

Instruções de utilização

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2023 PT

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Apenas para uso de investigação!

(RUO)



821005



384



01 2023



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

Índice

1.	Aplicação	5
2.	Componentes do kit.....	5
3.	Armazenamento	6
4.	Informação de base	6
5.	Descrição do produto	7
5.1	Instrumento PCR em tempo real.....	9
6.	Procedimento	9
6.1	Preparação de amostras.....	9
6.2	Preparação da Master Mix.....	11
6.3	Preparação da reação.....	12
7.	Programação dos instrumentos PCR em tempo real	13
7.1	Definições	13
7.2	Detetores de fluorescência (corantes)	14
7.3	Perfil de temperatura e aquisição de corante	14
8.	Análise de dados.....	14
8.1	Interpretação dos resultados.....	15
8.1.1	Análise qualitativa	15
9.	Apoio técnico	16
10.	Marcas comerciais e isenções de responsabilidade.....	16
11.	Explicação de símbolos	17

1. Aplicação

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste num sistema de reagentes, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa de ARN específico da linhagem B-betacoronavírus (B-βCoV) e do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).

Destinado apenas à investigação (RUO)! Não se destina a utilização em procedimentos de diagnóstico.

2. Componentes do kit

Cor da tampa	Componente	Número de tubos	Volume [μl/tubo]
Azul	Master A	8	240
Violeta	Master B	8	720
Verde	Internal Control	4	1000
Vermelho	Positive Control*	2	250
Branco	Water (PCR grade)	2	500

* O Controlo Positivo contém ambos os alvos, linhagem B-βCoV e SARS-CoV-2

Internal Control = controlo interno

Positive Control = controlo positivo

Water (PCR grade) = água de PCR

3. Armazenamento

- O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e -15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Informação de base

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é um vírus de ARN de cadeia simples de sentido positivo pertencente à família Coronaviridae, género betacoronavírus, subgénero linhagem B.

O SARS-CoV-2 surgiu na região de Wuhan na China em dezembro de 2019 e propagou-se a nível mundial em 2 meses. O vírus foi inicialmente designado como 2019-nCoV (novo Coronavírus) e o seu nome foi alterado para SARS-CoV-2 pelo "Comité Internacional de Taxonomia de Vírus" no dia 11.02.2020. Ao mesmo tempo, a OMS designou a doença causada pelo SARS-CoV-2 como COVID-19. Tendo em consideração o rápido aumento e propagação da COVID-19 a nível mundial, a OMS caracterizou o surto como uma pandemia em 12.03.2020.

O SARS-CoV-2 é altamente contagioso e transmitido por aerossóis e gotículas, e causa infeções respiratórias agudas com sintomas semelhantes aos da gripe. Principalmente, mas não exclusivamente, em pessoas idosas e pessoas com doenças pré-existentes, a infeção com SARS-CoV-2 pode provocar uma doença grave e potencialmente fatal. Foram notificados casos de infeção assintomática, doença ligeira, doença grave e mortes.

5. Descrição do produto

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste num sistema de reagentes, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa de ARN específico da linhagem B-betacoronavírus (B-βCoV) e do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga [Internal Control (controlo interno)] para identificar possíveis inibições da RT-PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de RT-PCR em tempo real utiliza uma reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências alvo específicas e de sondas alvo específicas para a deteção de ADN amplificado. As sondas estão marcadas com reporter fluorescente e corante quencher.

A sonda específica para o ARN do linhagem B-βCoV (gene alvo E) está marcada com o fluoróforo FAM™, enquanto a sonda específica para o ARN do SARS-CoV-2 (gene alvo S) está marcada com o fluoróforo Cy5. A sonda específica para o Internal Control (IC, controlo interno) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico da linhagem B-βCoV e do ARN específico do SARS-CoV-2, assim como a deteção do Internal Control (controlo interno) nos canais de deteção correspondentes do instrumento PCR em tempo real.

O teste consiste em três processos num único tubo de ensaio:

- Transcricção reversa do ARN para ADNc alvo e do Internal Control (controlo interno)
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Internal Control (controlo interno)
- Deteção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste em:

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

Internal Control = controlo interno

Positive Control = controlo positivo

Water (PCR grade) = água de PCR

O Master A e o Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcricção reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcrição reversa, a amplificação mediada por PCR e a deteção de ARN específico de linhagem B-βCoV (gene alvo E), ARN específico de SARS-CoV-2 (gene alvo S) e do Internal Control (controlo interno) numa preparação de reacção.

5.1 Instrumento PCR em tempo real

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 pode ser usado com os seguintes instrumentos PCR em tempo 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



Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.

6. Procedimento

6.1 Preparação de amostras

O ARN extraído é o material inicial para o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

A qualidade do ARN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário assegurar que o sistema utilizado para a extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para extração 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)

Poderão ser também apropriados sistemas e kits alternativos de extração de ácido nucleico.

Caso se utilize um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente a realização de um passo de centrifugação adicional durante 1 minuto a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um novo tubo de recolha, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.

ATENÇÃO



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 9. Apoio Técnico).

6.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contém um Internal Control (controlo interno, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um RT-PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de RT-PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (controlo interno)	1 µl	12 µl
Volume do Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de RT-PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o IC **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise). O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10 % do volume de eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de Elution Buffer (tampão de eluição) ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de espécime/Lysis Buffer (tampão de lise).

- ▶ Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare o Master Mix de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume do Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Se o IC tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo terá de incluir o IC.

ATENÇÃO

Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC diretamente ao amostra.

6.3 Preparação da reação

- ▶ Pipete 20 µl do Master Mix para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da reação	
Master Mix	20 µl
Amostra ou controlo	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado pelo menos um controlo positivo e um controlo negativo por processamento.

- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrifugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~ 3 000 rpm).

7. Programação dos instrumentos PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções de programação detalhadas relativamente à utilização do kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 9. Apoio Técnico).

7.1 Definições

- ▶ Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência passiva	ROX™

7.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico da linhagem B-βCoV	E gene	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do SARS-CoV-2	S gene	Cy5	(Nenhum)
Internal Control (controlo interno)	IC	JOE™	(Nenhum)

7.3 Perfil de temperatura e aquisição de corante

- Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Fase	Repetições do ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:s]
Transcriptase reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de ciclo	45	-	95	00:15
			Sim	55	00:45
			-	72	00:15

8. Análise de dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos PCR em tempo real específicos, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 9. Apoio Técnico).

8.1 Interpretação dos resultados

8.1.1 Análise qualitativa

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
FAM™ (E gene)	Cy5 (S gene)	JOE™ (Controlo Interno)	
+	+	+*	Detetado ARN específico da linhagem B-βCoV e do SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+*	Detetado apenas ARN específico da linhagem B-βCoV. Positivo presumível para SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+*	Detetado apenas ARN específico do SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	Não foi detetado ARN específico da linhagem B-βCoV nem do SARS-CoV-2. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do SARS-CoV-2.
-	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

* A deteção do Internal Control (controlo interno) no canal de deteção JOE™ não é necessária para os resultados positivos no canal de deteção FAM™ ou no canal de deteção Cy5. Uma carga elevada de ARN do linhagem B-βCoV (gene alvo E) e/ou do SARS-CoV-2 (gene alvo S) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (controlo interno).

¹ A deteção em apenas um dos dois respetivos canais de deteção para o gene E e o gene S pode dever-se a uma baixa concentração de ARN viral próxima do limite de deteção ou devido a mutação de uma das duas sequências alvo.

² Poderá testar-se novamente a amostra repetindo a extração e a RT-PCR. Se o resultado repetido permanecer positivo presumível, poderão realizar-se testes adicionais de confirmação.

9. Apoio técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso apoio técnico através do:

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

telefone: **+49-(0)40-5480676-0**

10. Marcas comerciais e isenções de responsabilidade

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

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.

Destinado apenas à investigação (RUO)! Não se destina à utilização em procedimentos de diagnóstico.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

11. Explicação de símbolos

Símbolo	Explicação
	Destinado apenas à investigação
	Código do lote
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção: Destaca os procedimentos ou as instruções de funcionamento que, se não forem seguidos corretamente, podem resultar em lesões pessoais ou afetar o desempenho do produto. Contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência.

Símbolo	Explicação
	Nota: Consiste em informações úteis para o utilizador mas que não são essenciais para a tarefa em questão.
	Versão

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

