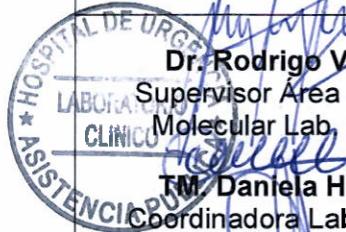
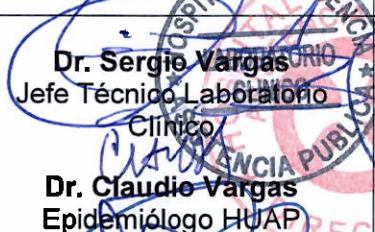


| | | | | | |
|--|--|---------------|------------------|--------------------|------------------|
|  <p>Servicio de Salud Metropolitano Central Ministerio de Salud</p> | PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP | | | | |
| | CÓDIGO RT-PCR01 | VERSIÓN 01 | FECHA 06/2021 | VIGENCIA 3 años | Nº PÁGINAS 25 |



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

| Elaborado Por: | Revisado Por: | Aprobado Por: |
|---|--|---|
|  <p>Dr. Rodrigo Vera G Supervisor Área Biología Molecular Lab. Clínico TM. Daniela Herrera Coordinadora Lab. Clínico</p> |  <p>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</p> |  <p>Dr. Luis Carrasco Director</p> |
|  <p>TM. Nicole Agüero Sección Biología Molecular EU. María Teresa Mozo IAAS</p> | | |
| 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 másalta entre los países de América del sur y ha posicionado a Chile con las tasas de mortalidad más bajas (2). Reconociendo entontes, que el testeo de la población es unabase fundamental para la determinación de las personas infectadas por SARS-CoV-2 yel 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 trasladados 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 pormoléculas (*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 llenar y firmar el medico 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.

- a) Verificar medidas de bioseguridad. Colocarse EPP correspondientes (guantes, pecheras, mascarilla N95, escudo facial).
- b) Verificar los insumos necesarios para la toma de muestra (Fig.1).
- c) Poner la cabeza del paciente en un ángulo de 70 grados (Fig 2).
- d) 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).
- e) Frotar el hisopo en la nasofaringe, girando para obtener una buena calidad de muestra.
- f) Repetir el procedimiento con el mismo hisopo en la otra fosa nasal.
- g) Retirar el hisopo, y ponerlo en tubo con medio de transporte, cuidando que quede sumergido en el líquido.
- h) Si el hisopo no cabe entero en el frasco debe cortarse o quebrarse para permitir el cierre.
- i) Rotular la muestra con los datos del paciente (Nombre, RUT o DAU en caso de extranjeros, fecha y tipo de examen)
- j) 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 |

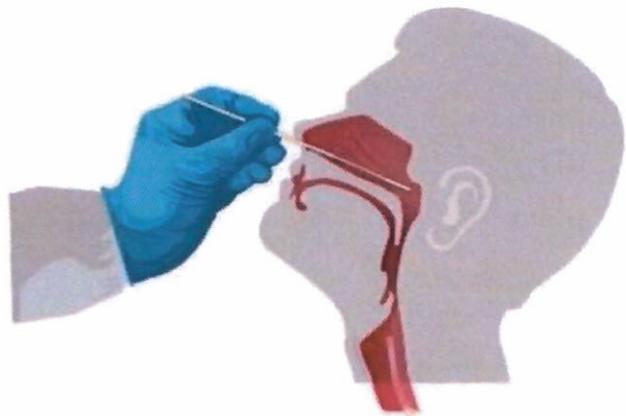


Figura 2. Recolección de muestra desde hisopado nasofaríngeo.

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

- a) 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.
- b) 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.
- c) A cada muestra se le asignará una codificación interna de trabajo diario, para su manejo en fase analítica, desde el número 1 en adelante.
- d) Se llevará registro en planilla interna que correlacione entre el número de petición y codificación interna.
- e) Una vez cerrada la tanda del día, se reinicia la codificación interna de trabajo diario y se almacenan para procesar en el siguiente turno.
- f) 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

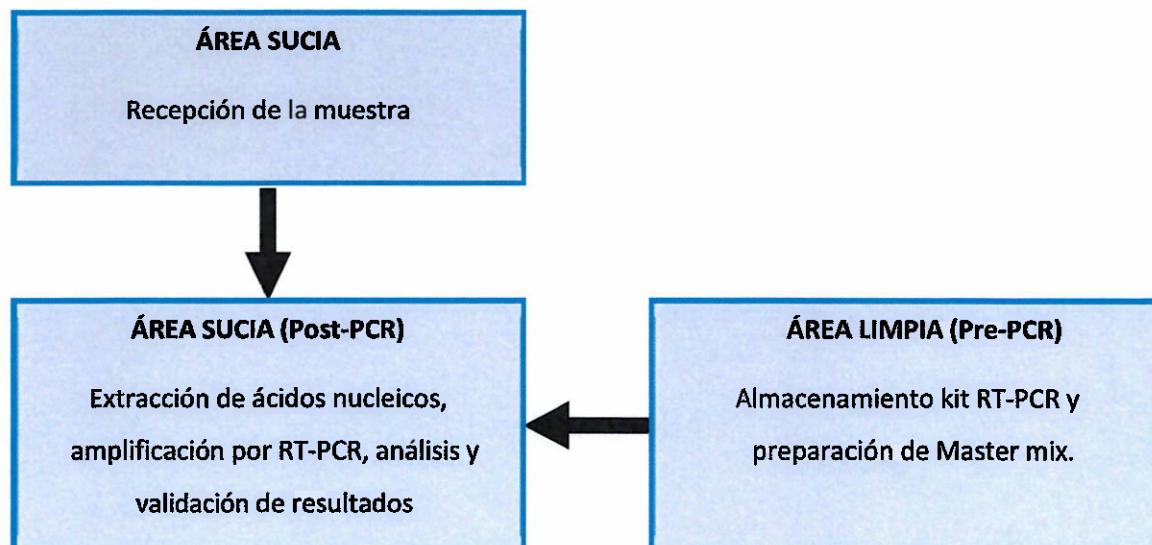
| | | |
|---|---|------------------------------------|
|  | HOSPITAL DE URGENCIA ASISTENCIA PÚBLICA | Código RT-PCR01 |
| | DIRECCIÓN | Versión: 01 |
| | LABORATORIO CLÍNICO | Fecha: 05/2021 Vigencia: 3 años |
| | PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 POR TÉCNICA RT-PCR EN EL HUAP | 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 BIOLOGÍA 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 recepcionan 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 Medico 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 deCartucho 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 Aliplex™ 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 regirá 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 | Pocilla | 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 | | | | AMP LIFICA | PENDIENTE | VALIDOS | NEGATIVO |
| Paciente 2 | | | | NO AMP LIFICA | 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 sospechosos.

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.: 20

| | | |
|---|---|------------------------------------|
|  | 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 |

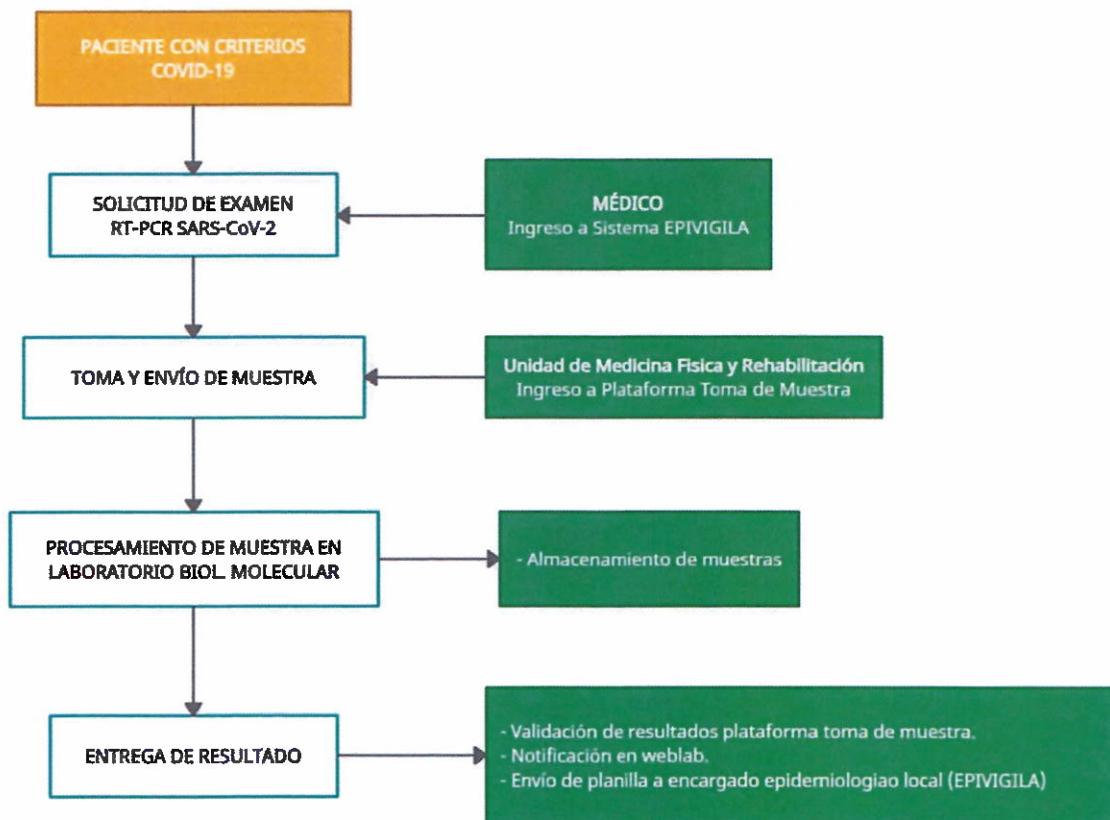
<https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20lab.%20que%20realizan%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20PCR%20%C3%A1reas%20y%20flujos%20v1.pdf>.

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 SustanciasInfecciosas. 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 | | |
| IDENTIFICACION 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: Ciudad: Email: | | | | |
| PROCECUENCIA | | | | |
| Hospital: Servicio de Salud: Nombre Medico solicitante: RUT: Fono/anexo: Fecha solicitud examen: | | | | |
| IDENTIFICACION DE LA MUESTRA | | | | |
| Tipo de muestra: <input type="checkbox"/> Aspirado nasofaringeo <input type="checkbox"/> Lavado broncoalveolar <input type="checkbox"/> Aspirado traqueal <input type="checkbox"/> Torulado nasofaringeo <input type="checkbox"/> Otros | | | | |
| Nombre responsable toma de muestra: Fono/anexo: Fecha/Hora toma de muestra: N° epivigila: N° ID: | | | | |
| BIOLOGIA MOLECULAR | | | | |
| S/C | RT-PCR SARS CoV-2 (COVID-19) | | | <input checked="" type="checkbox"/> |

Firma Medico

| | |
|----------------------------------|--------------|
| 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 | Nº de Petición: 5270844 Fecha de Recepción: 27/05/2021 11:09 Fecha de Informe: 27/05/2021 11:13 Fecha de Impresión: 27/05/2021 11:17 |
| Nombres: LIAM Apellidos: DOLL XXX R.U.T.: 12345 Edad : 18 | Nº 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