



ABOG. Braulio Raúl Roca Vargas
FEDATARIO
Hospital Nacional Hipólito Unanue
20 JUL. 2023
El presente documento es
COPIA FIEL DEL ORIGINAL
que se tiene a la vista

Resolución Directoral

Lima, 18 de Julio de 2023

Visto el Expediente N° 23-028923-001, que contiene el Memorando N° 1215-2023-DPCYAP/HNHU, expedido por el Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, a través del cual solicitan la aprobación de la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia mediada por Lazo (RTLAMP) para la detección molecular de SARS-COV2, mediante acto resolutivo;

CONSIDERANDO:

Que, los numerales I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud disponen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo, y que la protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA, se aprobó el Documento denominado "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", cuyo objetivo general es establecer las disposiciones relacionadas con los procesos de formulación, aprobación, modificación y difusión de los documentos normativos que expide el Ministerio de Salud, siendo de observancia obligatoria por los órganos, unidades orgánicas y órganos desconcentrados del Ministerio de Salud;

Que, el punto 6.1.3. del citado documento normativo, describe a la Guía Técnica como el documento normativo con el que se define por escrito y de manera detallada el desarrollo de determinados procesos, procedimientos y actividades administrativas, asistenciales o sanitarias. En ella se establecen metodologías, instrucciones o indicaciones que permite al operador seguir un determinado recorrido, orientándolo al cumplimiento del objetivo de un proceso, procedimientos o actividades, y al desarrollo de una buena práctica;

Que, el literal j) del artículo 75° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, aprobado con Resolución Ministerial N° 099-2012/MINSA, señala como una de las funciones del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica: Proponer y aplicar los procedimientos y guías de atención para la atención de los pacientes en la institución;

Que, asimismo, el artículo 11° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, señala que la Oficina de Gestión de la Calidad es la unidad orgánica que se encarga de implementar el Sistema de Gestión de la Calidad en el Hospital para promover la mejora continua de la atención asistencial y administrativa al paciente con la participación activa del personal; y, en el literal f) del mencionado artículo señala que dentro de sus funciones generales se encuentra: Asesorar en la formulación de normas, guías de atención y procedimientos de atención al paciente;

Que, es por ello, que con Nota Informativa N° 296-2023-OGC/HNHU adjunta el Informe N° 238-2023-KMGM/HNHU, en el cual se indica que la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia mediada por Lazo (RTLAMP) para la detección molecular de SARS-COV2, ha sido evaluada y encuentra acorde a los lineamientos de la Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA, que



aprueba el Documento denominado "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud" y, al no encontrarse observación alguna, se encuentra apta para su aprobación;

Estando a lo informado por la Oficina de Asesoría Jurídica en su Informe N° 289-2023-OAJ/HNHU;



Con el visto bueno de la Jefa del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, de la Jefa de la Oficina de Gestión de la Calidad y del Jefe de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

De conformidad con lo dispuesto por la Ley N° 26842, Ley General de Salud y de acuerdo a las facultades establecidas en el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, aprobado por Resolución Ministerial N° 099-2012/MINSA;



SE RESUELVE:

Artículo 1.- APROBAR la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia mediada por Lazo (RTLAMP) para la detección molecular de SARS-COV2, la misma que forman parte de la presente Resolución y por los fundamentos expuestos en la parte considerativa.

Artículo 2.- ENCARGAR al Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, la ejecución y seguimiento de la Guía Técnica aprobada por el artículo 1 de la presente Resolución.

Artículo 3.- DISPONER que la Oficina de Comunicaciones proceda a la publicación de la presente Resolución en la Página Web del Hospital <https://www.gob.pe/hnhu>.

Regístrese y comuníquese.



MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL HIPOLITO UNANUE

M.C. LUIS WILFREDO MIRANDA MOLINA
Director General (e)
CMP 27423

LWMM/FHOR/Marlene G
DISTRIBUCIÓN
() D. Adjunta
() Dpto. de Patología Clínica y Anatomía Patológica
() OAJ
() Of. Gestión de la Calidad
() OCI
() Comunicaciones
() Archivo



PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

I. FINALIDAD

La OMS en diciembre de 2019 fue alertada de numerosos casos de neumonía de etiología desconocida en la ciudad de Wuhan en China. Al inicio este virus recibió la designación temporal de nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV). Posteriormente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) le denominó al virus como SARS-CoV-2 [10]. El COVID-19 es el nombre de la enfermedad provocada por el SARS-CoV-2.

Actualmente, la pandemia COVID-19 sigue presente alrededor del mundo, debido a que el SARS-COV-2, un virus altamente infeccioso.

Los coronavirus pertenecen a la familia dentro de los Nidovirales y subfamilia se clasifica en cuatro géneros: coronavirus alfa, beta, gamma y delta. Los coronavirus (HCoV) de los humanos forman parte de dos géneros: el alfa (HCoV-229E y HCoV-NL63) y el beta (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV, y SARS-CoV-2 [16,17].

El genoma se muestran cuatro o cinco proteínas estructurales: S, M, N, HE y E. El SARS, el HCoV-229E y el HCoV-NL63 codifican las proteínas S, M, N y E. Mientras que HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 además tienen un gen adicional y codifica la proteína HE [18].

La infección por SARS-CoV-2 tiene una presentación clínica variable desde una infección asintomática hasta presentarse en su forma grave [19]. En distintos países, las tasas de mortalidad pueden ser variable [20]. Es importante el diagnóstico precoz de infección por SARS-CoV-2, ya que podría ser útil para la gestión clínica y el control de brotes. Entre las pruebas diagnósticas pueden detectar el virus propiamente dicho están las pruebas moleculares que detectan el ARN viral o de antígenos virales o la detección de la respuesta inmunitaria humana con la detección de anticuerpos u otros biomarcadores. [21, 22].

El Ministerio de Salud ha adoptado diversas medidas para el control del COVID-19, entre las que tenemos está el diagnóstico molecular para la detección de SARS-CoV-2 (COVID-19) mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real y el RT-LAMP. A través de sus laboratorios de referencia nacional, el Centro Nacional de Salud Pública es el órgano de línea del INS, responsable de desarrollar y aplicar tecnologías adecuadas para el diagnóstico de enfermedades transmisibles y no transmisibles, contribuyendo con criterios técnicos para la formulación de políticas que orienten la atención de la salud en el área de su competencia.

Una de las técnicas moleculares de detección y amplificación de ácidos nucleicos, es decir de material genético, ARN, del SARS-CoV-2 en distintas muestras biológicas clínicas es la reacción en





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR o qRT-PCR si es cuantificada).

La recolección de la muestra es muy importante para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Si la muestra no es recolectada adecuadamente puede llevar a resultados falsos o no concluyentes. Por lo que, la CDC recomiendan recolectar y analizar una muestra de las vías respiratorias superiores. Siendo las muestras nasofaríngeas y oro faríngeas las más utilizadas para el COVID-19. Además, analizar muestras del tracto respiratorio inferior también es una opción. Muestras de esputo no se recomienda debido a la posibilidad de producción de aerosol durante el procedimiento. Se puede recolectar un aspirado de tracto respiratorio inferior o una muestra de lavado bronco alveolar, bajo ciertas circunstancias clínicas, como en ventilación mecánica invasiva (5).

Las medidas de bioseguridad que se debe utilizar para la recolección de las muestras se deben realizar según las recomendaciones oficiales de la OMS y Ministerio de Salud; a través de un equipo de protección personal (EPP) para la prevención de infección por microorganismos transmitidos por gotas y por contacto que incluye la bata impermeable a fluidos, mascarilla FFP2, guantes y protección ocular (gafas o pantalla facial). Además, la recolección de muestras de vías respiratorias inferiores es alto el riesgo de contagio por lo que, produce aerosoles y debe realizarse con las medidas de bioseguridad adecuada. Así mismo, se deben realizarse en una habitación adecuadamente ventilada: como mínimo, ventilación natural con un flujo de aire de al menos 160 litros/segundo por paciente, o habitaciones de presión negativa con al menos 12 cambios de aire por hora (7).

La carga viral en nariz y faringe va incrementando desde el inicio de la infección hasta alrededor del 7º día y va disminuyendo a partir de ese día, pudiendo detectarse ARN viral tras la desaparición de los síntomas por un tiempo aún indeterminado. Se puede detectar ARN viral desde unos días antes de la aparición de los síntomas por RT-PCR, aumentando la probabilidad de positividad hasta ser máxima alrededor del 7º día y disminuyendo a partir de ahí hasta aproximadamente el final de la segunda semana. Por lo tanto, en los primeros días del periodo de incubación y tras la desaparición de los síntomas la carga viral el umbral de detección puede ser muy baja y podría no ser detectada por la PCR (6).

Múltiples estudios han manifestado, que las pruebas moleculares basadas en amplificación isotérmica mediada en lazo de transcriptasa inversa (RT-LAMP) podrían tener mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas RT-PCR, además de ser más rápidas y no requerir reactivos e insumos costosos (4).





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLOGICA

“MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR”

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

Las pruebas RT-LAMP identifican con mayor frecuencia el gen N, seguido de los genes ORF1a y N, gen RdRp, gen ORF1a y genes ORF1ab y S. En comparación con RT-PCR, las pruebas RT-LAMP desarrolladas en los estudios identificados mostraron una sensibilidad entre 80% y 100%, y una especificidad entre 73% y 100% para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (2).

Las pruebas moleculares son los más sensibles de los métodos disponibles (7). Es una técnica de referencia y elección para el diagnóstico de COVID-19, ensayo de primera línea de despistaje, con una tasa de aciertos del 95%, o sea una especificidad de casi el 100% y sin reactivada cruzada con otros virus y coronavirus (8).

La estrategia más eficaz para diagnosticar el COVID-19 en pacientes sospechosos debe comparar los hallazgos de la RT-PCR con datos clínicos y epidemiológicos (probabilidad de exposición, síntomas y signos), junto con el diagnóstico por imágenes como la Radiografía torácica o TAC de Tórax, siendo este último el más sensible. A veces, las alteraciones radiológicas en el COVID-19 se presentan más temprano que la positividad de la RT-PCR. Por lo que, se debe repetir la RT-PCR en pacientes con uno o más resultados negativos con alta sospecha de COVID-19 (9).

La amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (11) (RT-LAMP, del inglés reverse transcription loop-mediated isothermal amplification), una nueva técnica de amplificación y detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de agentes infecciosos. Tiene las ventajas de funcionar a una temperatura constante, ser menos compleja y precisar menos energía que la PCR convencional (12).

Tomando en cuenta el escenario pandémico actual por COVID-19 y las condiciones limitadas de infraestructura y personal especializado para diagnóstico confirmatorio de laboratorio a nivel nacional. LAMP resulta ser una de las alternativas más adecuadas para la detección molecular del virus SARS-CoV-2 (13).

Posterior al Proceso de transferencia tecnológica del método en mención, se deberá elaborar la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar del Método de Transcripción Reversa – Amplificación Isotérmica por fluorescencia mediada por Lazo (RT-LAMP) con la finalidad de realizar la Detección molecular del virus SARS – CoV – 2, en el Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular -Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular - del Hospital Nacional Hipólito Unanue, para el diagnóstico de Covid-19, de pacientes sospechosos de esta enfermedad,





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGÍA CLÍNICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGÍA,
INMUNOLOGÍA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

cumpliendo con las disposiciones y requisitos exigidos por el Instituto Nacional de Salud y el Ministerio de Salud.

Este proceso de Transferencia Tecnológica se inició con la capacitación del personal del laboratorio del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica - Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular - del Hospital Nacional Hipólito Unanue, y se entregó, con fecha 21/09/2020, la constancia de transferencia tecnológica para la detección molecular del virus SARS –CoV-2, por haber cumplido satisfactoriamente los requisitos para realizar el método de transcripción reversa – amplificación isotérmica por fluorescencia mediada por lazo (RT-LAMP), para la detección del virus SARS-CoV-2, en pacientes con sospecha de Covid-19 ¹⁴.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contar con una Guía de Procedimiento Operativo Estandarizado Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia Mediada por Lazo (Rt Lamp) para la Detección Molecular De Sars-Cov2

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Garantizar la estandarización del Procedimiento Operativo de Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia Mediada por Lazo (Rt Lamp) para la Detección Molecular De Sars-Cov2
- Proporcionar el desarrollo eficaz del Procedimiento Operativo de Transcripción Reversa-Amplificación Isotérmica por Fluorescencia Mediada por Lazo (Rt Lamp) para la Detección Molecular De Sars-Cov2

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente Procedimiento Operativo Estándar del Método de Transcripción Reversa – Amplificación Isotérmica por fluorescencia mediada por Lazo (RT-LAMP) para la Detección molecular del SARS – CoV – 2, deberá ser aplicado en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular del Hospital Nacional Hipólito Unanue, donde el personal profesional Biólogo y técnico de laboratorio del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular, ejecutará el ensayo con muestras humanas respiratorias de hisopado nasal y faríngeo, para la detección in vitro del genoma (15).





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGÍA CLÍNICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGÍA,
INMUNOLOGÍA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

IV. NOMBRE DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

PRUEBA RT-LAMP PARA DETECTAR EL VIRUS SARS-COV-2

Código CPMS

- Prueba Molecular PCR : 87635
- Prueba Rápida Serológica : 87635.01

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. Definiciones operativas

Primer o cebador: Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementario y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Para la RT-LAMP se utilizan 3 juegos de primers los cuales son: FIB, BIP, F3, B3, LF, LB.

RT – LAMP: La amplificación isotérmica mediada por bucle (lazo) de transcripción inversa es un método de amplificación de ácido nucleico de un paso (una sola temperatura) para multiplicar secuencias específicas de ARN. Se utiliza para diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por virus ARN.

5.1.1. Siglas

RT – LAMP: Transcripción Reversa – Amplificación Isotérmica Mediana por Lazo.

5.2. Fundamento del método

La transcripción reversa acoplada a la amplificación mediada por lazo (RT- LAMP), permite el uso de ARN como molde, la detección y amplificación de ARN de coronavirus COVID-19.

El ARN es transcrito de forma inversa a ADN complementario (cADN) y amplificado, mediante cebadores de amplificación específicos, sondas fluorescentes específicas y polimerasas de ADN con alta actividad de transcriptasa inversa, las cuales realizan su actividad a una temperatura de 65°C (reacción isotérmica), y la sonda de fluorescencia se unirá específicamente al objetivo para producir la señal de fluorescencia para determinar el resultado de la prueba automáticamente.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

VI. CONSIDERACIONES ESPECIFICAS

6.1. Desarrollo del método de ensayo

6.1.1. Aspecto de bioseguridad

La prueba de RT-LAMP en tiempo real se realiza en el laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del CENEX del HNHU), en ambientes de Nivel de Bioseguridad II, según lo detallado en el ITT-CNSP-455: Instrucciones de bioseguridad para el laboratorio de microbiología y biomedicina del centro nacional de salud pública.

Para el desarrollo de esta técnica se deben de tomar en cuenta la disponibilidad de 2 ambientes: 1) Área de alicuotado y inculo de la muestra en el cartucho 2) Área de procesamiento por RT-LAMP automatizado.

6.1.2. Tipos de muestras

- Muestras primarias Hisopado nasal y faríngeo.
- Considerar otros aspectos de acuerdo con el ITT-CNSP-385: Obtención, conservación y envío de muestras para el diagnóstico de virus respiratorio.2

6.1.3. Equipos e insumos requeridos (trazabilidad metrológica)

6.1.3.1. Equipos / instrumentos

- Cabina de bioseguridad clase IIA.
- Analizador de Amplificación y detección de Ácidos Nucleicos
- Refrigeradora 2 a 8°C.
- Congelador -20 °C
- Vórtex
- Micropipeta de 100 – 1000 µL
- Pipeta de Transferencia 0-3 ml
- Soporte de Micropipeta

6.1.3.2. Insumos

6.1.3.2.1. Materiales

- Puntas con filtro estériles de 1000 µL
- Gradilla para tubos de 1.5 mL





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLOGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

- Gradilla para tubos de 0.2 mL
- Tubos para centrifuga de 1.5 mL libres de ARNasas y ADNasas.
- Cajas Criogénicas

6.1.3.2.2. Reactivos

- Kit de diagnóstico para ARN de nuevo Coronavirus (2019-nCoV)

6.2. Especificaciones técnicas

6.2.1 Criterios de la prueba:

Cualitativa

- Negativo
- Positivo

6.2.2 Interferencias y reacciones cruzadas

- Muestras que no se encuentran en cadena de frio.
- Muestras contaminadas.
- Muestras con hisopos de madera o alginato.
- Condiciones Ambientales
- Baja concentración de ARN.

6.2.3. Fuentes potenciales de variabilidad

- Almacenamiento inadecuado de reactivos.

6.2.4 Pre analítica: Técnico de Laboratorio

- Realizar la recepción las muestras HNF y fichas de investigación Clínica Epidemiológica COVID-19 para Prueba Molecular RT-LAMP automatizado.
- Controlar y registrar de temperatura de muestras HNF recepcionadas. (T° de 2 a 8 °C).
- Conservar la muestra de inmediato (T° de 2 a 8 °C), en nivel 2.
- Revisar, filtrar y digitar lo datos de las Fichas Epidemiológicas COVID-19 al sistema Netlab v2 (INS).
- Digitar los datos en la Base de Datos de Prueba Molecular Covid-19.
- Elaborar el listado de trabajo para proceso en Nivel II.
- Muestras de HNF ingresadas a través de Pastrough





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGÍA CLÍNICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGÍA,
INMUNOLOGÍA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

6.2.5 Analítica: Biólogo

6.2.5.1 Inspección de la Muestra

6.2.5.1.1. Carga de la Muestra

- a) Muestras HNF ingresadas a través de pastrough hacia nivel II para inicio al proceso.
- b) Verificación de muestras HNF con listado de trabajo.
- c) Realizar la limpieza de superficies de trabajo, pipetas y centrifugas con productos como: alcohol 70 % o solución comercial que elimine contaminantes, como ácido nucleico para minimizar el riesgo de contaminación.
- d) Limpiar la cabina de bioseguridad con solución de descontaminación comercial o alcohol de 70% y colocar los materiales mínimos necesarios y pipetas a ser utilizadas e irradiar con luz ultravioleta durante 15 minutos.
- e) Recepcionar y validar la muestra en el sistema Netlabv2.
- f) Rotular crioviales de las muestras HNF.
- g) Alicuotar las muestras en CBS, volumen de 2ml.
- h) Mezclar Bien la solución de extracción de COVID-19-RNA
- i) Cargar el reactivo y la muestra alicuotada a los cartuchos de reacción LAMP.
- j) Anadir 500ul (muestra de prueba de hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos) al cartucho COVID-19, enrosque bien la tapa.
- k) Mezclar suavemente la mezcla de lisis.

6.2.5.1.2. Prueba de funcionamiento

- a) Laboratorio Molecular: El Analizador de Amplificación y detección de Ácidos Nucleicos será limpiado después de su uso con solución de descontaminación (alcohol a 70% o alguna solución comercial que elimine contaminantes).
- b) Los reactivos deben ser previamente descongelados y conservados en cadena de frío.
- c) Mantener temperatura ambiental del laboratorio entre 19 a 25 °C.
- d) Escanear el código QR del cartucho, si no se pudiese, hacerlo manualmente.
- e) Escanear el código de barras o introducir manualmente nombre y código de muestra del paciente.
- f) Colocar el cartucho en la cámara de muestras del instrumento correspondiente, cubra la tapa de la cámara de muestras y haga clic en el botón INICIO de la pantalla táctil del instrumento





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

correspondiente. El instrumento iniciara el procedimiento de prueba y se mostrara la cuenta atrás en la pantalla. Duración total de la prueba 35 min. Incluyendo procesamiento de la muestra durante 10 min y amplificación a 58°C durante 25 min.

- g) Leer e Interpretar los resultados.
- h) Registrar resultados en protocolo.
- i) Otros:
 - Utilizar el formato de Protocolo de trabajo de extracción de ADN/ARN de virus influenza y otros virus respiratorios para registrar los códigos de las muestras: Registro de resultados para LAMP.

6.3. Informe e Interpretación de resultados

Al terminar la prueba, los resultados se mostrarán y se guardarán automáticamente.

Resultado de la Prueba	Interpretación
Positivo	El gen ORF1ab y/o N es Positivo, lo que significa que se detecta el 2019-nCoV ARN en la muestra. Observación: el resultado de la prueba de cualquiera de los dos IC no es necesario.
Negativo	Tanto el gen ORF1ab y/o N se reportan como Negativo, y el ICr y/o ICl es positivo, lo que significa que no se detecta en la muestra el ARN 2019-nCoV.
Inválido	El gen ORF1ab, N, ICr e ICl son todos negativos, lo que significa que la prueba falla en la detección del 2019-nCoV ARN o ARNm GAPDH humano.
Sin resultados	Datos insuficientes para el análisis,

- El analista registra los resultados en el formato de: Registro de resultados para LAMP, el registro es revisado por un profesional autorizado por el responsable de laboratorio, quien deja evidencia de la revisión del registro colocando un check en la columna de resultado final, (si hubiera alguna observación se comunica al analista quien toma las acciones correspondientes).
- Luego, se entrega el registro de resultado al analista para el ingreso en el sistema informático NetLab2. Finalmente, el personal autorizado para la revisión realiza la validación en el





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

sistema Netlab2 dejando evidencia de la acción en la columna final del Registro de resultados para LAMP.

6.4. Post Analítica: Medico Patólogo Clínico

- a) Supervisar, ejecutar y coordinar las actividades Técnico-Administrativas y asistenciales del laboratorio Cenex.
- b) Realizar y supervisar el control del Calidad de Prueba Molecular RT-LAMP COVID-19.
- c) Verificación y/o Supervisión y Validación de los resultados de Prueba Molecular RT-LAMP COVID-19.
- d) Reporte de resultados de pacientes (Base Excel COVID y protocolo)
- e) Reporte Estadístico de Prueba Molecular LAMP COVID19
- f) Coordinación externa en INS y DIRIS LE sobre prueba Molecular COVID-19

6.5. Formularios

- Protocolo de trabajo de extracción de ADN/ARN de virus Influenza y otros virus respiratorios (ver anexo 3).
- Registro de resultados para LAMP (ver anexo 4).

6.6. Responsabilidades

- a) **Del Médico Patólogo Clínico:** Coordinar y Supervisar las etapas preanalítica, analítica y post-analítica de la Prueba Molecular (RT-LAMP) , para la detección del virus SARS-COV-2
- **En la etapa preanalítica:**
- 1.- Supervisar del registro de datos de las fichas epidemiológicas
 - 2.- Supervisar del cumplimiento de los criterios de aceptación y rechazo de las muestras de hisopado nasal y faríngeo.
 - 3.- Supervisar del Ingreso de datos al Sistema informático NETLABv2 del INS.
- **En la etapa analítica:**
- 4.- Supervisar del proceso de RT-LAMP, según POE.
 - 5.- Supervisar de la elaboración de los protocolos de extracción y de resultado





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLOGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

- En la etapa pos-analítica:

- 6.- Realizar la correlación clínico-laboratorio de los resultados emitidos en cada protocolo de LAMP.
- 7.- Verificar y Validar de resultados en el sistema informático NETLABv2 del INS (si hubiera alguna observación se comunica al analista quien toma las acciones correspondientes).
- 8.- Entregar de reporte estadístico diario de las muestras tomadas, procesadas con sus respectivos resultados en físico y a través de correo electrónico.
- 9.- Envío de reporte de consumo diario de medios de transporte viral a la Diris Lima Este

b) Del Biólogo: Responsables del Proceso Analítico de Prueba Molecular (RT-LAMP), de la lectura e interpretación de los resultados

- 1.- Preparar del protocolo y Alicuotar de las muestras de hisopado nasofaríngeo en viales.
- 2.- Cargar reactivo y muestra alicuotada a los cartuchos de Reacción LAMP.
- 3.- Ingresar los cartuchos a los equipos de Amplificación isotérmica.
- 4.- Leer e interpretar los resultados
- 5.- Registrar de los resultados en el sistema informático NETLABv2 para la validación respectiva.
- 6.- Entregar diariamente del reporte de consumo de kit de reactivo Lamp, para el envío al INS.

c) Del Técnico de Laboratorio: Responsables de la Recepción de Muestras de Hisopado Nasofaríngeo para el proceso de la prueba molecular RT-LAMP, para la detección del virus SARS-COV-2

- 1.- Revisar que las fichas epidemiológicas tengan datos completos
- 2.- Revisar que las muestras cumplan con criterios de aceptación.
- 3.- Cumplir con el registro adecuado de datos al Sistema NETLABv2 del INS.
- 4.- Elaboración de base de datos de pacientes ingresados de acuerdo a cuadros estandarizados en el servicio.
- 5.- Impresión de resultados y entrega con cargo a los servicios solicitantes.





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

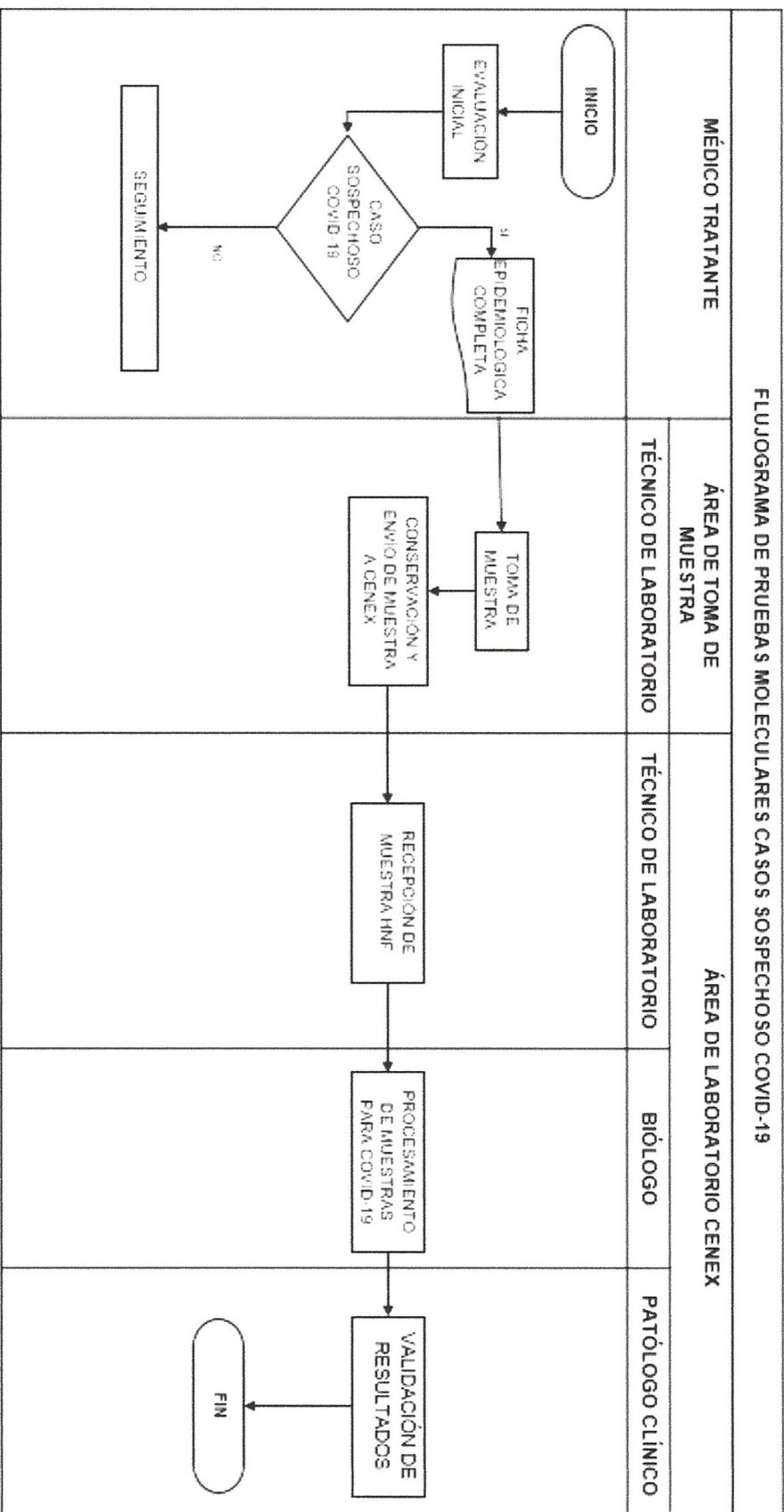
VII. Recomendaciones

- Es una prueba eficaz y rápida, por lo que permite una detección temprana del SARS-CoV-2 y establecer medidas efectivas de control.
- Esta prueba se ha determinado sólo para los tipos de muestra mencionados anteriormente.
- La correcta toma de muestra es importante para evitar los falsos negativos.
- En necesario el correcto transporte y conservación de muestras según normativa vigente.
- Las mutaciones en los sectores diana de las pruebas RT-LAMP podría impedir la detección del virus.



VIII. Anexos

ANEXOS 1: Flujograma de pruebas moleculares de casos sospechosos de COVID-19.





PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLOGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

ANEXO 2: Plantilla de Trabajo: RT-LAMP Automatizado para SARS-Cov-2

	FORMULARIO
	PLANTILLA DE TRABAJO: RT-LAMP AUTOMATIZADO PARA SARS-CoV-2

Área: Lab. NBS - III - Hosp. Nacional Hipólito Unanue

Responsable ALICUOTADO:

Responsable CARGADO:

LOTE:

SERIE DEL KIT :

Diagnostic kit for Novel-Coronavirus (2019-nCov) RNA (Isothermal Amplification-Real Time Fluorescence Assay) EasyNAT

Fecha de proceso: _____ N° de Proceso:

Limpieza de equipo con alcohol de 70%



PERÚ

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional
Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y
ANATOMÍA PATOLOGICA

"MICROBIOLOGIA,
INMUNOLOGIA Y
BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA POR FLUORESCENCIA MEDIADA POR LAZO (RT LAMP) PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE SARS-COV2

- Richardson, S., et al., Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. JAMA, 2020.
- Wyllie, A.L., et al., Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. N Engl J Med, 2020.
- OMS. R&D blueprint and COVID-19. 2020 [citado 2020 16 de julio de 2020]; disponible en <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>.
- CLOPID-R. Global research collaboration for infectious disease preparedness, preparedness, data sharing. 2020, 16 July 2020]; disponible en <https://www.glopid-r.org/our-work/data-sharing/>

Ministerio de Salud
Hospital Nacional Hipólito Unanue

Dra. Diana E. Picoy Romero