

Instrucciones de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2023 ES

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

¡Para uso exclusivo en investigación!

(RUO)



821005



384



01 2023



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

Índice

1.	Aplicación	5
2.	Componentes del kit	5
3.	Almacenamiento	6
4.	Información general	6
5.	Descripción del producto	7
5.1	Instrumentos PCR en tiempo real	9
6.	Procedimiento	9
6.1	Preparación de las muestras	9
6.2	Preparación del Master Mix	11
6.3	Preparación de la reacción	13
7.	Programación de los instrumentos PCR en tiempo real	13
7.1	Configuración	14
7.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	14
7.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	15
8.	Análisis de datos	15
8.1	Interpretación de los resultados	16
8.1.1	Análisis cualitativo.....	16
9.	Asistencia técnica	17
10.	Marcas comerciales y aviso legal	17
11.	Explicación de los símbolos	18

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 de ARN específico de coronavirus de linaje B-beta (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 de la tapa	Componente	Número de viales	Volumen [μl/vial]
Azul	Master A	8	240
Violeta	Master B	8	720
Verde	Internal Control	4	1000
Rojo	Positive Control*	2	250
Blanco	Water (PCR grade)	2	500

* El control positivo contiene ambos objetivos, linaje B-βCoV y SARS-CoV-2

Internal Control = 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 °C 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 °C y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Información general

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que pertenece a la familia Coronaviridae, género Betacoronavirus, subgénero linaje B.

El SARS-CoV-2 surgió en la región china de Wuhan en diciembre de 2019 y se ha extendido por todo el mundo en un periodo de 2 meses. El virus inicialmente se denominó 2019-nCoV (nuevo coronavirus) y el «Comité Internacional de Taxonomía de Virus» cambió el nombre a SARS-CoV-2 el 11/02/2020. Al mismo tiempo, la OMS llamó COVID-19 a la enfermedad causada por el SARS-CoV-2. Teniendo en cuenta la rápida escalada y propagación de la COVID-19 en todo el mundo, la OMS declaró el brote como una pandemia el 12/03/2020.

El SARS-CoV-2 es muy contagioso y se transmite mediante aerosoles y gotitas, y provoca infecciones respiratorias agudas con síntomas similares a los de la gripe.

En personas mayores y personas con enfermedades preexistentes principalmente, aunque no exclusivamente, la infección por SARS-CoV-2 puede provocar una enfermedad grave y potencialmente mortal. Se han notificado casos de infección asintomática, enfermedad leve, enfermedad grave y muertes.

5. 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 de ARN específico de coronavirus de linaje B-beta (B-βCoV) y coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (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 utiliza una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección de ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos reporter y quencher.

La sonda específica para ARN de linaje B-βCoV (gen E diana) está marcada con el fluoróforo FAM™, mientras que la sonda específica para ARN de SARS-CoV-2 (gen S diana) está marcada con el fluoróforo Cy5. La sonda específica para el Internal Control [control interno (IC)] se marca con el fluoróforo JOE™.

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

El test consta de tres procesos en un solo ensayo de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y Internal Control (control interno) en ADNc
- Amplificación por PCR del ADNc del objetivo y del Internal Control (control interno)
- 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
- Internal Control
- Positive Control (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Water (PCR grade)

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN-polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediada por PCR y la detección de ARN específico de linaje B-βCoV (gen E diana), ARN específico de SARS-CoV-2 (gen S diana) y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

5.1 Instrumentos 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:

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

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.

6. Procedimiento

6.1 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 (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 ser apropiados otros sistemas y kits de extracción de ácido nucleico.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 1 minuto a aprox. 17 000 x g (~13 000 rpm) utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones 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 de la 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 muestras, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (ver capítulo 9. Asistencia técnica).

6.2 Preparación del 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 Internal Control [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, prepare 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
Volumen de Master Mix	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.

- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl del IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió el 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
Volumen de Master Mix	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.

6.3 Preparación de la 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 el 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).

7. Programación de los instrumentos PCR en tiempo real

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

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (ver capítulo 9. Asistencia técnica).

7.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

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

7.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

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

7.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

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

	Fase	Repeticiones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			Sí	55	0:45
			-	72	0:15

8. 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 (ver capítulo 9. Asistencia técnica).

8.1 Interpretación de los resultados

8.1.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™ (gen E)	Cy5 (gen S)	JOE™ [Internal Control (control interno)]	
+	+	+	Se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV y SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+	Solo se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV. Presunto positivo para SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+	Solo se ha detectado ARN específico de SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	No se ha detectado ARN específico del linaje B-βCoV ni de SARS-CoV-2. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de SARS-CoV-2.
-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja una nueva muestra y pruebe con ella.

* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en el canal de detección de FAM™ o en el canal de detección de Cy5. Una elevada carga de ARN de linaje B-βCoV (gen E diana) y/o SARS-CoV-2 (gen S diana) en la muestra puede dar lugar a señales reducidas o ausentes del Internal Control (control interno).

¹ La detección en solo uno de los dos canales de detección respectivos para el gen E y el gen S podría deberse a una baja concentración de ARN vírico cerca del límite de detección o a la mutación de una de las dos secuencias objetivo.

² Se puede volver a analizar la muestra repitiendo la extracción y la RT-PCR. Si el resultado repetido sigue siendo presuntamente positivo, se puede realizar una prueba de confirmación adicional.

9. Asistencia técnica

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

email: **support@altona-diagnostics.com**

teléfono: **+49-(0)40-5480676-0**

10. Marcas comerciales y aviso legal














AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); EasyMAG®, NucliSENS® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).



Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

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

© 2023 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

11. Explicación de los símbolos

Símbolo	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» tests/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución: Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics si necesita ayuda.

Símbolo	Explicación
	Nota: Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.
	Versión

Notas:

Notas:

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

