NOMBRE DEL LABORATORIO:	LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD
FECHA:	05 DE NOVIEMBRE DE 2020
NOMBRE DEL INFORME:	INFORME DE PRIMERA PARTE DE VALIDACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE SARS CoV2
PRESENTADO POR:	EQUIPO DE TRABAJO DE SARS CoV2
CARGO:	BACTERIÓLOGOS Y COORDINADOR DE LABORATORIO
OBJETIVO DEL INFORME:	DETALLAR LA METODOLOGÍA Y RESULTADOS OBTENIDOS EN LA rt-PCR PARA SARS CoV2

1. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

RECEPCIÓN DE MUESTRAS:

Las muestras fueron enviadas por la secretaría de Salud, las cuales fueron relacionadas en el documento en donde se detallaban cada una de las muestras enviadas y las características de los reactivos que se iban a utilizar en el laboratorio como Lote, Fecha de Vencimiento, Referencia y Volumen.

Imagen 1. Foto Carta de Relación de muestras

Neiva, 5 de noviembre el 2020

Doctor:
CARLOS NARVAEZ
Coordinador de Laboratorio de inmunidad e infectologia
Universidad Surcolombiana
Ciudad.

Cordial saludo,

Hago entrega de las siguientes 40 muestras respiratorias para SARS-Cov-2, el cual serán utilizadas para la verificación y/o validación del proceso.

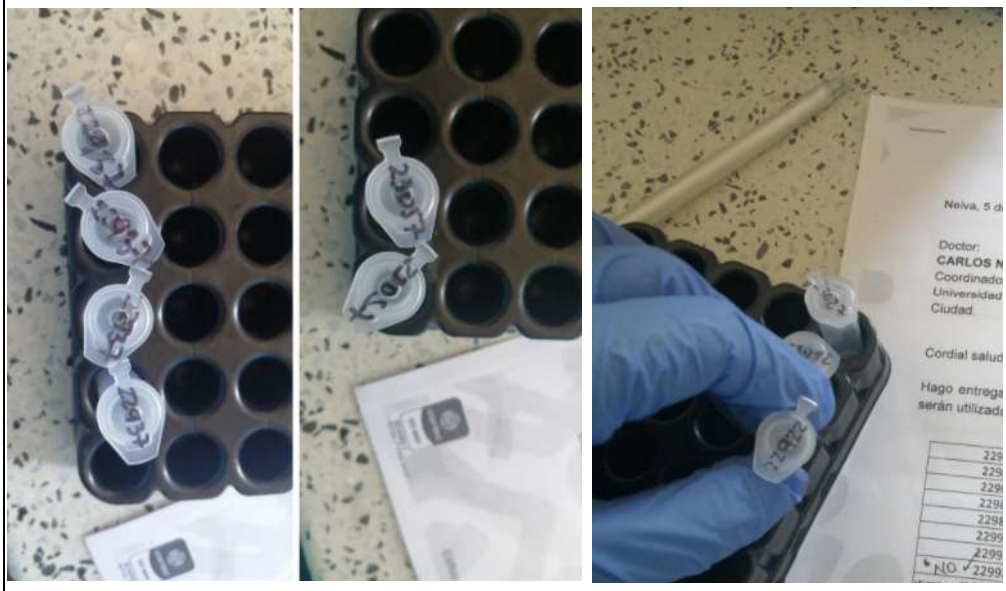
22937 - 1500001	1500010 22995	1500018 23017	• NO 23036
22985 - 1500002	1500011 22996	1500019 23026	NO 23037
22987 - 1500003	1500012 22997	• NO 23027	1500027 23038
22988 - 1500004	1500013 23002	1500020 23028	1500028 23039
22989 - 1500005	14 23003	1500021 23029	1500029 23040
22990 - 1500006	• NO (23004)	1500022 23030	1500030 23041
22991 - 1500007	1500015 23005	1500023 23031	1500031 23042
• NO (22992)	1500016 23010	1500024 23032	1500032 23043
1500008 22993	1500017 23016	1500025 23033	1500033 23044
1500009 22994	NO	1500026 23035	1500034 23056

Según el documento de relación con las muestras recepcionadas encontramos:

22937 cuatro Viales	22995 dos Viales	23017 dos Viales	23036 un Vial
22985 dos Viales	22996 dos Viales	23026 dos Viales	23037 No se encontraba
22987 dos Viales	22997 dos Viales	23027 un Vial	23038 dos Viales
22988 dos Viales	23002 dos Viales	23028 dos Viales	23039 dos Viales
22989 dos Viales	23003 dos Viales	23029 dos Viales	23040 dos Viales
22990 dos Viales	23004 No se encontraba	23030 dos Viales	23041 dos Viales
22991 dos Viales	23005 dos Viales	23031 dos Viales	23042 dos Viales
22992 un Vial	23010 dos Viales	23032 dos Viales	23043 dos Viales
22993 dos Viales	23016 dos Viales	23033 dos Viales	23044 dos Viales
22994 dos Viales		23035 dos Viales	23056 dos Viales
22922 No Relacionado	23057 No Relacionado		

Imagen 2. Foto de las muestras recibidas:

Imagen 3. Foto de muestras recibidas



Las muestras que se seleccionaron para trabajar fueron las que tenían el volumen suficiente ya que en cada vial encontramos menos de 200 µL, por lo cual casi todas las que se seleccionaron fueron las que tenían dos viales. Ya teniendo las muestras seleccionadas, se les asignó un número de código interno del laboratorio de Infección e Inmunidad, las cuales quedaron de la siguiente manera:

Asignación de códigos por muestra:

22937 = IS00001	22995 = IS00010	23026 = IS00019	23039 = IS00028
22985 = IS00002	22996 = IS00011	23028 = IS00020	23040 = IS00029
22987 = IS00003	22997 = IS00012	23029 = IS00021	23041 = IS00030
22988 = IS00004	23002 = IS00013	23030 = IS00022	23042 = IS00031
22989 = IS00005	23003 = IS00014	23031 = IS00023	23043 = IS00032
22990 = IS00006	23005 = IS00015	23032 = IS00024	23044 = IS00033
22991 = IS00007	23010 = IS00016	23033 = IS00025	23056 = IS00034
22993 = IS00008	23016 = IS00017	23035 = IS00026	23057 = IS00035
22994 = IS00009	23017 = IS00018	23038 = IS00027	MOCK

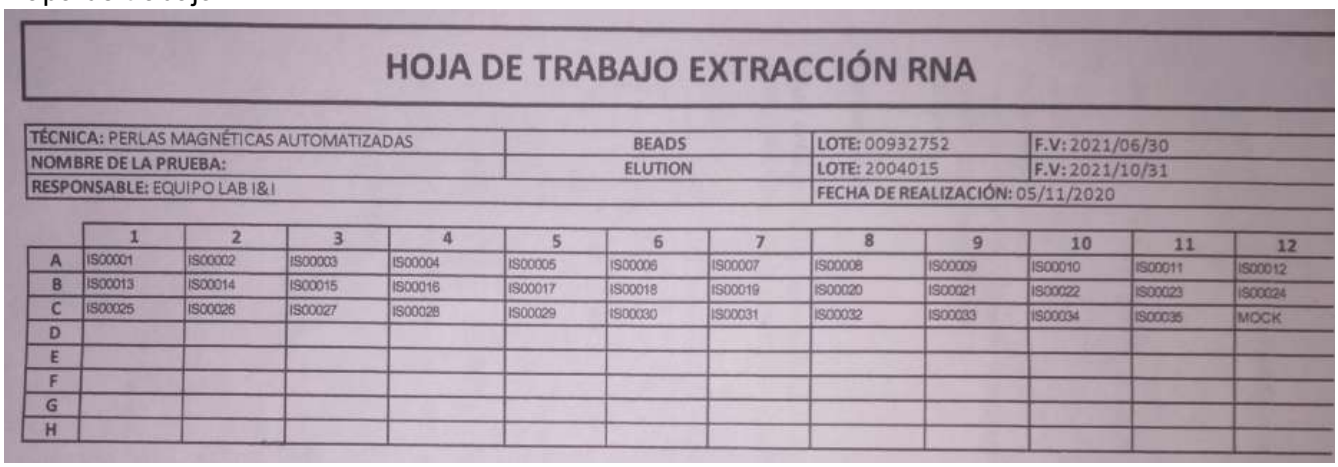
Extracción de Muestras:

Las muestras que llegaron del Laboratorio de Salud departamental ya se encontraban inactivadas con la proteinasa K, por lo cual, se procedió luego de ser marcadas, a dispensar 200 µL de cada una en la placa asignada para muestras del KingFisher Flex para continuar con la extracción. La mezcla binding y la dilución del Etanol se realizó de la siguiente manera teniendo en cuenta el protocolo entregado por el asesor científico de Equipos y Laboratorios de Colombia quién estuvo con nosotros en todo el procedimiento, aquí se tuvo en

cuenta realizar los cálculos para un total de 37 muestras, teniendo en cuenta el MOCK más una muestra de más para no quedar con el volumen exacto.

37 muestras	
Etanol al 80%:	14,800 mL de Etanol Absoluto + 3,7 mL de H_2O libre de RNAsa
Mezcla Binding:	Binding 9,805mL+ Beads: 370 µL

Mapa de trabajo:



HOJA DE TRABAJO EXTRACCIÓN RNA

TÉCNICA: PERLAS MAGNÉTICAS AUTOMATIZADAS	BEADS	LOTE: 00932752	F.V: 2021/06/30
NOMBRE DE LA PRUEBA:	ELUTION	LOTE: 2004015	F.V: 2021/10/31
RESPONSABLE: EQUIPO LAB I&I		FECHA DE REALIZACIÓN: 05/11/2020	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IS00001	IS00002	IS00003	IS00004	IS00005	IS00006	IS00007	IS00008	IS00009	IS00010	IS00011	IS00012
B	IS00013	IS00014	IS00015	IS00016	IS00017	IS00018	IS00019	IS00020	IS00021	IS00022	IS00023	IS00024
C	IS00025	IS00026	IS00027	IS00028	IS00029	IS00030	IS00031	IS00032	IS00033	IS00034	IS00035	MOCK
D												
E												
F												
G												
H												

Luego de Preparar el Binding, se le adicionó a la placa signada con las muestras ya previamente dispensada, 275 µL de mezcla Binding. En un segundo plato se adicionaron a cada pozo teniendo en cuenta la cantidad de muestras procesadas más el MOCK, 500 µL de Solución de Wash, en un tercer plato 500 µL de etanol al 80% y en un cuarto plato se adicionó 50 µL de elution.

Los cuatro platos fueron procesados en el KingFisher Flex, al cual se le realizó una verificación previa.

Amplificación:

Se tomaron 38 viales de reacción (35 muestras, 1 MOCK, 1 Control Positivo y 1 Control Negativo), los cuales se rehidrataron con 15 µL de tampón de rehidratación suministrado en el kit. Luego de esto, se tomó directamente la muestra de la placa del Elution en donde se encuentra el ARN ya extraído y se dispensan en cada vial de reacción 5 µL de muestra de cada uno de los pacientes, del MOCK, del control negativo y del control positivo. Se taparon de forma que quedara bien sellados y se colocaron dentro del equipo QuantStudio5 para iniciar la amplificación.

HOJA DE TRABAJO rt-PCR SARS CoV-2

Nombre del analista: Equipo de Trabajo lab I&I
KIT Viasure Lote No.: Ref: G-VSN0021214
Fecha de vencimiento: 31-08-2022
Fecha de realización del ensayo: 05/Nov/2020

Inicio de procesamiento:
Hora: Temperatura: Humedad:
Terminación de procesamiento:
Hora: Temperatura: Humedad:

RT-PCR SASR CoV-2

COPIA CONTROLADA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+ CPOS	− IS00006	IS00014 *							IS00033 −	IS00025 +	IS00017 −
B	− CNEG	+ IS00007	IS00015 *							IS00034 +	IS00026 +	IS00018 −
C	− MOCK	− IS00008	+ IS00016							IS00035 +	IS00027 −	IS00019 −
D	+ IS00001	+ IS00009									IS00028 +	IS00020 +
E	− IS00002	+ IS00010									IS00029 +	IS00021 +
F	+ IS00003	+ IS00011									IS00030 +	IS00022 +
G	− IS00004	+ IS00012									IS00031 −	IS00023 +
H	− IS00005	− IS00013									IS00032 −	IS00024 *

Control positivo gen E_10⁴: Proporcionado por el INS
Control positivo gen RdRp_10⁴: Proporcionado por el INS

− Negativo
+ Positivo
* En duda

Lectura e Interpretación de Resultados:

Los resultados fueron exportados directamente a nuestra nube de datos y desde allí, todo nuestro grupo de trabajo y el asesor científico realizamos la interpretación de cada una de las muestras. Los criterios que se tuvieron en cuenta para determinar el resultado POSITIVO o NEGATIVO fueron:

Gen ORF1ab (FAM)	Gen N (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo
-	-	+	-	+	SARS-CoV-2 Negativo
+	-*	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo*
-**	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Negativo**
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

* Repetir la extracción y el ensayo de nuevo, en caso de que gen *N* continúe siendo negativo la interpretación será SARS-CoV-2 Positivo.

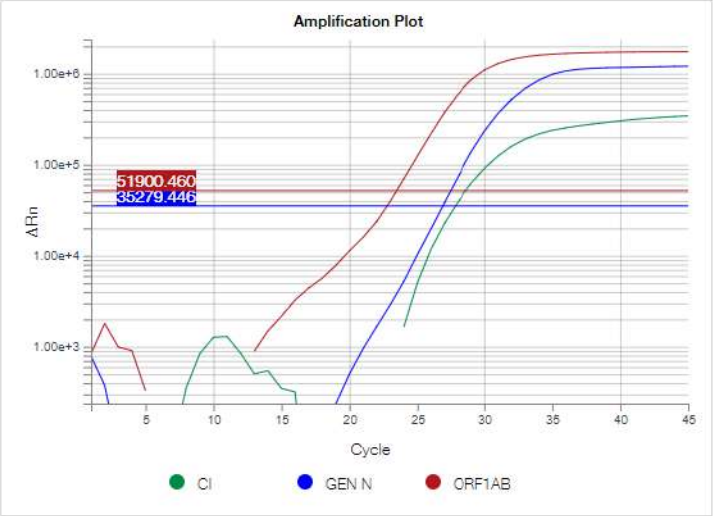
** Repetir la extracción y el ensayo de nuevo, si el gen *ORF1ab* continúa siendo negativo la interpretación será SARS-CoV-2 Negati (Posibles infecciones de otros coronavirus).

También y según criterios de la técnica, se debe tener en cuenta que una muestra se considera POSITIVA, si el valor CT obtenido es menor de 38 y el control Interno muestra o no una gráfica de amplificación ya que en ocasiones, la detección del control interno no es necesaria porque la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera NEGATIVA, si no se detecta una curva de amplificación por encima del threshold y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Ya teniendo claro estos criterios se procede al análisis de cada uno de los resultados, los cuales fueron informados de la siguiente manera:

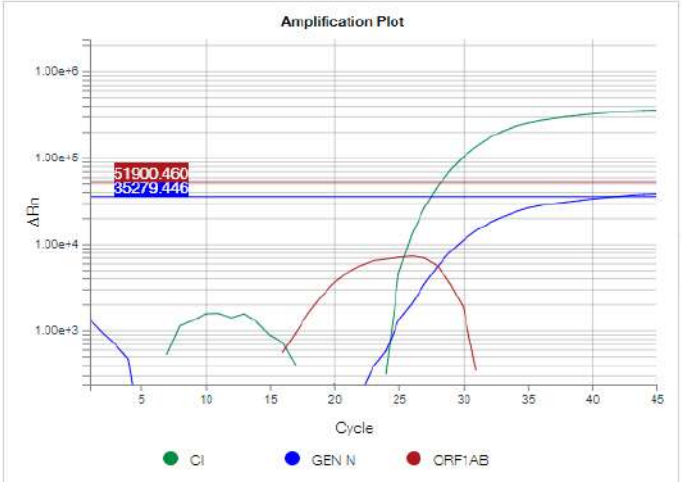
Control Positivo:



Sample	Target	Num of Replicates	Cq Mean
CPOS	CI	1	23.298
CPOS	GEN N	1	26.888
CPOS	ORF1AB	1	23.527

Se observa que los target GEN N, ORF1ab y C1 tienen un valor de CT menor de 38 y se encuentran por encima del threshold y del control interno lo cual lo validan como resultado POSITIVO.

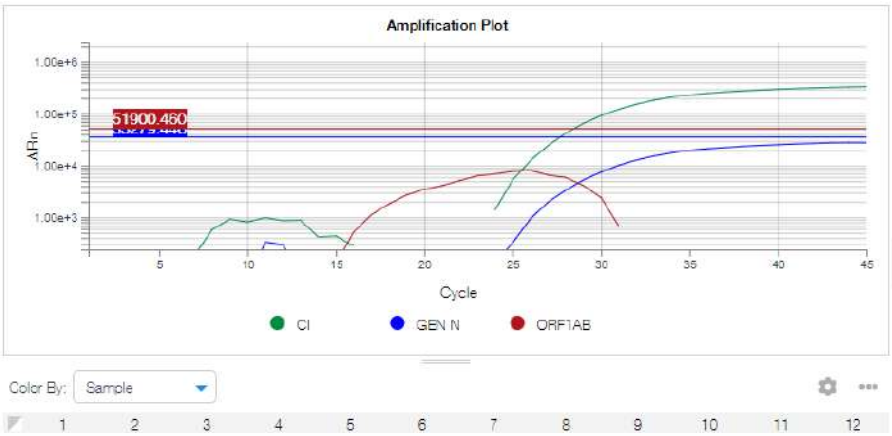
Control Negativo:



Sample	Target	Num of Replicates	Cq Mean
CNEG	CI	1	23.951
CNEG	GEN N	1	41.698
CNEG	ORF1AB	1	

En este resultado se puede observar que ambos target GEN N Y ORF1ab se encuentran amplificados después del CI sin superar el threshold y el CT es menor de 38 lo cual lo valida como resultado NEGATIVO.

MOCK:



Sample	Target* 1	Cq Mea
IS00028	CI	23.783
IS00029	CI	24.517
IS00030	CI	24.040
IS00031	CI	23.614
IS00032	CI	23.546
IS00033	CI	23.653
IS00034	CI	26.458
IS00035	CI	25.981
MOCK	CI	23.330

En el MOCK también podemos observar al igual que el control negativo que el GEN N y el ORF1ab no superan el threshold y se encuentran sin superar al CI y su CT es menor de 38 lo que lo valida como control NEGATIVO de la extracción.

Teniendo la validación de la corrida con los controles dentro de los parámetros esperados se dispone al análisis de los resultados de los pacientes, los cuales fueron los siguientes:

HOJA DE TRABAJO rt-PCR SARS CoV-2

Nombre del analista: Equipo de Trabajo I&I		Inicio de procesamiento:	
KIT: Viasure	Lote No. : REF. CT-VSNCO212H	Hora: 3:30 pm	Temperatura: 22° C	Humedad: 40%
Fecha de vencimiento: 31-08-2022		Terminación de procesamiento:	
Fecha de realización del ensayo: 05 de Noviembre de 2020		Hora: 3:30 pm	Temperatura: 22° C	Humedad: 40%

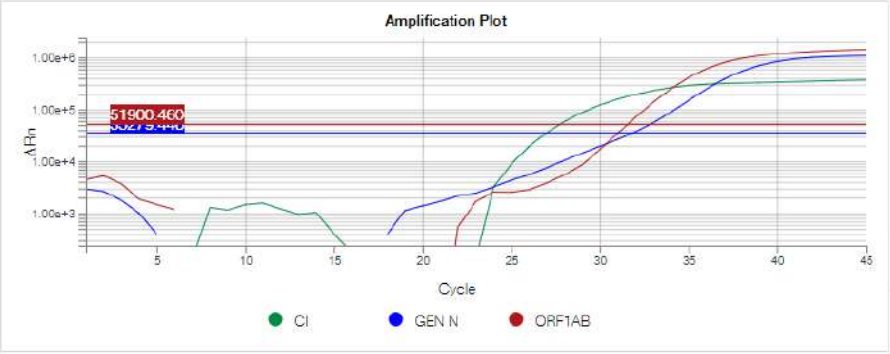
RT-PCR SASR CoV-2

COPIA CONTROLADA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CPOS POS	IS00006 NEG	IS00014 REP							IS00033 NEG	IS00025 POS	IS00017 NEG
B	CNEG NEG	IS00007 POS	IS00015 REP							IS00034 POS	IS00026 POS	IS00018 NEG
C	MOCK NEG	IS00008 NEG	IS00016 POS							IS00035 POS	IS00027 NEG	IS00019 NEG
D	IS00001 POS	IS00009 POS									IS00028 POS	IS00020 POS
E	IS00002 NEG	IS00010 POS									IS00029 POS	IS00021 POS
F	IS00003 POS	IS00011 POS									IS00030 POS	IS00022 POS
G	IS00004 NEG	IS00012 POS									IS00031 NEG	IS00023 POS
H	IS00005 NEG	IS00013 NEG									IS00032 NEG	IS00024 REP

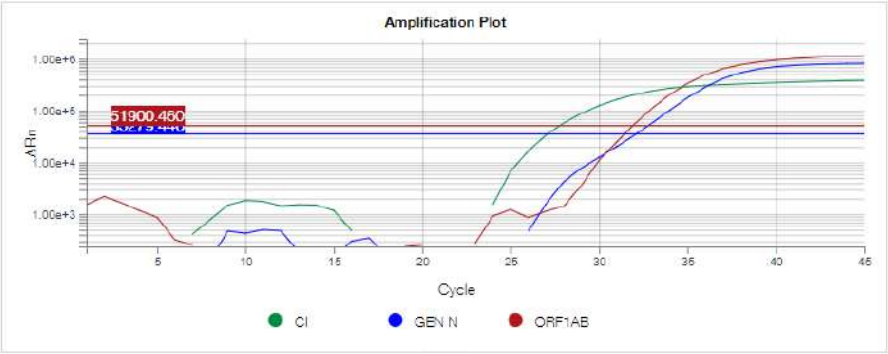
Tres de los resultados fueron seleccionados para repetir proceso (IS00014, IS00015 e IS00024) ya que la gráfica no muestra la claridad suficiente para validarlo como Negativo o Positivo ya que los target superan el control interno después del threshold como se observa en la gráfica siguiente:

IS00014:



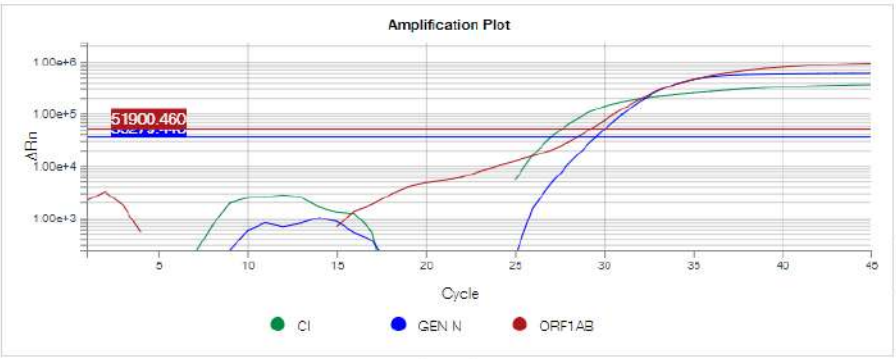
Sample	Target 1	Cq Mea
IS00011	CI	25.731
IS00012	CI	25.966
IS00013	CI	23.553
IS00014	CI	22.964
IS00015	CI	23.588
IS00016	CI	26.283
IS00017	CI	23.358
IS00018	CI	23.660

IS00015:



Sample	Target 1	Cq Mea
IS00010	ORF1AB	24.923
IS00011	ORF1AB	16.130
IS00012	ORF1AB	16.782
IS00013	ORF1AB	
IS00014	ORF1AB	31.599
IS00015	ORF1AB	31.923
IS00016	ORF1AB	19.527
IS00017	ORF1AB	

IS00024:



Sample	Target 1	Cq Mea
IS00023	CI	24.228
IS00024	CI	24.160
IS00025	CI	25.811
IS00026	CI	25.982
IS00027	CI	23.719
IS00028	CI	23.783
IS00029	CI	24.517
IS00030	CI	24.040

Color By: Sample

Nombre: Carlos F. Narváez
Coordinador Laboratorio Infección e Inmunidad (I&I Lab)
SUPERVISOR