranja previo a la reacción RT-LAMP)
Falso negativo o no se observa señal en el control positivo	Error en el pretratamiento de la muestra o purificación de ácidos nucleicos.	Revisar el procedimiento de la extracción de ácidos nucleicos, así como la concentración de los ácidos nucleicos, y repetir la extracción y procesamiento.
	Error al agregar los ácidos nucleicos en el tubo correcto.	Revisar el número de muestra en el tubo contenedor de ARN /muestra pretratada y verificar que la muestra sea la correcta. Repetir el ensayo con la muestra correcta.
	Presencia de un inhibidor	Diluir la muestra (1/3~1/10) en agua y repetir el ensayo desde la extracción o pretratamiento.
	Mezcla incorrecta de RT-LAMP	Confirmar que todos los componentes se agregaron en la mezcla de reacción. Todos los reactivos deben homogenizarse y centrifugar brevemente para asegurar que todos quedan en fondo del tubo.
	Presencia de un inhibidor de RT-LAMP	Revisar el vial o medio de recolección de la muestra, algunos buffers contienen inhibidores que no son compatibles con las enzimas de RT-LAMP. Recolectar la muestra en buffer LAMP y repetir el ensayo.
No hay señal en una muestra positiva con pretratamiento de muestra sin extracción.	pH básico en la reacción	Si se observa una coloración rosa fuerte al momento de la preparación de la reacción, el pH de la muestra es muy básico, por lo que se recomienda diluir la muestra 1/3 y repetir el ensayo desde el pretratamiento.
	Presencia de algún inhibidor	Diluir la muestra (1/3~1/10) en agua y repetir el ensayo desde la extracción o pretratamiento.
	Muestra con elevada viscosidad	Pretratar la muestra con 10 µL de estabilizador de muestra A incubando 10 minutos a 65°C y continuar con el pretratamiento normal. Si al finalizar se observa que con la muestra pretratada el mix de reacción existe un vire a amarillo solucionar con la observación 2 (Vire a Amarillo o naranja previo a la reacción RT-LAMP).

17. Referencias

1. WHO Novel coronavirus – China. Jan 12, 2020. <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>. (2020).
2. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. ChemRxiv 2020 19;doi: 10.26434/chemrxiv.11860137.
3. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A Novel Reverse Transcription LoopMediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. Int J Mol Sci 2020 18;21. doi: 10.3390/ijms21082826.
4. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, et al. Clinical evaluation of self-collected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19. J. Clin. Microbiol. 2020 7;doi: 10.1128/JCM.01438-20.
5. Harper SJ, Ward LI, Clover GRG. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. Phytopathology 2010;100:1282–8. doi: 10.1094/PHTO-06-10-0168
6. Temple TN, Johnson KB. Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Fruit Flowers. Plant Dis. 2011;95:423–30. doi: 10.1094/PDIS-09-10-0636
7. Wong Y-P, Othman S, Lau Y-L, Radu S, Chee H-Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J. Appl. Microbiol. 2018;124:626–43. doi: 10.1111/jam.13647
8. Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and HighThroughput Screening of COVID-19. Front Cell Infect Microbiol 2020;10:331. doi: 10.3389/fcimb.2020.00331.
9. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. Biotechniques. 2015 Feb 1;58(2):59-68. doi: 10.2144/000114253. PMID: 25652028.

18. Fecha de emisión

Noviembre, 2021. Versión 4.

LAMP 1121/04

Numero de catálogo: BMLAMP01

19. Simbología utilizada

Símbolo	Descripción
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	No use si el empaque se encuentra dañado
	Consulta instrucciones de uso
 -20 °C +/- 5	Temperatura de almacenamiento -20 °C.
	Número de reacciones
	Precaución

Para más información ingresa a:
www.amunet.com.mx