

# DIAGNOVITAL

## **Kit de Detección de Mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y**

Detección cualitativa basada en RT-PCR de variantes del SARS-CoV-2 N501Y

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

**RUO**

**REF** 

090R01025 25 pruebas

090R01050 50 pruebas

090R01100 100 pruebas

## Tabla de Contenidos

Uso Previsto .....	3
Descripción del Producto .....	3
Materiales Proporcionados .....	4
Materiales Adicionales Necesarios.....	4
Almacenamiento .....	4
Características de Funcionamiento .....	6
Consideraciones Antes de Comenzar .....	7
Preparación de la Muestra .....	8
Configuración de Reacción .....	10
Análisis y Resolución de Problemas.....	11
Limitaciones.....	12
Marcas Comerciales .....	12
Símbolos .....	13



## Uso Previsto

**DIAGNOVITAL® Kit de Detección de Mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y** es una prueba basada en RT-PCR en tiempo real para la detección y discriminación de variantes del SARS-CoV-2 N501Y en muestras respiratorias. **Este kit está diseñado para ejecutar solo muestras que hayan demostrado previamente ser positivas al SARS-CoV-2.**

**DIAGNOVITAL® Kit de Detección de Mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y** detecta la mutación N501Y 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. El ARN detecta una mutación puntual única que se debe al intercambio del aminoácido Asparagina (N) por Tirosina (Y) en la proteína de pico en la posición 501. La mutación en la posición 501 se encuentra en una variante de linaje. Sin embargo, el intercambio a tirosina es específico para el linaje B.1.1.7 del Reino Unido (RU) y puede ayudar a la distinción precisa de los diferentes tipos variantes de SARS-CoV-2, tanto los tipos salvajes como los mutantes comparten la última sustitución. La mutación está en la proteína de pico que se encuentra en el dominio de unión al receptor (RBD) y ha surgido en un linaje que se extiende rápidamente (B.1.1.7) y aumenta 20 veces la afinidad por la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de tipo salvaje. Esta mutación 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 menos eficaces para neutralizar virus que portan la mutación N501Y.

## Descripción del Producto

**Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** es un sistema de detección y discriminación basado en RT-PCR en tiempo real para la variante N501Y del SARS-CoV-2. **Este kit está diseñado para ejecutar solo muestras que hayan demostrado previamente ser positivas al SARS-CoV-2.**

**Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** detecta la presencia de ARN humano específico de secuencia que sirve como control de extracción humana (HEC) y detecta wildtype 501N SNP y Y501 SNP en dos canales diferentes.

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

El primer paso en la detección de la variante N501Y del SARS-CoV-2 es la conversión del ARN viral en ADNc. Posteriormente, las secuencias diana virales y la 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 **Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** la discriminación entre los objetivos virales se logra mediante el uso de tres fluoróforos diferentes que se detectan en tres canales diferentes: FAM™ para el tipo salvaje SARS-CoV-2 501N, HEX/ VIC para la variante 501Y y el 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 N501Y Mutation Detection** 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.

## 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 <sub>2</sub> O	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl

**Cuadro 1:** DIAGNOVITAL® Contenido del kit de PCR para mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y



**¡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. Siempre revise el etiquetado del reactivo antes de su uso.

## 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), el ADN de distancia™ (Fisher Scientific), RNasa Ausente™ (Fisher Scientific), blanqueador 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)

## 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.



**RTA Laboratuvarları**

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli / Turquia

**Teléfono:** +90 262 648 5300

**Fax:** +90 262 751 0677

**E-mail:** [rtalabs.com.tr](mailto:rtalabs.com.tr)

**Web:** [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)

**Fecha de Revisión / No de Revisión:** -/-



## Características de Funcionamiento

### 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 CONTROL de ARN VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 (MBC137-R) para el canal de tipo salvaje y CONTROL de ARN VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B. 1.1.7 (MBC138-R) para el 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.

**Tabla 1:** Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL N501Y - 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%
N501	4839.214	3429.205	8937.276
501Y	6092.285	4797.293	9125.916

### Especificidad diagnóstica

Un total de 168 muestras clínicas que se recogieron de pacientes con Covid19 fueron analizadas tanto por el Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y y como por secuenciación de próxima generación. se encontró que 109 de las muestras eran positivas y 58 de ellas negativas con ambos métodos para la mutación N501Y. Una muestra negativa de N501Y no dio ninguna amplificación para ninguno de los objetivos mutantes y salvajes debido a otra mutación en la región objetivo, por lo que el resultado no fue concluyente. El porcentaje de acuerdo positivo (PPA) del Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS - CoV-2 N501Y con respecto al NGS es del 100% y el porcentaje de acuerdo negativo (NPA) es del 98,31%. Todos los controles internos (RNAseP) dieron positivo.

		Comparador (NGS y qPCR)	
Hisopo NP		Mutante	Tipo Salvaje
DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones N501Y	Y501	109	0
	N501	0	58
	Indefinido	0	1*
	Total	109	59

**Tabla 3:** DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutation Detection Kit-NGS qPCR correlation study

## Reactividad cruzada

Para examinar la especificidad de un ensayo, se deben realizar estudios de reactividad cruzada para posibles marcadores de reactividad cruzada. En este estudio, la especificidad del ensayo se evaluó mediante pruebas. 20 organismos de referencia.

**Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** no mostrar ninguna reactividad cruzada con otros marcadores potenciales de reactividad cruzada que se muestran en la Tabla 3 a continuación:

**Tabla 3:** Posibles marcadores de reactividad cruzada probados en el estudio

Muestra	Fuente
Adenovirus Humano	NIBSC (Cat. No: 16/324)
Virus de la parainfluenza	ATCC VR-93
Influenza A	ATCC VR-95
Influenza A H5N1	ATCC VR-1609
Influenza A H1N1	ATCC VR-1672
Influenza A H3N2	ATCC VR-822
Influenza A H7N7	ATCC VR-1641
Influenza B	ATCC VR-101
Parainfluenza 1	ATCC VR-94
Parainfluenza 2	ATCC VR-92

Muestra	Fuente
Parainfluenza 3	ATCC VR-93
Parainfluenza 4	ATCC VR-579
Metapneumovirus humano (hMPV)	ATCC VR-3250SD
Enterovirus Humano V71	ATCC VR-1432
Virus respiratorio sincitial humano	ATCC VR-154
Coronavirus humano NL63	ATCC VR-3263SD
Coronavirus humano HKU1	ATCC VR-3262SD
Coronavirus humano 229E	ATCC VR-740
Betacoronavirus 1 OC43	ATCC VR-1558D
MERS Coronavirus	ATCC VR-3248SD

## 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:

- Pautas Provisionales para la Recolección, Manipulación y Prueba de Muestras Clínicas de Pacientes bajo Investigación (PIIs) 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/>.
- Uso de DIAGNOVITAL® Kit de Detección de Mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y 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 hisopos nasofaríngeos / orofaríngeos y lavado broncoalveolar.
- 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 ( $\leq 4$  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.
- El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 N501Y DIAGNOVITAL®** está validado con el Kit de Aislamiento RNA Viral RTA.
- El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 N501Y DIAGNOVITAL®** es compatible con Tianlong Genotex96 Extraction System y el Kit QIAamp® MinElute Virus Spin, Reactivos de Preparación de muestra 1.0 VERSANT®.
- *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.



**RTA Laboratuvarları**

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli / Turquia

**Teléfono:** +90 262 648 5300

**Fax:** +90 262 751 0677

**E-mail:** [rtalabs.com.tr](mailto:rtalabs.com.tr)

**Web:** [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)

**Fecha de Revisión / No de Revisión:** -/-



## 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 **Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** 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 microcentrífuga).
5. El **PCR Master Mix** proporcionado con **Kit de Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y** 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 (PC).

Componente	Volumen (µl)
Mezcla Maestra de PCR	15
Aislado de ARN / PC / NTC	5
<b>Total</b>	<b>20</b>


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	PC
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:



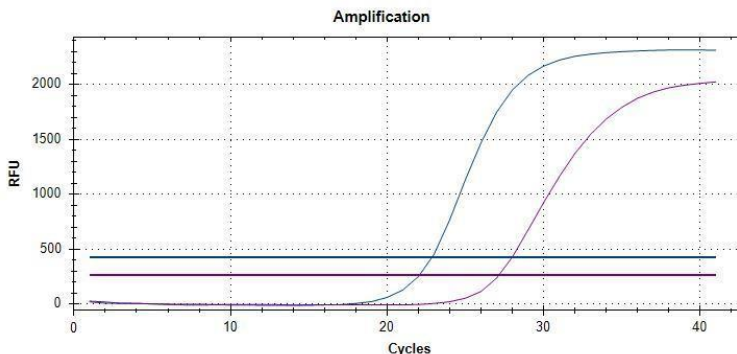
Paso	Ciclos	Temperatura	Duración
Transcripción inversa	1	50°C	10 minutos
Desnaturalización Inicial	1	95°C	2 minutos
Amplificación	40	95°C	5 segundos
		60°C* 	30 segundos

 \*Habilitar la Recopilación de Datos para **FAM™** (501N SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (Variante N501Y del SARS-CoV-2) y **Cy5** (HEC).

- 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.

## Análisis y Resolución de Problemas

### RESULTADOS EJEMPLARES



**Figura 2:** Curvas Azules: muestra tipo salvaje N501 en el canal **FAM** Curvas púrpuras: control interno en el canal **Cy5**.



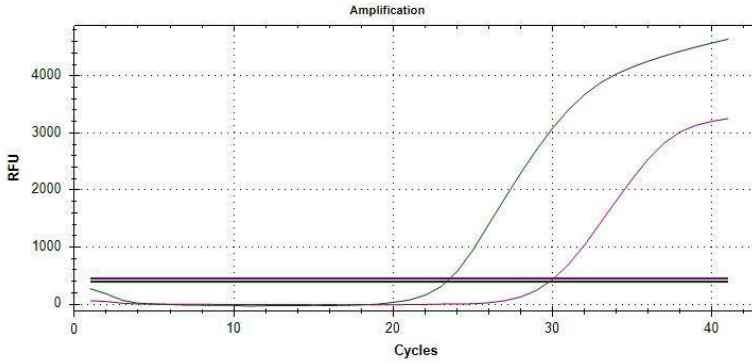


Figura 3: Curvas Verdes: Y501 Mutante positivo muestra en el **HEX** canal, Curvas púrpuras: control interno en el **Cy5** canal.

### Para Controles

- Para el control positivo, se debe observar un Ct positivo en los canales FAM y HEX/VIC. **Para el control positivo, se debe observar una Tc positiva en los canales FAM y HEX/ VIC. El valor Ct para control positivo debe ser  $20 \pm 3$ .** 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.
- No se debe observar amplificación en el canal FAM y HEX para el control negativo (NTC). La amplificación en el control negativo indica que la reacción está contaminada con una muestra de ARN/ ADN. Los equipos y los lugares de trabajo deben descontaminarse y las reacciones deben repetirse.

### Interpretación de Resultados

- 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.
- Para tener en cuenta una muestra positivo para el tipo salvaje N501 SARS-CoV-2, el FAM™ el canal debe dar un valor Ct positivo. Amplificación del HEC en Cy5 canal se espera alrededor de Ct 20-38. Si el HEC no se amplifica, la muestra debe considerarse positiva. La inhibición del control interno es posible, por ejemplo, si tiene una alta carga viral o si la muestra se deriva de cultivo celular en lugar de origen humano. Si el valor Ct de la muestra es  $>38$ , la muestra puede ser evaluada como negativa.
- Para tener en cuenta una muestra positiva de Mutación de la variante Y501 SARS-Co V-2, el canal HEX / VIC debe dar un valor Ct positivo.



- Si Ct es <38 para cada uno de los canales FAM, HEX y CY5, el resultado en el canal respectivo debe considerarse como **POSITIVO**, si Ct es > 38 o no se recibe ningún valor, el resultado en el canal relevante debe considerarse como **NEGATIVO**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Resultado
-	-	+	Este kit está diseñado para ejecutar solo muestras que hayan demostrado previamente ser positivas al SARS-CoV-2. De acuerdo con este resultado; la muestra no contiene cualquier ARN del SARS-CoV-2. El control fue amplificado con éxito. Podría haber varias razones para este resultado: -La prueba que dio un resultado positivo de SARS-CoV-2 a la muestra anterior debe ser revisada. -Se recomiendan variaciones en el análisis de secuencias de regiones de unión de sonda con un método diferente.
+	-	+	La muestra es <b>positivo para el tipo salvaje N501 SARS-CoV-2</b> .
-	+	+	La muestra es <b>positivo para la variante Y501 SARS-CoV-2</b> .
-	-	-	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 <b>Control Positivo (TPC)</b> .
-	-	-	Resultado esperado para el <b>Control Negativo (NTC)</b> .

## 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 **DIAGNOVITAL® Kit de Detección de Mutaciones del SARS-CoV-2 N501Y** 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
<b>Resultado negativo para el control interno</b>	Es posible que la mezcla maestra de PCR no haya sido homogénea.	El pipeteo debe realizarse para la Muestra maestra de PCR.
	El aislamiento del ARN puede no realizarse tan 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.
<b>Se observaron aumentos positivos de las muestras de NTC</b>	Puede haber ocurrido contaminación.	Es posible que se haya producido contaminación desde el área de trabajo hasta los artículos consumibles en los que se está trabajando. 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 ejecutar solo muestras que hayan demostrado previamente ser positivas al 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

QIAamp®(QIAGEN), DNAZap™(Life Technologies), 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.



## Símbolos



Fecha de Caducidad



Lote



Número de catálogo



Limitación de Temperatura



Precaución



Fabricante



Solo para uso en investigación.



Consulte las instrucciones de uso o  
consulte las instrucciones de uso  
electrónicas



Contiene suficiente para (n) cantidad de  
pruebas



**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](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

Web: [www.rtalabs.com.tr](http://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

**E-mail:** [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

**Web:** [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)

**Fecha de Revisión / No de Revisión:** -/-

