

Instrucciones de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

03/2020 ES

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

¡Para uso exclusivo en investigación!

(RUO)



821003



96



03 2020



altana Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenido

1.	Aplicación	5
2.	Componentes del kit	5
3.	Almacenamiento	5
4.	Descripción del producto	6
4.1	Instrumentos de PCR en tiempo real	8
5.	Procedimiento	8
5.1	Preparación de las muestras	9
5.2	Configuración de Master Mix	10
5.3	Configuración de reacción	12
6.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real	13
6.1	Configuración	13
6.2	Detectores de fluorescencia (colorantes)	13
6.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	14
7.	Análisis de datos	14
7.1	Interpretación de los resultados	14
7.1.1	Análisis cualitativo	15
8.	Asistencia técnica	15
9.	Marcas comerciales y aviso legal	16
10.	Explicación de los símbolos	17

1. Aplicación

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 es un sistema reactivo basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa y la diferenciación de ARN específico de linaje de B-betacoronavirus (B-βCoV) y coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

¡Para uso exclusivo en investigación (RUO, por sus siglas en inglés)! No indicado para procedimientos diagnósticos.

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [μl/vial]
Azul	Master A	2	240
Violeta	Master B	2	720
Rojo	Positive Control*	1	250
Verde	Internal Control	1	1000
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

* El control positivo contiene ambas dianas, B-βCoV and SARS-CoV-2.

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Descripción del producto

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 es un sistema reactivo basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa y la diferenciación de ARN específico de linaje de B-betacoronavirus (B-βCoV) y coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

La prueba incluye un sistema de amplificación heterólogo (control interno) para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real, utilizando una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de secuencias objetivo específicas y sondas objetivo específicas para la detección de ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos reporter y quencher.

La sonda específica para el ARN de B-βCoV (gen E diana) se marca con el fluoróforo FAM™, mientras que las sondas específicas para ARN de SARS-CoV-2 (gen S diana) se marcan con el fluoróforo Cy5. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela del ARN específico de B-βCoV y SARS-CoV-2, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de tres procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Positive Control (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Internal Control
- Water (PCR grade)

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, transcriptasa inversa, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, amplificación con mediación de PCR y la detección de ARN específico de B-βCoV (gen E diana), ARN específico de SARS-CoV-2 (gen S diana) y del Internal Control (control interno) en una

configuración de reacción.

4.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 puede usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

5. Procedimiento

5.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material de partida para el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

La calidad del ARN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automatización) (Altona Diagnostics)
- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 8. Asistencia técnica).

5.2 Configuración de Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Independientemente del método/sistema usado para la extracción del ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente a la muestra. El IC siempre se debe añadir a la muestra/mezcla de tampón de lisis. El volumen del IC que se debe añadir depende siempre y únicamente del volumen de elución. Representa el 10 % del volumen de elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución, se deben añadir por muestra 6 µl de IC a la muestra/mezcla de tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente a la muestra.

5.3 Configuración de reacción

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

6. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 8. Asistencia técnica).

6.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

6.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Desactivador fluorescente
ARN específico de B-βCoV	Gen E diana	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de SARS-CoV-2	Gen S diana	Cy5	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

6.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

► Defina el perfil de temperatura y la adquisición de colorantes:

	Fase	Repeti- ciones de ciclos	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturaliza- ción	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclos	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

7. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 8. Asistencia técnica).

7.1 Interpretación de los resultados

7.1.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™	Cy5	JOE™	
+	+	+*	Se ha detectado ARN específico de B-βCoV (gen E diana) y SARS-CoV-2 (gen S diana).
+ [†]	-	+*	Se ha detectado ARN específico de B-βCoV (gen E diana).
-	+ [†]	+*	Se ha detectado ARN específico de SARS-CoV-2 (gen S diana).
-	-	+	No se ha detectado ARN específico de B-βCoV (gen E diana) ni de SARS-CoV-2 (gen S diana). La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de B-βCoV (gen E diana) ni de SARS-CoV-2 (gen S diana).
-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* La detección del control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección FAM™ ni Cy5. Una carga alta de ARN de B-βCoV (gen E diana) y/o de SARS-CoV-2 (gen S diana) en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de control interno.

[†] Debido a una ligera diferencia en la sensibilidad de los sistemas de detección para el objetivo B-βCoV (FAM™) y para el objetivo SARS-CoV-2 (Cy5), en casos poco frecuentes, muestras débilmente positivas pueden mostrar una señal en el canal FAM™ pero no en el canal Cy5 y viceversa.

8. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

E-mail: **support@altona-diagnostics.com**

Teléfono: **+49-(0)40-5480676-0**

9. Marcas comerciales y aviso legal
















AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

¡Para uso exclusivo en investigación (RUO, por sus siglas en inglés)! No indicado para procedimientos diagnósticos.

© altona Diagnostics GmbH 2020; reservados todos los derechos.

10. Explicación de los símbolos

Símbol	Explicación
	Solo para uso en investigación
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

