

'Para muestra nasofaríngea o de saliva'

 SCA 1223/01
 REF DLCOV01

Uso deseado

La prueba COVINET-ARN es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de ARN viral correspondiente al genoma del SARS-CoV-2 en muestras de saliva orofaríngea e hisopado nasofaríngeo.

Resumen

El diagnóstico oportuno de los individuos infectados por el virus SARS-CoV-2 toma un rol muy importante en la prevención y diseminación de casos positivos, así como de riesgos de muerte debido a la dinámica viral [1]. La enfermedad COVID-19 suele causar fiebre, tos, dolor de garganta, dificultad respiratoria, fatiga, malestar general, insuficiencia multiorgánica, pérdida del olfato y pérdida del gusto, aunque algunos casos son asintomáticos [2]. La estructura del virus consta de un genoma viral de ARN positivo (+) que codifica para las proteínas que forman la estructura del virus, éste se puede detectar en pacientes sintomáticos, pre-sintomáticos y asintomáticos, aunque con diferencia en concentraciones lo que está ligado a la gravedad de la enfermedad [3,4]. Los estudios han demostrado que el SARS-CoV-2 puede transmitirse de persona a persona a través del contacto directo o indirecto, mediante gotas gruesas o pequeñas de secreciones provenientes del tracto respiratorio [2]. La saliva secretada por las glándulas salivales contiene agua, células epiteliales, electrolitos, mucosa, microorganismos, así como proteínas digestivas y protectoras [2,4], esta representa una fuente de biofluido atractiva para la detección de SARS-CoV-2, debido a que su obtención no es invasiva, es rápida, y de bajo costo [1,2,3,4]. Gracias a la accesibilidad de la muestra y a que es fácilmente aplicable a todos los grupos sociales de la población [4]. El estándar de oro para su diagnóstico es el qRT-PCR, sin embargo, existen otras técnicas para su diagnóstico como las pruebas moleculares de amplificación a temperatura constante y el uso de las pruebas rápidas que han demostrado fiabilidad si se tiene en cuenta la dinámica viral de las diferentes variantes y la localización preponderante del virus en el avance de la infección [5].

Principio

La prueba COVINET-RNA es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de ARN viral correspondiente al genoma del virus SARS-CoV-2. La prueba COVINET-ARN posee dos regiones: la primera es la región control (C) que tiene impresos anticuerpos anti-ratón, la segunda es la región de prueba (T), en esta se encuentran impresos anticuerpos anti-biotina, también cuenta con un conjugado en el que se encuentran partículas recubiertas con anticuerpos anti-fluoresceína. Una vez que la muestra es obtenida y procesada mediante un pretratamiento, se diluye en el reactivo de corrimiento, en el cual se coloca la prueba para que la muestra migre a través de esta por acción capilar. Si la muestra contiene ARN del SARS-CoV-2 superior al límite de detección, esta reaccionará con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína en el conjugado, continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región (T) y reaccionarán formando una línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado positivo. Por el contrario, si no hay ARN del SARS-CoV-2 o está por debajo del límite de detección no se formará la línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

Materiales

Incluidos (según presentación):

Presentación	10 reacciones/cantidad	20 reacciones/cantidad	30 reacciones/cantidad
Instructivo de uso	1 pieza	1 pieza	1 pieza
Reactivo seco	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tubos con reactivo de corrimiento	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tira LF	10 tiras	20 tiras	30 tiras
Reactivo diluyente	1 tubo/ 250 µL	1 tubo/ 500 µL	1 tubo/ 750 µL
Control negativo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL
Control positivo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL

No incluidos:

- Kit de purificación de ARN viral
- Cronómetro
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta.
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

- Almacene la prueba de acuerdo con las indicaciones de cada componente impresos en su etiqueta individual.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.

Recolección de la muestra

a. Nasofaríngea

- a.1. Retire la envoltura protectora del hisopo nasofaríngeo. No manipule la cabeza del hisopo, tómelo del extremo del mango de plástico.
- a.2. Inserte el hisopo nasofaríngeo en el orificio nasal con la vía más despejada.
- a.3. Rote el hisopo de forma gentil e introdúzcalo hasta que produzca una resistencia al avance, esto sucede a la altura de la cavidad faríngea superior (aproximadamente 2.5 cm después de la entrada del orificio nasal).
- a.4. Rote el hisopo 5 veces o más contra la pared nasal.
- a.5. Retire lentamente el hisopo del orificio nasal.
- a.6. Usando el mismo hisopo, repita el procedimiento en el orificio nasal restante.
- a.7. Inserte el hisopo en un tubo con hasta 2 mL de solución salina isotónica.

b. Saliva

- b.1. Tosa con fuerza, colocando un paño que cubra nariz y boca. Sin abrir la boca, almacene lo máximo posible la saliva generada.
- b.2. Retire la envoltura protectora del hisopo para saliva. No manipule la cabeza del hisopo, tómelo del extremo del mango de plástico.
- b.3. Abra la boca, introduzca el hisopo, frote 10 veces contra la mejilla derecha, repita en la mejilla izquierda.
- b.4. Coloque el hisopo por 10 segundos en el surco inferior derecho cerca de las glándulas salivales mayores a un lado de los dientes, donde se concentra más saliva. Repita en el surco del lado de la mejilla izquierda con el mismo hisopo.
- b.5. Levante la lengua, recoja la mayor cantidad de saliva del piso sublingual.
- b.6. Inserte el hisopo en un tubo con hasta 1 mL de solución salina isotónica o agua grado biología molecular.

Almacenamiento de la muestra

- Una vez colectada la muestra, de acuerdo con las instrucciones para la toma y manejo de muestras de SARS-CoV-2 solo puede almacenarse hasta por dos horas a temperatura ambiente y hasta por 5 días en refrigeración (4 °C).
- Para un mejor desempeño, analice las muestras inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.

Preparación de la muestra

• Purificación de ARN viral:

Se sugiere purificar el ARN viral de la muestra, de acuerdo con las instrucciones del kit de purificación, al final eluya el ARN purificado (preferentemente) en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8.

• Sin purificación de ARN:

- Saliva: Mezclar por vortex o agitación.
- Nasofaríngea: Mezclar por vortex o agitación.

NOTA: Si la muestra contiene restos sólidos, se recomienda permitir que sedimenten o centrifugar ligeramente para separar la parte líquida.

Instrucciones de uso

Permita que los componentes se atemperen o alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

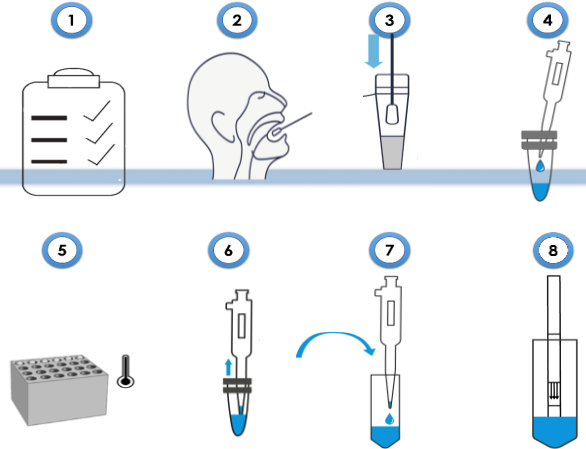
1. Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
2. Recolecte la muestra cómo se menciona en la sección 'recolección de la muestra'.
3. Prepare la muestra cómo se indica en la sección 'preparación de la muestra'.
4. Pretratamiento de forma independiente para cada tubo:
 - **Control positivo (C+):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.

- **Control negativo (C-):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.
- **Muestra:** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con M1.

Nota: se recomienda realizar duplicados (dos tubos de cada uno) por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.

5. Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
6. Recolecte 10 µL de uno de los tubos del paso anterior (paso 5).
7. Transfiera los 10 µL recolectados previamente a un tubo de reactivo de corrimiento, homogenice por vortex o pipeteo y rotule como C+, C- o M1 según el tubo donde recolectó los 10 µL. (Repita este paso para los tubos restantes siendo un tubo por separado).
8. Saque una Tira LF (o más según el número de tubos preparados del paso 7) de su contenedor y colóquela en un tubo con reactivo de corrimiento preparado en el punto anterior e Inicie un temporizador.
9. Después de 5 minutos saque la tira del tubo, colóquela sobre una superficie limpia e interprete resultados.

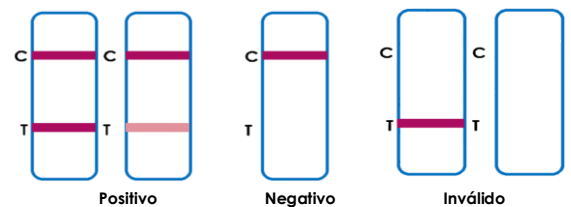
NOTA: No interprete resultados después de 10 minutos.



ATENCIÓN: Un esquema simplificado de las instrucciones de uso se encuentran detallados e ilustrados en la página 3 de 3 de este instructivo.

Interpretación de resultados

• Tira LF



Emita un dictamen en función de la siguiente tabla:

Control positivo	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
------------------	--

Control negativo	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que se detectó el ARN viral del SARS-CoV-2. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Un resultado negativo indica que no se detectó el ARN viral del SARS-CoV-2.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada tira (LF). Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ARN del virus SARS-CoV-2.
- Esta prueba solo detecta exclusivamente el ARN del virus SARS-CoV-2.
- La prueba COVINET-RNA sólo indica la presencia del genoma viral del SARS-CoV-2 en la muestra, no lo usa como único criterio pues los resultados deben considerarse con toda información clínica disponible para el médico o personal calificado.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los síntomas clínicos persisten se sugieren pruebas de seguimiento adicionales como qRT-PCR.
- Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2, ya que la mayor sensibilidad es entre los 2 hasta los 7 días a partir del inicio de los síntomas.
- Particularmente en aquellos pacientes que han estado en contacto con el virus. Se sugiere la aplicación de pruebas de diagnóstico molecular.
- Las pruebas pueden ser positivas, aunque el individuo este recuperado.
- Las pruebas no están autorizadas para vigilancia epidemiológica.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este instructivo de uso.
- La presencia del virus en muestras de saliva puede estar influenciada por el periodo de tiempo en la que fue recolectada y la relación epidemiológica con casos positivos a COVID-19. Su presencia en la cavidad orofaríngea debe ser confirmada con otros métodos más sensibles.
- Los periodos de incubación del virus pueden diferir según el estado de vacunación, las condiciones de salud subyacentes, el historial de infecciones, la edad y la carga viral que enfrentan los individuos.

Características de presentación

Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas por cada concentración incluyendo una libre de ARN viral de SARS-CoV-2 se utilizó reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días diferentes por cada concentración incluyendo una libre de ARN viral de SARS-CoV-2 utilizando reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Reactividad cruzada

La prueba de COVINET-RNA se ha probado con muestras positivas con el siguiente panel. Los resultados no mostraron reacción cruzada.

Influenza A H1N1 (A/ NewCaledonia/20/99)
Influenza A H3 (A/Brisbane/10/07)
Influenza A 2009 H1N1 pdm (A/NY/02/09)
Influenza B (B/Florida/02/06)
Metapneumovirus 8 (Peru6-2003)
Virus sincitial respiratorio A
Rhinovirus 1^a
Virus Parainfluenza tipo 1

Adenovirus tipo 3
Coronavirus NL63
Coronavirus 229E
Coronavirus OC43
Coronavirus HKU-1
M. pneumoniae (M129)
C. pneumoniae (CWL-029)
B. pertussis (A639)

Virus Parainfluenza tipo 2
Virus Parainfluenza tipo 3
Virus Parainfluenza tipo 4

Adenovirus tipo 31
Adenovirus tipo 1
B. parapertussis (A747)

Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando la prueba rápida COVINET-RNA con muestras de saliva orofaríngea e hisopado nasofaríngeo, no se observó interferencia.

Sangre (1%)
Cloruro de sodio (5%)
Oximetazolina (15%)
Fluconazol (5%)
Oseltamivir (0.5%)
Tobramicina (0.0004%)

Desempeño

La prueba COVINET-ARN se evaluó con muestras de saliva y nasofaríngeas de forma independiente. Todos los resultados fueron comparados con qRT-PCR. A continuación, se reportan los resultados con cada tipo de muestra:

Se usaron los resultados obtenidos de 128 pacientes asintomáticos y sintomáticos que presentaron evolución de sintomatología mayor a 2 días, con presencia de dos o más de los siguientes datos clínicos: fiebre mayor o igual a 38 °C, cefalea, fatiga, rinores, tos, disnea a bajos y medianos esfuerzos, saturación de oxígeno <90%, diarrea, anosmia.

Las muestras obtenidas fueron recolectadas de hisopado nasofaríngeo para la prueba COVINET-ARN al igual que para prueba de referencia qRT-PCR.

Muestras de hisopado nasofaríngeo

Prueba COVINET-ARN	Método		qPCR		Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo		
	Positivo	86	2	88	
Negativo	1	39	40		
Resultados totales		87	41	128	

Sensibilidad Relativa: 98.85% (IC: 95.12% - 99.74%)
Especificidad Relativa: 95.12% (IC: 89.90% - 100%)
Precisión Global: 97.66% (IC: 93.34% - 100%)
IC: Intervalo de confianza

Muestras de hisopado de saliva

Prueba COVINET-ARN	Método		qPCR		Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo		
	Positivo	86	2	88	
Negativo	1	39	40		
Resultados totales		87	41	128	

Sensibilidad Relativa: 98.85% (IC: 95.12% - 99.74%)
Especificidad Relativa: 95.12% (IC: 89.90% - 100%)
Precisión Global: 97.66% (IC: 93.34% - 100%)
IC: Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Se recomienda realizar una purificación de ARN viral previo al análisis para obtener mejores resultados.
- El pretratamiento de la muestra es sensible al tiempo y la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.
- 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.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, si limpió las micropipetas previamente con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de gabinetes de bioseguridad para la preparación de mezcla de pretratamiento.
- PRECAUCIÓN: 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 el reactivo a su temperatura de almacenamiento después de su uso.

- PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de la prueba, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo y los reactivos químicos 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.
- 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.
- Todos los productos de desecho generados por este Kit deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.
- Se recomienda utilizar equipo de protección personal al momento de manipular las muestras.

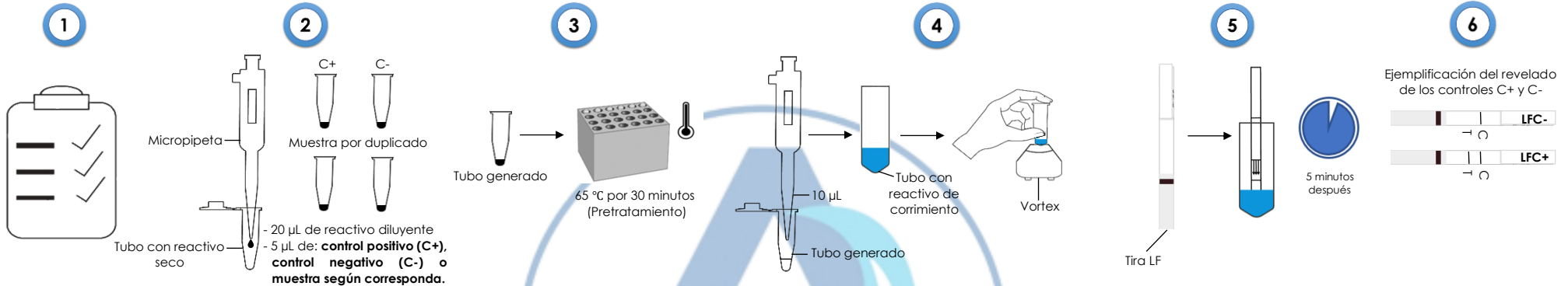
Referencias

- Kissler, S. M., Fauver, J. R., Mack, C., Tai, C. G., Breban, M. I., Watkins, A. E., Grad, Y. H. (2021). Viral Dynamics of SARS-CoV-2 Variants in Vaccinated and Unvaccinated Persons. *New England Journal of Medicine*. December 2021, 385(26), 2489-2491. doi: 10.1056/NEJMc2102507
- Han P, Ivanovski S. Saliva—Friend and Foe in the COVID-19 Outbreak. *Diagnostics*. 2020; 10(5):290. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050290>
- Shan, D., Johnson, J.M., Fernandes, S.C. et al. N-protein presents early in blood, dried blood and saliva during asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 12, 1931 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22072-9>
- Ceron JJ, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez-Jornet P, Capela-Silva F, Eckersall PD, Tvarijonaviciute A. Use of Saliva for Diagnosis and Monitoring the SARS-CoV-2: A General Perspective. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(5):1491. <https://doi.org/10.3390/jcm9051491>
- Marais, G., Hsiao, N.-y., Irazadeh, A., Doolabh, D., Enoch, A., Chu, C.-y., Hardie, D. (2021). Saliva swabs are the preferred sample for Omicron detection. *medRxiv*, 2021.2012.2022.21268246. doi: 10.1101/2021.12.22.21268246

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para evaluación de desempeño in vitro		Número de catálogo
	Almacenar entre 2 - 30 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar

Esquema de instrucciones de uso



• Identifique cada material y asegúrese de tener todo lo necesario.

Preparación de muestra:

- Tome un tubo con reactivo seco.
- Agregue 20 µL de reactivo diluyente al tubo.
- Agregue 5 µL de muestra (se recomienda hacer duplicado por cada muestra a analizar).

Preparación de controles:

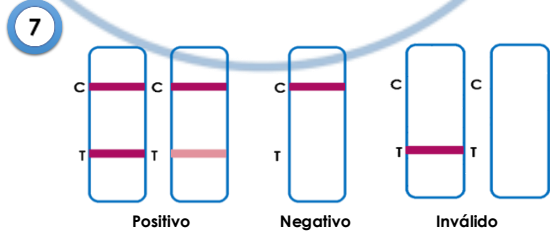
- Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control positivo (C+).
- Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control negativo (C-).

- Tome cada tubo generado (C+, C- y muestra) y colóquelos en cualquiera de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.
- Programe el equipo para que alcance una temperatura de 65 °C y déjelos por 30 minutos.

- Tome uno de los tubos generados (C+, C- o muestra) y con ayuda de una micropipeta recolecte 10 µL después transfíralos a un tubo con reactivo de corrimiento y rotule.
- Mezcle por medio de pipeteo o 5 segundos en vortex.
- Repita este paso para cada uno de los tubos generados restantes.

- Tome una tira LF y rotúlela según el tubo con reactivo de corrimiento correspondiente elaborado en el paso anterior:
 - Tira LF para el tubo con reactivo de corrimiento con **muestra**.
 - Tira LFC+ en el tubo con reactivo de corrimiento con **C+**.
 - Tira LFC- en el tubo con reactivo de corrimiento con **C-**.
- Inicie un cronómetro.

- Una vez hayan pasado 5 minutos saque la prueba del tubo, colóquela sobre una superficie plana y limpia



- Interprete los resultados conforme a la imagen superior.
- Nota: No interprete los resultados después de 10 minutos.