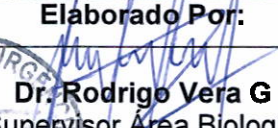




	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP				
	CÓDIGO RT-PCR01	VERSIÓN 01	FECHA 06/2021	VIGENCIA 3 años	N° PÁGINAS 25




PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS- CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP

Elaborado Por:  Dr. Rodrigo Vera G Supervisor Área Biología Molecular Lab. Clínico  TM. Daniela Herrera Coordinadora Lab. Clínico  TM. Nicole Agüero Sección Biología Molecular  EU. Maria Teresa Mozo IAAS	Revisado Por:  Dr. Sergio Vargas Jefe Técnico Laboratorio Clínico  Dr. Claudio Vargas Epidemiólogo HUAP  Dr. Dov Gruen Sub-Director Médico HUAP  QF. Stephan Jarpa Jefe Unidad de Calidad y Seguridad del paciente	Aprobado Por:  Dr. Luis Carrasco Director
Fecha: Junio 2021	Fecha: Junio 2021	Fecha: Junio 2021


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 1 de 25

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	5
III. ALCANCE	5
IV. DEFINICIONES.....	6
V. RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN	7
VI. DESARROLLO DEL PROCESO	8
1. CRITERIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR PARA SARS-CoV-2.	8
3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	11
4. INGRESO DE MUESTRAS.....	12
5. HORARIO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS Y TIEMPO DE VALIDACIÓN DEL RESULTADO.....	12
6. RECHAZO DE MUESTRAS.....	13
7. ÁREAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO	14
8. FLUJO DE TRABAJO UNIDIRECCIONAL EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR	14
9. ETAPA ANALÍTICA. EN LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	15
A. Sala Pre-PCR.....	15
B. Sala Post-PCR	15
a. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	15
b. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS POST-ANÁLISIS Y ELIMINACIÓN DE DESECHOS.....	16
10. ETAPA POST-ANALÍTICA.....	17

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 2 de 25

a.	RESULTADOS Y CONFECCIÓN DE INFORMES	17
b.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	19
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
VIII.	ANEXOS	22
	ANEXO 1. FLUJO DE TRABAJO Y ENTREGA DE RESULTADOS	22
	ANEXO 2. FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN RT-PCR.....	23
	ANEXO 3. ENTREGA DE RESULTADO PLATAFORMA WEBLAB	24
	ANEXO 4. HOJA DE CONTROL DE CAMBIOS	25


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 3 de 25

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 ha puesto a nuestro país frente a un gran desafío en la pesquisa, detección y diagnóstico de este virus. En respuesta, y bajo las sugerencias realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Chile bajo la dirección del Ministerio de Salud, desarrolló un manual operativo de Testeo, Trazabilidad y Aislamiento (TTA) cuya estrategia es la detención de la propagación de la enfermedad mediante la investigación de casos, la trazabilidad de los contactos y el aislamiento oportuno de las personas contagiadas o en riesgo de contagio(1). En este sentido, la estrategia testeo masivo en nuestro país ha mostrado ser la más alta entre los países de América del sur y ha posicionado a Chile con las tasas de mortalidad más bajas (2). Reconociendo entonces, que el testeo de la población es una base fundamental para la determinación de las personas infectadas por SARS-CoV-2 y el desarrollo de las estrategias TTA (1).


En este lineamiento, el Laboratorio Clínico HUAP tiene por objetivo la implementación del Área de Biología Molecular para el análisis “*in vitro*” de SARS-CoV-2 mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, el cual es fundamental para contribuir a la ampliación de la capacidad de testeo de nuestra población con la entrega de resultados confiables y oportunos que permitan la óptima trazabilidad, procesos internos y traslados a otros centros de los pacientes aislamiento diagnosticados con la patología COVID-19.

La técnica de diagnóstico molecular de RT-PCR en tiempo real fue declarada por la Organización Mundial de la Salud como el “*gold standard*” para la detección de SARS-CoV-2 desde muestras respiratorias (3). En nuestro país, esta medida fue adoptada y declarada en el diario nacional el día 3 de junio del 2020 por parte del Ministerio de Salud (4). De forma simplificada este método se basa en la retrotranscripción (RT) que permite conversión del material genético viral (RNA) en cDNA (DNA complementario). De esta forma, el cDNA viral puede ser reconocido por moléculas (*primers*) que se unen a genes específicos de componentes virales para detectar su presencia. Actualmente los genes que se utilizan en la técnica de RT-

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 4 de 25

PCRson RdRP (RNA polimerasa dependiente de RNA), S (Glicoproteína de superficie *spike*), E (proteína pequeña de envoltura), M (proteína de matriz) y N (proteína de la nucleocápside) (5). Posterior al reconocimiento de estos genes, la reacción de PCR genera productos de amplificación que entregan una señal fluorescente la cual va aumentando en el tiempo y se puede monitorizar en tiempo real. Lo que finalmente se traduce en la detección del virus SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real (6).

El presente manual constituye una guía de procedimientos destinados a los funcionarios que participan en todas las etapas del análisis de la muestra, desde la etapa pre-analítica, analítica y post-analítica, para definir el flujo del procesamiento de la muestra, desde a que pacientes califican para la toma de muestra hasta la entrega del informe diagnóstico, además de, aspectos técnicos relevantes como las condiciones de transporte, almacenamiento, criterios de rechazo de muestra y registro administrativo de las muestras procesadas.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 5 de 25

II. OBJETIVOS

General


Establecer los procesos y flujos de trabajo para el diagnóstico de la presencia del virus SARS-CoV-2 desde muestras respiratorias a través de la técnica RT-PCR en tiempo real.

Específicos

- Definir los criterios y procesos relacionados con la toma de muestra.
- Puntualizar los flujos de trabajo en el área de Biología Molecular.
- Definir los flujos de entrega de notificación resultados al paciente y autoridad sanitaria.

III. ALCANCE

El alcance de este protocolo es para todas aquellas Unidades o Servicios Clínicos relacionados con la atención de pacientes o funcionarios que requieren un diagnóstico de COVID-19 a través de la utilización de RT-PCR en tiempo real.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 6 de 25

IV. DEFINICIONES

RT-PCR: *Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa).

MUESTRA: Hisopado nasofaríngeo obtenida con técnica descrita por MINSAL y conservada en medio de transporte entregado por el laboratorio.

LIS: Sistema Informático de laboratorio

FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN: Documento normalizado que emite el profesional solicitante y es remitido al laboratorio para la realización de exámenes.

TUBO PRIMARIO: Tubo contenedor de la muestra nasofaríngea.

ELUIDO: Ácido nucleico extraído de muestra del tubo primario.


RESULTADO POSITIVO: SARS-CoV-2 detectado.

RESULTADO NEGATIVO: SARS-CoV-2 no detectado.

RESULTADO NO CONCLUYENTE: No se puede afirmar o descartar la presencia del virus SARS-CoV-2. Por lo tanto, se sugiere una nueva toma de muestra para repetición de la prueba con 48 horas de diferencia.

RESULTADO NO VÁLIDO: Solicitar nueva muestra, ya que existe evidencia de pérdida de su integridad o mala ejecución en toma de muestra.

EPP: Elementos de protección personal.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 7 de 25

V. RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN

Responsable: Médico

Función: selección de paciente según criterios clínicos y flujos locales, realización de solicitud de toma de muestra para RT-PCR SARS-CoV-2, ingreso de información a plataforma EPIVIGILA.

Responsable: Unidad de Medicina Física y Rehabilitación

Función: solicitud de insumos de toma de muestra, realización de la toma de muestra, ingreso de información a Plataforma de Toma de Muestras, envío de la muestra a Laboratorio Clínico.

Responsable: Tecnólogo Médico 1 del Área Biología Molecular.


Función: Recepción de la muestra y realización de técnicas diagnósticas por RT-PCR en tiempo real, además de su análisis, validación y entrega del resultado. Notificación en plataformas de autoridades sanitarias.

Responsable: Tecnólogo Médico 2 del Área Biología Molecular.

Función: Recepción de la muestra y realización de técnicas diagnósticas por RT-PCR en tiempo real, además de su análisis, validación y entrega del resultado. Apoyo en el chequeo de muestras ingresadas al proceso de extracción, amplificación y entrega de resultados. Notificación en plataformas de autoridades sanitarias.

Responsable: Supervisor Área Biología Molecular.

Función: Coordinación con autoridades MINSAL (DIGERA, ISP, SSMC) y Jefes de Servicio HUAP durante el transcurso de la implementación y realización de la técnica.


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 8 de 25

VI. DESARROLLO DEL PROCESO

1. CRITERIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR PARA SARS-CoV-2.

La prueba RT-PCR se implementa en el Hospital de Urgencia Asistencia Pública con el fin de convertirse en un apoyo al diagnóstico oportuno de la enfermedad COVID-19. Los criterios para la realización de esta prueba son las siguientes:

- Pacientes o funcionarios con definición de caso sospechoso con más de 7 días de evolución.
- Búsqueda activa en caso de BROTE (definido por la unidad de IAAS).
- Traslados de pacientes a otros centros clínicos o de servicio social (ej: fundaciones) que soliciten el examen.
- Pacientes ambulatorios que tengan programada una cirugía electiva. Se solicitará el examen con 48 hrs de anticipación.
- Pacientes ambulatorios que califiquen como definición de caso sospechoso, se les emitirá licencia para espera de resultado en domicilio.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 9 de 25

2. TOMA DE MUESTRA


Para iniciar la toma de muestra, previamente el médico debe solicitar el examen mediante el FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN RT-PCR (Anexo 3). Este documento debe contener toda la información que se solicita, además de la información de contacto hacia la Unidad donde se ubica el paciente para la notificación oportuna del resultado. Si es paciente ambulatorio la Unidad de Alta Asistida se encargará de esta notificación.

Inicialmente la solicitud la debe rellenar y firmar el médico solicitante, así como la creación del caso en la plataforma EPIVIGILA, información a indicar en el documento.

Posteriormente el equipo de kinesiólogos de la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación o de Kinesiología Intensiva y Soporte Ventilatorio, recibirá la orden, tomará la muestra y la llevará al módulo de EPIVIGILA (1er piso) para obtener ID desde la Plataforma de Toma de Muestra (<https://tomademuestras.minsal.cl/>) que incorporarán al formulario.

La toma de muestra consistirá en un hisopado nasofaríngeo (HNF) que permite identificar la presencia de ARN viral desde componentes estructurales específicos del virus SARS-CoV-2 para diagnosticar de COVID-19. La toma de muestra nasofaríngea se llevará a cabo bajo el protocolo "Guía para la toma de muestras respiratorias en pacientes con sospecha de infección por coronavirus" (8), que se detalla mas adelante.

En el área de recepción de muestras del Laboratorio Clínico, se entregarán previamente los materiales para la toma de muestra al equipo clínico encargado del proceso de recolección de muestras.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 10 de 25

El procedimiento de Toma de Muestra se describe a continuación.

- Verificar medidas de bioseguridad. Colocarse EPP correspondientes (guantes, pecheras, mascarilla N95, escudo facial).
- Verificar los insumos necesarios para la toma de muestra (Fig.1).
- Poner la cabeza del paciente en un ángulo de 70 grados (Fig 2).
- Introducir hisopo en la fosa nasal. Deslizar el hisopo por la mucosa del piso de la fosa nasal hasta tocar la pared posterior de la faringe (no introducir el hisopo hacia arriba siguiendo la forma de la nariz, sino hacia atrás siguiendo el piso de la nariz) (Fig 2).
- Frotar el hisopo en la nasofaringe, girando para obtener una buena calidad de muestra.
- Repetir el procedimiento con el mismo hisopo en la otra fosa nasal.
- Retirar el hisopo, y ponerlo en tubo con medio de transporte, cuidando que quede sumergido en el líquido.
- Si el hisopo no cabe entero en el frasco debe cortarse o quebrarse para permitir el cierre.
- Rotular la muestra con los datos del paciente (Nombre, RUT o DAU en caso de extranjeros, fecha y tipo de examen)
- Mantener refrigerada la muestra (2-8 °C) hasta su envío al Laboratorio Clínico, según horarios descritos mas adelante.

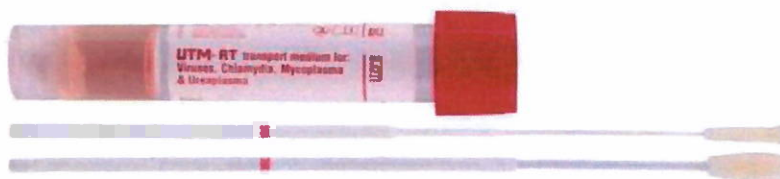



Figura 1. Recolección de muestra desde hisopado nasofaríngeo. Hisopo nasofaríngeo + medio de transporte viral.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 11 de 25

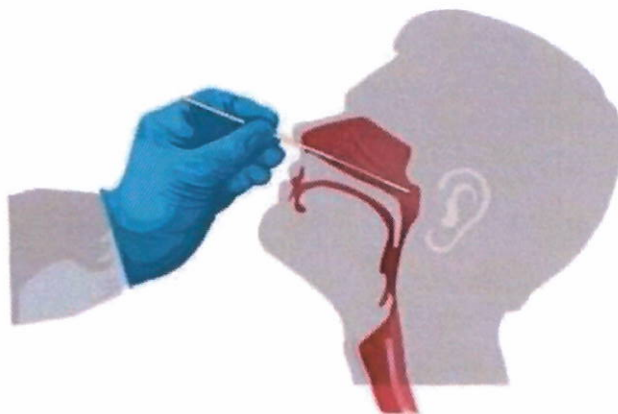



Figura 2. Recolección de muestra desde hisopado nasofaríngeo.

3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Debe realizarse de acuerdo al sistema de triple embalaje según "Guía Técnica para el transporte de Sustancias Infecciosas hacia el ISP" (9) utilizando unidades refrigerantes para la mantención de la temperatura entre 2-8°C hasta antes de su envío, que no debe superar las 72 horas desde su recolección. Si no se procesan dentro de ese periodo deben ser congeladas a -70°C. La muestra debe ir acompañada del FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN RT-PCR con todos los datos exigidos.

Los rechazos se informarán al médico solicitante o responsable vía telefónica/correo electrónico, y se registrará en la plataforma toma de muestra. Se eliminarán las muestras que no cumplan con los requisitos descritos más adelante.


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 12 de 25

4. INGRESO DE MUESTRAS

- Las muestras se recibirán en la ventanilla de recepción de muestras del Laboratorio Clínico, y debe venir en un recipiente (*cooler*) exclusivo para este tipo de muestras respiratorias (hisopado nasofaríngeo). El recipiente debe ser de materia rígida, lavable, con tapa y manecilla que asegure un transporte seguro.
- Las muestras se ingresarán al sistema informático del laboratorio (LIS) y además se cotejará el correcto ingreso y derivación en plataforma Toma de Muestra de MINSAL.
- A cada muestra se le asignará una codificación interna de trabajo diario, para su manejo en fase analítica, desde el número 1 en adelante.
- Se llevará registro en planilla interna que correlacione entre el número de petición y codificación interna.
- Una vez cerrada la tanda del día, se reinicia la codificación interna de trabajo diario y se almacenan para procesar en el siguiente turno.
- Las muestras serán almacenadas transitoriamente en un refrigerador a 2-8°C de uso exclusivo para estas muestras.

5. HORARIO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS Y TIEMPO DE VALIDACIÓN DEL RESULTADO.

Todas las muestras deben ser enviadas por el equipo de la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, quienes verificarán el correcto envío de las muestras al laboratorio. Muestras desde otras unidades deben ser coordinadas con esta unidad.


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 13 de 25

El horario de envío de muestras al laboratorio deberá ser coordinado con la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación, que variará según la demanda de solicitud de este examen.

6. RECHAZO DE MUESTRAS

Las muestras podrán ser rechazadas según las siguientes condiciones:

- a. Problemas de rotulación de la muestra
- b. Muestra sin rotular
- c. Discordancia con datos (Nombre/RUT paciente).
- d. Rotulo/Formulario ilegible
- e. Datos incompletos.
- f. Muestra derramada
- g. Volumen inadecuado
- h. Muestra sin rotular en su interior
- i. Muestra sin formulario
- j. Muestra no ingresada en plataforma de toma de muestra
- k. Muestra recolectada en envase incorrecto

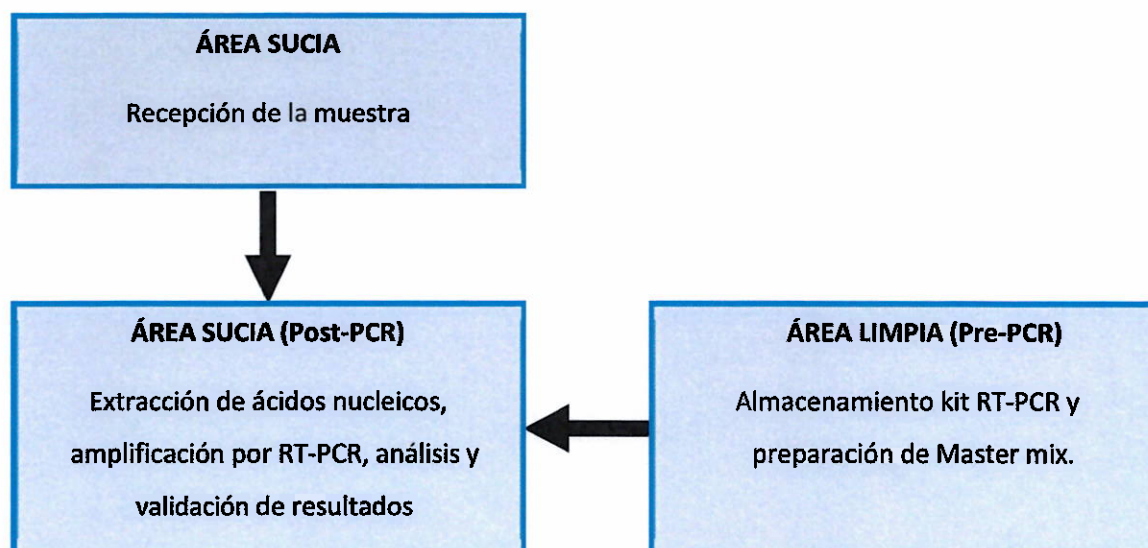
	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 14 de 25


7. ÁREAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO

- Sala de recepción de muestra.
- Área limpia: Sala Pre-PCR (A)
- Área sucia: Sala Post-PCR (B)

8. FLUJO DE TRABAJO UNIDIRECCIONAL EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Cada sala cuenta con implementos propios para uso exclusivo dentro de cada área. Asimismo, la Sala Pre-PCR (A) que corresponde al área limpia, posee sistemas de presión positiva y la Sala Post-PCR (B) que corresponde al área sucia, posee sistemas de presión negativa, detallados en los anexos de planimetría y memoria de cálculo de presiones positivas y negativas (Anexo 1 y 2), cumpliendo con todos los aspectos de bioseguridad correspondientes (7).



	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 15 de 25

9. ETAPA ANALÍTICA. EN LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Esta etapa será dividida en dos áreas de trabajo para mantener el flujo unidireccional desde el área más limpia **Sala Pre-PCR (A)**, hacia la más sucia **Sala Post-PCR (B)**, para evitar la contaminación de los reactivos de PCR por ácidos nucleicos provenientes de la manipulación de las muestras (7). Asegurando así la confiabilidad de los resultados obtenidos en la etapa analítica.

A. Sala Pre-PCR


Área de almacenamiento de kit de RT-PCR y preparación de Master mix.

B. Sala Post-PCR

En esta área se reciben y procesan las muestras para la extracción de ácidos nucleicos, luego se realiza la carga de la placa de RT-PCR, se analizan los resultados y se confecciona e informe.

a. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El área de Biología Molecular cuenta con una plataforma de equipamiento **All-in-one** el cual constituye una herramienta automatizada para el procesamiento de muestras. Permitiendo minimizar la manipulación y pipeteo de las muestras evitando problemas de contaminación, así como permitir un mayor nivel de bioseguridad al operario al disminuir los riesgos de derrames o generación de aerosoles. Las tareas que se describen más adelante serán realizadas por los Tecnólogos Médicos 1 y 2 para realizar doble chequeo de etapas críticas de manipulación de las muestras y la carga de estas al equipo NIMBUS.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 16 de 25


Tecnólogo Médico 1	Tecnólogo Médico 2
Recepción, ingreso y etiquetado de las muestras	Doble chequeo de la correspondencia entre el etiquetado y la muestra correcta
Organización y carga de las muestras al equipo	Doble chequeo de la carga en las muestras en sus posiciones correctas
Chequeo del resultado y la posición de PCR correcta dentro de la placa	Doble chequeo del resultado y la posición de PCR correcta dentro de la placa

En el gabinete de bioseguridad con flujo laminar nivel 2 (BSL2 Tipo II Clase A2) se prepararán las muestras para cargarlas al rack del equipo **MICROLAB NIMBUS IVD** que realiza la extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada utilizando el **Kit de Cartucho Universal de STARMag 96 x 4** que preparará automáticamente la placa de PCR. La placa de PCR contiene la muestra del paciente y el mix del **kit de Allplex™ SARS-CoV-2 – Seegene**, capaz de detectar 4 genes diana del virus en un solo pocillo (Gen E, gen RdRP, gen N y gen S). Finalmente, la placa es cargada por el operador en el **termociclador Real-time PCR CFX96™ Dx**, el cual cuenta con 6 canales de detección, lo que permite realizar un análisis de múltiples genes por pocillo de la placa de PCR.

b. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS POST-ANÁLISIS Y ELIMINACIÓN DE DESECHOS

El tubo primario de la muestra se conservará por una semana a -80°C en ultracongelador vertical exclusivo para este fin, en caso de que la muestra sea solicitada por el ISP o para repetición del análisis.

Los eluidos ya analizados igualmente se conservarán a -80°C por un periodo de tres semanas para luego ser eliminados.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 17 de 25

El protocolo de eliminación de las muestras potencialmente infecciosas se basa en el documento institucional Manual de Bioseguridad del Laboratorio Clínico área de Biología Molecular HUAP, por el cual se registrará el personal auxiliar de servicio del laboratorio clínico que retira los desechos.


10. ETAPA POST-ANALÍTICA

a. RESULTADOS Y CONFECCIÓN DE INFORMES

Los datos son analizados mediante el **software Seegene Viewer** que permite el análisis de los datos de la corrida de PCR en tiempo real. Esta información será almacenada con el formato proveniente del termociclador y también descargada en formato Excel para confeccionar un registro de resultados que se guardará con el nombre de "Planilla de registro de resultados" en la carpeta de resultados PCR diariamente. Además se dejará registro de la trazabilidad de las muestras dentro de las etapas de extracción y amplificación, en los documentos Excel "Registro de extracción" y "Registro de amplificación".

Planilla de registro de resultados

Nº de Muestra	ID de Paciente	Podillo	Nombre	Tipo	FAM		Cal Red 610		Quasar 670		HEX		Autointerpretación
					E gene	C(t)	RdRP/S gene	C(t)	N gene	C(t)	IC	C(t)	
		A01											SARS-CoV-2
		B01											SARS-CoV-2
		C01											SARS-CoV-2
		D01											SARS-CoV-2
		E01											-
		F01											-
		G01											-
		H01											-
		A02											Negative Control(-)
		B02											Positive Control(+)


	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 18 de 25

Registro de extracción

FECHA:					
OPERADOR DE CARGA TM 1:	Nicole Agüero				
OPERADOR REVISOR TM 2:	Viviana Orellana				
KIT EXTRACCION: Starmag 96x4 DNA/RNA Viral 200C			Lote: EX1120K70		
Fecha de vencimiento: 08/11/21					
ID PACIENTE	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	FECHA DE EXTRACCION	ESTADO DE LA EXTRACCION	CONTROL INTERNO	
Paciente 1			REALIZADA	VALIDOS	
Paciente 2			PENDIENTE	INVALIDOS	
Paciente 3			REALIZADA	VALIDOS	
Paciente 4			REALIZADA	VALIDOS	

Registro de amplificación

FECHA:							
OPERADOR DE CARGA TM 1:	Nicole Agüero						
OPERADOR REVISOR TM 2:	Viviana Orellana						
KIT AMPLIFICACION: STARMAG Viral DNA/RNA			Lote: EX1120K70				
Fecha de vencimiento: 08/11/21							
ID PACIENTE	CT GENES VIRALES			CONTROL INTERNO	ESTADO DE LA EXTRACCION	CONTROLES DE PCR	RESULTADO
	E	N	RdRP/S				
Paciente 1				AMPLIFICA	PENDIENTE	VALIDOS	NEGATIVO
Paciente 2				NO AMPLIFICA	PENDIENTE	INVALIDOS	INVALIDO
Paciente 3							

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 19 de 25

b. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS


RESULTADO POSITIVO: Amplificación de todos los genes virales, con validación satisfactoria de los controles internos, de extracción y de la técnica de PCR.

RESULTADO NEGATIVO: Ausencia de amplificación de todos los genes virales, con validación satisfactoria de los controles internos, de extracción y de la técnica de PCR.

RESULTADO NO CONCLUYENTE: No amplifican todos los genes virales, con validación satisfactoria de los controles internos, de extracción y de la técnica de PCR. Como medida, se realizará un PCR con el doble del eluido de la muestra (recomendación del fabricante del kit de Allplex™ SARS-CoV-2 – Seegene) y si se mantiene el resultado, se realizará la re-extracción de la muestra para corroborar resultado. Luego de eso, si se mantiene el resultado se informará como **no concluyente**. Por lo que se requerirá una nueva toma de muestra para repetición de la prueba con 48 horas de diferencia. Según la definición de caso del MINSAL el paciente se maneja como positivo si cumple con definición de casos sospechoso.


En el caso de que todos los genes virales se amplifiquen, pero el control interno sea negativo, con validación satisfactoria de los controles de extracción y de la técnica de PCR, el resultado positivo no se invalida. La recomendación del fabricante es diluir la muestra en solución salina (1/3 a 1/10) y repetir la prueba desde el paso de extracción, debido a la sospecha de que la abundancia de los genes virales impide la detección del control interno.

RESULTADO NO VALIDO: No se observa amplificación del control interno, lo que sugiere la pérdida de la integridad de la muestra o problemas ejecución en el procedimiento de toma de muestra.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 20 de 25


VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud. Ord A1 / N° 793 Envía "Guía de la Estrategia Nacional de Testeo, trazabilidad y aislamiento": 2021.
2. Pinheiro, Maria da Conceição N., Freitas Junior, José Aglair Barbosa de, & Carneiro, Saul Rassy. (2020). Situación actual del COVID-19 en Sudamérica. *Revista chilena de infectología*, 37(3), 311-312. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182020000300311>.
3. World Health Organization. (2020). *Laboratory testing for coronavirus disease(COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020* (No. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5). World Health Organization.
4. Resolución Exenta N° 424 del 07 de junio de 2020 "DISPONE MEDIDAS SANITARIAS QUE INDICA POR BROTE DE COVID-19" (Disponible en: <https://www.minsal.cl/wpcontent/uploads/2020/06/1771191.pdf>)
5. Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. (2020). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS nano*, 14(4), 3822–3835. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>)
6. Eftekhari, A., Alipour, M., Chodari, L., Maleki Dizaj, S., Ardalan, M., Samiei, M., Sharifi, S., Zununi Vahed, S., Huseynova, I., Khalilov, R., Ahmadian, E., & Cucchiari, M. (2021). A Comprehensive Review of Detection Methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms*, 9(2), 232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020232>)
7. Recomendaciones para laboratorios que realizan la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): áreas y flujos de trabajo. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile, 2017.:

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 21 de 25

<https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20lab.%20que%20realizan%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20PCR%20%C3%A1reas%20y%20flujos%20v1.pdf>.


8. Guía para la toma de muestras respiratorias de vía aérea alta y baja, en pacientes con sospecha por coronavirus (covid-19) https://www.medicina-intensiva.cl/site/covid/guias/guia_toma_muestras_respiratorias_pacientes_con_sospecha_de_COVID_19.pdf
9. Guía técnica para el transporte de departamento laboratorio biomédico nacional y de referencia sustancias infecciosas hacia el instituto de salud pública. División 6.2 Sustancias Infecciosas. https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/resoluciones/30978_0177-2021.pdf

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 22 de 25


VIII. ANEXOS


ANEXO 1. FLUJO DE TRABAJO Y ENTREGA DE RESULTADOS



	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 23 de 25

ANEXO 2. FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN RT-PCR

 SOLICITUD DE EXAMEN DE LABORATORIO Hospital de Urgencia Asistencia Pública, SSMC		
IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE		
Nombres: Apellido Paterno: Apellido Materno: RUT: Fecha nacimiento: Sexo: <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino Prioridad: <input type="checkbox"/> Hospitalizado <input type="checkbox"/> Funcionario <input type="checkbox"/> Ambulatorio Dirección: Comuna: Teléfono: Nacionalidad: Edad: Previsión: Ciudad: Email:		
PROCEDENCIA		
Hospital: Servicio de Salud: Nombre Médico solicitante: Fono/anexo: Fecha solicitud examen: RUT:		
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA		
Tipo de muestra: <input type="checkbox"/> Aspirado nasofaríngeo <input type="checkbox"/> Lavado broncoalveolar <input type="checkbox"/> Aspirado traqueal <input type="checkbox"/> Torulado nasofaríngeo <input type="checkbox"/> Otros Nombre responsable toma de muestra: Fono/anexo: Fecha/Hora toma de muestra: N° epígrafa: N° ID:		
BIOLOGÍA MOLECULAR		
S/C	RT-PCR SARS CoV-2 (COVID-19)	X
Firma Médico		
USO EXCLUSIVO LABORATORIO Responsable: _____ Fecha y Hora: _____ Observaciones: _____		

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 24 de 25

ANEXO 3. ENTREGA DE RESULTADO PLATAFORMA WEBLAB



HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA
DR. ALEJANDRO DEL RÍO
LABORATORIO CLÍNICO

N° de Petición: **5270844**
Fecha de Recepción: 27/05/2021 11:09
Fecha de Informe: 27/05/2021 11:13
Fecha de Impresión: 27/5/2021 11:17

Nombres: **LJAM**

Apellidos: **DOLL XXX**

R.U.T.: **12345**

Edad : **18**

Sexo: **Hombre**

N° Ficha:

Procedencia: **QUEMADOS**

Sala: **2**

Cama: **3**

Página 1 de 1

Prueba	Resultado	Unidades	Valores de Referencia
--------	-----------	----------	-----------------------



Dr. Sergio Vargas-Salas,
Jefe Laboratorio

MUESTRA: **TORULADO NASOFARINGEO**

Validado por: **NICOLE AGUERO ALFARO**

PCR Coronavirus

Negativo

OBSERVACIÓN

TOMA DE MUESTRA 27/05/2021 09:15


Interpretación de Resultados:

Negativo: No se detectó la presencia de ARN de SARS CoV2 en la muestra.

Positivo: Se detectó la presencia de ARN de SARS CoV2 en la muestra.

No Concluyente: Los resultados no permiten confirmar ni descartar la presencia de ARN de SARS CoV2 en la muestra.

Inválido: La presencia de inhibidores no permitió la realización de la PCR. Se solicita enviar nueva muestra.

	HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA	Código RT-PCR01
	DIRECCIÓN	Versión: 01
	LABORATORIO CLÍNICO	Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años
	PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP	Página 25 de 25

ANEXO 4. HOJA DE CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Cambio	Responsable	Aprobación Unidad de Calidad