

DIAGNOVITAL

Kit de detección de mutaciones SARS-CoV-2 K417N

Detección cualitativa basada en RT-PCR de la mutación K417N del SARS-CoV-2

Solo para uso de Investigación. No debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico.

RUO

REF



090R07025 25 pruebas

090R07050 50 pruebas

090R07100 100 pruebas

Tabla de Contenidos

Uso Previsto	3
Descripción del Producto	3
Materiales Proporcionados.....	4
Materiales Adicionales Necesarios.....	4
Almacenamiento.....	5
Características de presentación	6
Consideraciones Antes de Comenzar	7
Preparación de la Muestra.....	7
Configuración de Reacción.....	8
Análisis y Resolución de Problemas	10
Limitaciones	13
Marcas Comerciales.....	13
Símbolos.....	14

Uso Previsto

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N es una prueba basada en RT-PCR en tiempo real para la detección y discriminación de la mutación K417N del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias. **Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el SARS-CoV-2.**

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N detecta la mutación K417N en el ARN del SARS-CoV-2 extraído de muestras de hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos durante la infección. Los resultados positivos indican la presencia de SARS-CoV-2 ARN detecta una mutación de un solo punto que resulta en el intercambio del aminoácido Lisina a Asparagina en la proteína spike en la posición 417. Las mutaciones en la posición 417 se encuentran en dos linajes variantes, sin embargo, el intercambio a una asparagina es específico para el linaje sudafricano B. 1.351 y puede ayudar a la distinción precisa de los diferentes tipos de variantes del SARS-CoV-2. La K417N es una mutación que ocurre en diferentes linajes y ya se ha encontrado en el linaje sudafricano (B. 1.351) y brasileño (B. 1.1.28). Las mutaciones K417N y E484K acompañantes en la cepa sudafricana proporcionan un contrapeso al aumento de afinidad del pico debido a la mutación N501Y. Evitan la formación de dos puentes salinos que ayudan a formar y estabilizar el complejo RBD-ACE2. Esto reduce la afinidad de unión de ACE2. Por lo tanto, esta cepa es menos infecciosa y se propaga menos rápidamente que la cepa del Reino Unido. Esto es a pesar de que ambos comparten la última sustitución. La mutación está en la proteína spike y parece tener un impacto en la respuesta inmune del cuerpo y, posiblemente, en la eficacia de la vacuna. Se ha informado que los anticuerpos monoclonales y derivados del suero son de 10 a 60 veces menos eficaces para neutralizar el virus portador de la mutación K417N.

Descripción del Producto

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N es un sistema de detección y discriminación basado en RT-PCR en tiempo real para la mutación K417N del SARS-CoV-2. **Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el SARS-CoV-2.**

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N también detecta la presencia de un objetivo humano específico de secuencia (RNaseP) que sirve como control de extracción humana (HEC) además de las secuencias de tipo salvaje (K417) y mutante (N417) en diferentes canales.

DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 BASADA EN PCR EN TIEMPO REAL

El primer paso en la detección de la mutación K417N del SARS-CoV-2 es la conversión del ARN viral en ADNc. Posteriormente, las secuencias diana virales y la RNaseP (HEC) se amplifican simultáneamente en una reacción con amplificación monitoreada en tiempo real mediante el uso de sondas marcadas con fluorescencia: tras la incorporación en las cadenas de ADN recién amplificadas, se libera el fluoróforo y se puede observar un aumento en la señal de la fluorescencia.

Con **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** la discriminación entre las dianas virales se logra mediante el uso de dos fluoróforos diferentes que se detectan en dos canales diferentes: FAM™ para el tipo salvaje SARS-CoV-2 K417, HEX/VIC para la mutación N417 y el RNaseP (HEC) se detecta en el canal Cy5.

Debido a la tasa de mutación intrínseca de los virus, es posible que se produzcan mutaciones en la secuencia diana y se acumulen con el tiempo. Esto puede dar lugar a resultados falsos negativos con un enfoque de detección basado en PCR.

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N está validado con Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx y es compatible con BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems calibrado FAM™, HEX/VIC y canales Cy5.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquía **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rt@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/ -

Materiales Proporcionados

	Reactivos	Cantidad y Volumen (25 pruebas)	Cantidad y Volumen (50 pruebas)	Cantidad y volumen (100 pruebas)
1	Mezcla Maestra de PCR	1 × 375 µl	1 × 750 µl	1 × 1500 µl
2	Control Positivo	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl
3	dH libre de nucleasas ₂ O	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl



¡IMPORTANTE! La tabla anterior refleja el esquema de colores del kit estándar. Debido a problemas con los proveedores durante la crisis de COVID-19, los colores de las tapas de los tubos individuales pueden ser sustituidos debido a la disponibilidad. Compruebe siempre el etiquetado del reactivo antes de utilizar.

Materiales Adicionales Necesarios

- Medios y equipos adecuados para la extracción de ácidos nucleicos
- Sistema de detección de PCR en tiempo real equipado para detección FAM™, HEX/VIC y Cy5
- Pipetas ajustables y puntas de pipeta con filtro ajustable
- Equipo de protección personal y espacios de trabajo adecuados para trabajar con muestras potencialmente infecciosas
- Descontaminantes de superficie como DNAzap™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNase Away™ (Fisher Scientific), Lejía al 10% (dilución 1:10 de hipoclorito de sodio comercial al 5.25-6.0%)
- Tubos / tiras / placas sin nucleasas para preparar diluciones, mezclas maestras, etc.
- Capilares/placas/tubos de reacción de PCR en tiempo real

Para **BIO-RAD CFX96**: Placas de PCR de perfil bajo de 96 pocillos de paredes delgadas y cubierta dura con códigos de barras (BIO-RAD, Cat #: HSP-9955), Placas de PCR de perfil bajo de 96 pocillos de paredes delgadas y cubierta dura (BIO-RAD, Cat #: HSP-9655), Sellos adhesivos 'B' microsellos, ópticamente claro (BIO-RAD, Cat#: MSB-1001), Tubos PCR individuales, Tiras de tubo bajas, tira de 8 tubos, Perfil bajo 0.2 ml, Blanco (BIO-RAD, Cat#: TLS0851), Tiras de tapa plana, ópticamente claras, tira de 8 tapas, 0.2 ml (BIO-RAD, Cat#: TCS0803).

Para **Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx- Quant Studio 5 Real-Time PCR System**, Placa de reacción de 96 pocillos óptico MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat #: 4306737), Film adhesivo óptico MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat#: 4311971), Tira de 8 tubos óptica MicroAmp®, 0.2 mL (Thermo Fisher, Cat#: 4316567), Tiras de 8 tapas ópticas MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat#: 4323032)

- Opciones de almacenamiento adecuadas para reactivos y muestras (4°C, -20°C, -70°C)



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rt@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr

Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

Almacenamiento

- Almacene todos los componentes a -15°C/-25°C y evite más de 3 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteja la mezcla maestra de qPCR de la luz, ya que la exposición prolongada puede disminuir el rendimiento de los fluoróforos.
- Si los componentes del kit se han dañado durante el transporte, comuníquese con RTA Laboratories. No lo use ya que el rendimiento puede verse comprometido.
- Mantenga los reactivos separados del material de muestra para evitar la contaminación.
- No lo use después de la fecha de vencimiento designada.



Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

Características de presentación

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica o el límite de detección para los ensayos basados en ácidos nucleicos se expresarán mediante el valor de corte positivo del 95%. Esta es la concentración del analito en la que el 95% de los ensayos dan resultados positivos tras diluciones en serie utilizando un material de referencia. En este estudio se analizó la sensibilidad analítica mediante el uso de una serie de dilución de VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV - 2 ARN CONTROL (21MBC137002-R) por el canal de tipo salvaje y VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B. 1.351 (21MBC139001-R) CONTROL de ARN para canal mutante. Las diluciones se realizaron por muestra clínica de ARN negativa. Cada dilución se probó con 23 réplicas. Los sistemas de PCR en tiempo real QuantStudio 5-DX se utilizaron para amplificación, detección de señal y análisis de los resultados. El análisis Probit fue realizado por el programa IBM SPSS Statistics 27. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 1: Detección de Mutación DIAGNOVITAL K417N - Valores límite de detección (LoD) y rangos de confianza del 95 %

Gen diana	Límite de Detección (copias/ml)	límite inferior de confianza del 95%	límite superior de confianza del 95%
K417	7947.595	5653.225	18316.030
N417	7168.476	4676.692	36608.421

Especificidad diagnóstica

Se analizaron un total de 192 muestras clínicas de pacientes con síntomas de Covid mediante: **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** y los resultados se compararon con el análisis de secuenciación de próxima generación. se encontró que 186 de ellos eran negativos para la mutación K417N y 6 de ellos fueron positivos por ambos métodos. El porcentaje positivo de acuerdo (PPA) de Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N con respecto a NGS es del 100% y el porcentaje negativo de acuerdo (NPA) es del 100%. Todos los controles internos (RNAseP) dieron positivo.

Tabla 2. DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N - Estudio de correlación NGS qPCR

Hisopo NP		Comparador (NGS y qPCR)	
		Mutante	Tipo Salvaje
DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N	N417	6	0
	K417	0	186
	Indefinido	0	0
	Total	6	186



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rt@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

Consideraciones Antes de Comenzar

BIOSEGURIDAD

- Use equipo de protección personal apropiado (por ejemplo, batas, guantes sin talco, protección para los ojos) cuando trabaje con muestras clínicas.
- El procesamiento de muestras debe realizarse en una cabina de seguridad biológica certificada de clase II siguiendo las pautas de nivel de bioseguridad 2 o superiores.
- Para obtener más información, consulte:
 - Directrices provisionales para la recolección, manipulación y análisis de muestras clínicas de pacientes bajo investigación (PUI) para el nuevo coronavirus 2019 (SARS-COV-2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos 6a edición disponible en <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- El uso de **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** y la evaluación de datos está restringida únicamente al personal de laboratorio capacitado.
- Las buenas prácticas de laboratorio son esenciales para un rendimiento óptimo de este ensayo. Se debe tener especial cuidado para evitar la contaminación de los componentes del kit. Todos los reactivos deben ser monitoreados de cerca para detectar impurezas y contaminación. Deseche los reactivos sospechosos de acuerdo con las directrices y normativas locales.

MUESTRAS

Utilice únicamente muestras adecuadas para las pruebas, como:

- Muestras respiratorias incluyendo nasofaríngeas / orofaríngeas.
- Las muestras de hisopos deben recolectarse solo en hisopos con punta sintética (como polyester or Dacron®) con cuerpo de plástico. Los hisopos con alginato de calcio o puntas de algodón con varillas de madera no son aceptables.

MUESTRAS - MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Las muestras se pueden almacenar a 2-8°C hasta 72 horas después de la recolección.
- Si se espera un retraso en la extracción, almacene las muestras a -20°C o menos.
- Los ácidos nucleicos extraídos deben almacenarse a -20°C o menos.

No utilice muestras si

- no se mantuvieron a 2-8°C (≤ 4 días) ni se congelaron a -20°C o menos.
- están insuficientemente etiquetados o carecen de documentación.
- no son adecuados para este propósito (consulte más arriba el material de muestra adecuado).
- el volumen de la muestra es insuficiente.

Preparación de la Muestra

- El rendimiento de los ensayos de RT-PCR depende en gran medida de la cantidad y calidad de la plantilla de ARN de la muestra. Se recomienda encarecidamente calificar y validar los procedimientos de extracción de ARN para su recuperación y pureza antes de analizar las muestras.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** está validado con el Kit de Aislamiento RNA Viral RTA.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** es compatible con Tianlong Genotex96 Extraction System y el Kit QIAamp® MinElute Virus Spin, Reactivos de Preparación de muestra 1.0 VERSANT®.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Turquía **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rt@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr

Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

- *Sistemas de PCR en Tiempo Real validados*: : Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx.
- *Sistemas de PCR en Tiempo Real compatibles*: : BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems.
- Almacene y mantenga las muestras residuales y los ácidos nucleicos extraídos a -20°C o -80°C.
- Descongele únicamente la cantidad de extractos de muestras que se analizarán en un solo día.
- No congele / descongele el extracto más de una vez antes de realizar la prueba, ya que cada ciclo de congelación / descongelación disminuirá la calidad del ARN.
- Puede ser posible utilizar muestras de pacientes directamente, dependiendo del tipo de muestra. Sin embargo, esto puede requerir un paso de lisis previo y una titulación de la cantidad en la muestra que se puede usar sin inhibir la reacción. Este procedimiento no ha sido validado, se recomienda el uso de ARN aislado.

Configuración de Reacción

1. Asegúrese de que todos los equipos y dispositivos necesarios sean adecuados, calibrados y funcionales antes de comenzar los experimentos.
2. Descontamine el equipo y el espacio de trabajo y prepare todo lo necesario para el siguiente experimento para mantener el flujo de trabajo corto y repetible.
3. Encienda el sistema de detección de PCR y prográmelo para evitar retrasos después de configurar las reacciones.
4. Descongelar todos los componentes de **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** en hielo y mezclar suavemente pero a fondo para asegurar una distribución uniforme de los componentes. Recoja el líquido en la parte inferior del tubo con un giro rápido (mediante microcentrifuga).
5. El **PCR Master Mix** proporcionado con **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones K417N** está listo para usar. Se preparará una reacción para cada muestra. Se debe preparar una reacción separada para el control negativo (NTC) y el control positivo (TPC).


Componente	Volumen (µl)
Mezcla Maestra de PCR	15
Aislado de ARN / TPC / NTC	5
Total	20

6. Distribuya **15 µl** de Mezcla Maestra de PCR en sus tiras / placa y agregue **5 µl de sus muestras**. (Se da un ejemplo de configuración en **Figura 1**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	TPC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S89
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S90
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S91
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S92
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S93
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S94
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NTC

Figura 1: Esquema de pipeteo de ejemplo para la distribución de mezclas maestras con las mezclas de ensayo individuales

7. Transfiera las reacciones al dispositivo de PCR y luego proceda de acuerdo con estas pautas:

Paso	Ciclos	Temperatura	Duración
Transcripción inversa	1	50°C	10 minutos
Desnaturalización Inicial	1	95°C	5 minutos
Amplificación	40	95°C	5 segundos
		57°C* 	30 segundos

*Habilitar la Recopilación de Datos para **FAM™** (Tipo salvaje K417 SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (Mutación N417 del SARS-CoV-2) y **Cy5** (HEC).

8. Una vez finalizada la ejecución, no abra los tubos de reacción para evitar la contaminación y deséchelos de acuerdo con las directrices y normativas locales. No esterilice en autoclave, ya que esto puede contaminar el equipo de laboratorio con amplicones.

RESULTADOS EJEMPLARES

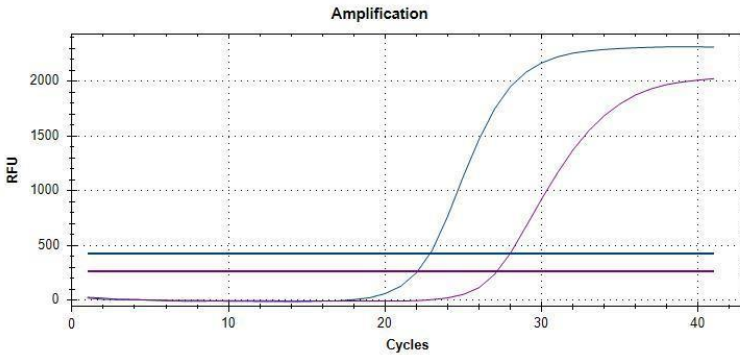


Gráfico 2: *Curvas Azules:* K417 Tipo Salvaje muestra en el FAM canal, *Curvas Moradas:* control interno en el Cy5 canal.

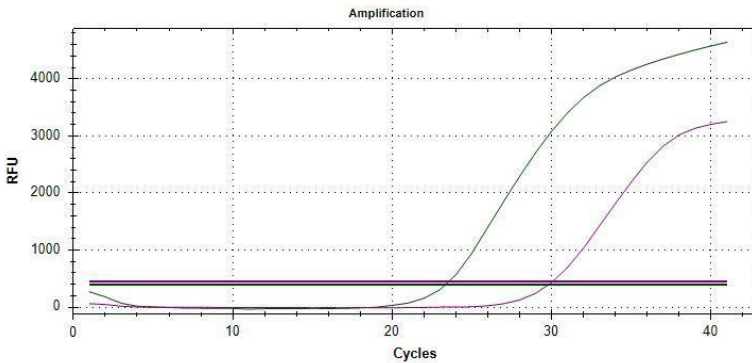


Gráfico 3: *Curvas Verdes:* N417 Mutante muestra positiva en el HEX canal, *Curvas Moradas:* control interno en el Cy5 canal.

- Los controles dH₂O (NTC) no deben dar una Ct positiva para ningún ensayo. Si lo hacen, la reacción se contaminó con la muestra de ARN / ADN. Descontamine el equipo y el espacio de trabajo y repita las reacciones.
- Todas las reacciones que contienen ARN aislado deben dar valores Ct positivos para el ensayo de control interno. Los valores de Ct deben ser <38 ciclos. La falta de amplificación del control interno indica una extracción de ARN defectuosa o pérdida del aislado de ARN debido a la contaminación por ARNasa. La muestra no es suficiente, los resultados no se pueden interpretar.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rtal@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

- Para tener en cuenta una muestra **negativo para mutación K417N**, el **FAM™** el canal debe dar un valor Ct **positivo**. Amplificación del HEC en Cy5 canal se espera alrededor de Ct 20-38.
- Para tener en cuenta una muestra **positivo para mutación K417N**, el **HEX/VIC** el canal debe dar un valor Ct **positivo**. Si el HE no puede amplificar, la muestra aún debe ser considerada positiva. Esto es posible cuando Esto es posible cuando se obtiene un título de virus de alto valor inusual o la muestra no era de origen humano, sino que se recortó en células o se analizó contaminación superficial.
- Para el control positivo, se debe observar un Ct positivo en los canales FAM y HEX/VIC. El valor de Ct para el control positivo debe ser 20±3. Si el valor de Ct no corresponde al valor esperado o el control positivo no dio positivo, la PCR se vio comprometida. Compruebe la configuración de la reacción y la configuración del dispositivo de PCR y repita las reacciones. Los ciclos repetidos de congelación y descongelación del control positivo pueden comprometer su calidad y dar como resultado valores de Ct tardíos.
- Si Ct es <38 para cada uno de los canales FAM, HEX/VIC y Cy5, el resultado en el canal respectivo debe considerarse **POSITIVO**, si Ct es > 38 o no se recibe ningún valor, se debe considerar el resultado en el canal relevante como **NEGATIVO**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Resultado
-	-	+	La muestra es negativa para SARS-CoV-2. Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el SARS-CoV-2. -Asegúrese de que la muestra sea positiva para SARS-CoV-2. -Se recomiendan variaciones en el análisis de secuencias de regiones de unión de sonda con un método diferente.
+	-	+	La muestra es negativo para la mutación K417N .
-	+	+	La muestra es positivo para la mutación K417N .
-	-	-	La ausencia de amplificación en cualquier canal indica un aislamiento de ARN defectuoso, degradación de la muestra o inhibición de la PCR. Los resultados no se pueden interpretar. -El ARN puede degradarse durante el transporte, la extracción o el almacenamiento.
+	+	-	Resultado esperado para el Control Positivo (TPC) .
-	-	-	Resultado esperado para el Control Negativo (NTC) .

Configuración del dispositivo

Para **QUANTSTUDIO5DX**, en la pantalla principal, cree o abra una plantilla. En el panel de Nuevo experimento, haga clic en el botón de Nuevo experimento para crear una nueva plantilla. En la pestaña de Propiedades, ingrese la información de la plantilla. En la pestaña de Método, ajuste el volumen de reacción y configure el perfil térmico apropiado. En la pestaña Placa (Configuración rápida), asigne los atributos de la placa seleccionando la Referencia pasiva de la lista desplegable. En la pestaña Placa (Configuración rápida), defina y asigne los atributos del pocillo y seleccione los pocillos en la Disposición de placa o Tabla de pocillos. Luego asigne las muestras y los objetivos a los pocillos seleccionados.



Nota: Los nombres objetivos o de muestra nuevos ingresados en la sub-pestaña de la Configuración rápida son poblados con valores predeterminados para el Reportero como FAM, para Inhibidor como NFQ-MGB y para Tarea como Desconocido. Edite estos valores en la sub-pestaña de Ajustes avanzados. Para los sensores TaqMan, se debe usar la opción NFQ-MGB como inhibidor. Luego inicie el ciclo.

Para **BIORAD CFX 96**, en la app del software, abra el protocolo del menú Archivo. Cree el protocolo adecuado para el kit a usar. En la pestaña Placa, defina y asigne los atributos del pocillo y seleccione los pocillos en la Disposición de placa o Tabla de pocillos. Luego asigne las muestras y los objetivos a los pocillos seleccionados. Luego inicie el ciclo.

Configuración de línea de base y umbral

Después de la ejecución,

Para **QUANTSTUDIO5DX**, haga clic en el botón de Ajustes Mostrar Gráficos para cambiar el tipo de gráfico de escala logarítmica a escala lineal. El objetivo puede cambiarse en la sección Objetivo. Luego haga clic en el botón de Ajustes de análisis para ajustar el umbral de la línea base. Desbloquee el Umbral automático y desmarque la Línea base automática. Configure el ciclo de inicio de la línea base a 7-8 y el ciclo final de la línea base a 20 para normalizar los gráficos.

Para **BIORAD CFX 96**, el umbral puede ajustarse de acuerdo a la relación de altura de la señal FAM vs. HEX.

La línea de base de la curva de amplificación es uno de los parámetros que pueden afectar los resultados de la PCR. En caso de que la línea de base esté configurada incorrectamente, se puede mostrar un valor Ct incluso si no se produjo una amplificación real. El umbral automático se utiliza con **Dit de Detección de Mutaciones I DAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N** para sistemas de detección de PCR. Si el aumento de una muestra en cualquier canal es **inferior al 10%** del aumento de la muestra con mayor aumento en el mismo canal, este aumento se considera **NEGATIVE**. En algunos casos, el umbral debe establecerse manualmente para evitar la fluorescencia de fondo. Para cada muestra, debe comprobarse la relación entre la altura de la señal FAM y HEX; la señal que supera a la otra en 3 veces o más debe considerarse positiva, ya que solo una de ellas debe amplificarse.

Solución de problemas

PROBLEMA	POSIBLES RAZONES	SOLUCIÓN
Resultado negativo para el control interno	Es posible que la mezcla maestra de PCR no haya sido homogénea.	El pipeteo debe realizarse para la Muestra maestra de PCR.
	Es posible que el aislamiento de ARN no se realice correctamente.	El estudio debe repetirse desde el aislamiento.
	El aislado puede incluir inhibidor.	La etapa de PCR en tiempo real debe repetirse diluyendo el aislado 1/10.
Resultado positivo para NTC	Puede haber ocurrido contaminación.	La contaminación puede haber ocurrido en el trabajo área a los artículos consumibles que se están trabajando en. Se recomienda desechar los consumibles y abrir nuevos y limpiar el ambiente primero con una solución de NaClO al 10% y luego con Alcohol al 70%.

Limitaciones

- Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el SARS-CoV-2.
- Para obtener resultados confiables, es esencial seguir las pautas que se dan en este manual. Los cambios en la configuración de la reacción o el protocolo de ciclos pueden dar lugar a experimentos fallidos.
- Dependiendo de la matriz de la muestra, los inhibidores pueden estar presentes en el ARN aislado y deshabilitar la transcripción inversa y / o la amplificación por PCR. Si este es el caso, otro tipo de muestra o método de aislamiento puede ser beneficioso.
- Las mutaciones espontáneas dentro de la secuencia diana pueden provocar que no se detecte la secuencia diana.
- Los resultados siempre deben interpretarse teniendo en cuenta todos los demás datos recopilados de una muestra. La interpretación debe ser realizada por personal capacitado y experimentado en este tipo de experimento.

Marcas Comerciales

NucliSens® (bioMérieux), QIAamp®, RNeasy® (QIAGEN), ChargeSwitch® (Invitrogen), FAM™ (Life Technologies), DNAZap™, DNA Away™, RNase Away™

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. que se utilizan en este documento, incluso si no están específicamente marcados como tales, no deben considerarse desprotegidos por la ley.












RTA Laboratuvarları


Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/-

Símbolos

	Fecha de Caducidad
	Lote
	Número de catálogo
	Limitación de Temperatura
	Precaución
	Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso o consulte las instrucciones de uso electrónicas
	Contiene suficiente para (n) cantidad de pruebas
	Solo para uso en investigación

 **RTA LABORATUVARLARI**
BIYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ VE
MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.
GEPOSB Cumhuriyet Cad. No:3
41400 Gebze / Kocaeli / Turkey

Tel: +90 262 648 5300
E-mail: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr

 RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0

RTA.KK.707 Fecha de Revisión / No de Revisión: -/

