

# DIAGNOVITAL

## Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H

Detección cualitativa basada en RT-PCR de la mutación P681H del SARS-CoV-2

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

**RUO**

**REF**



090R17025 25 pruebas

090R17025 50 pruebas

090R17100 100 pruebas

## Tabla de contenidos

Uso indicado.....	3
Descripción del producto .....	3
Materiales proporcionados.....	4
Materiales adicionales necesarios .....	4
Almacenamiento.....	4
Características de rendimiento .....	5
Consideraciones antes de comenzar.....	5
Preparación de muestra.....	7
Ajuste de reacción .....	7
Análisis y solución de problemas.....	9
Limitaciones .....	11
Marcas registradas .....	12
Símbolos.....	13



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@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



## Uso previsto

El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** es una prueba basada en RT-PCR en tiempo real para la detección y diferenciación de la mutación P681H 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.

El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** detecta la mutación P681H 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 ARN SARS-CoV-2 y permiten P681H en la proteína Spike. La proteína de pico del SARS-CoV-2 de tipo salvaje tiene el aminoácido Prolina (P) en la ubicación 681, mientras que la variante de SARS-CoV-2 tiene el aminoácido Histidina (H) en la ubicación 681.

La mutación P681H se descubrió en muestras de todo el mundo ya en marzo de 2020, incluidos Nigeria, Hawái y, más recientemente, tres variantes independientes en Nueva York, y también caracteriza la propagación mundial de B.1.1.7 VOC. Se cree que la mutación P681H aumenta la transmisibilidad del virus al facilitar un cambio conformacional en la proteína S después de la actividad de la proteasa en la membrana celular porque es parte de un sitio de escisión de la proteasa furina y similar a la furina en la unión de la unión del receptor de la proteína espiga (S1) y dominios de fusión (S2). Además, la variante A.23.1, que se ha identificado como el linaje dominante en Uganda, y la familia de variantes B.1.617, que se ha identificado en la India, adquirieron la mutación P681R en la misma posición.

## Descripción del producto

El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** es un sistema de detección y diferenciación basado en RT-PCR en tiempo real para la mutación P681H del SARS-CoV-2. **Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el SARS-CoV-2.**

El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** 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 (P681) y mutante (H681) en diferentes canales.

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

El primer paso en la detección de la mutación P681H 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 el **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** la diferenciación entre los objetivos virales se logra mediante el uso de tres fluoróforos diferentes que se detectan en dos canales diferentes: FAM™ para el tipo salvaje SARS-CoV-2 P681, HEX/VIC para la mutación H681 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.

El **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** 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 /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: [rta@rta\\_labs.com.tr](mailto:rta@rta_labs.com.tr)  
Web: [www.rta\\_labs.com.tr](http://www.rta_labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



## Materiales proporcionados

Tabla 1: Contenido del Kit de PCR de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®

	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



**¡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), 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)

## 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 /Türkiye **Teléfono:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: [rta@rta\\_labs.com.tr](mailto:rta@rta_labs.com.tr)  
Web: [www.rta\\_labs.com.tr](http://www.rta_labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



## 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) para el canal de tipo salvaje y VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.1.7 (21MBC138001-R) RNA CONTROL 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 2: Detección de Mutaciones DIAGNOVITAL P681H - Valores límite de detección (LoD) y rangos de confianza del 95 %

Gen objetivo	Límite de Detección (copias/ml)	límite inferior de confianza del 95%	límite superior de confianza del 95%
P681	5460.957	4443.903	7453.119
H681	6085.187	5343.253	11423.383

### Especificidad diagnóstica

Se analizaron un total de 24 muestras clínicas de pacientes con síntomas de Covid mediante el **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** y los resultados fueron comparados con el análisis de secuencia de siguiente generación. 24 de ellas fueron positivas para la mutación P681H. El acuerdo porcentual negativo (NPA) del Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL® con respecto a NGS es 100%. Todos los controles internos (RNAseP) dieron positivo.

Tabla 3. Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681R DIAGNOVITAL® - Estudio de correlación NGS qPCR

Hisopo NP		Comparador (NGS y qPCR)	
		Mutante	Tipo salvaje
DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 Kit de Detección de Mutaciones P681H	R681	0	0
	H681	0	24
	Total	0	24

## Consideraciones antes de comenzar

### Biosafety

- 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:



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@rta\\_labs.com.tr](mailto:rta@rta_labs.com.tr)  
Web: [www.rta\\_labs.com.tr](http://www.rta_labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



- Pautas Provisionales para la Recolección, Manipulación y Prueba de Muestras Clínicas de Pacientes bajo Investigación (PIUs) para el Nuevo Coronavirus 2019 (SARS-COV-2)  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- Seguridad biológica en laboratorios biomédicos y microbiológicos 6ª edición en  
<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
- El uso del Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL® 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.



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@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



## 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 P681H DIAGNOVITAL®** está validado con el Kit de Aislamiento RNA Viral RTA.
- **El Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** es compatible con Tianlong Generotex96 Extraction System y el Kit QIAamp® MinElute Virus Spin.
- **Sistemas de PCR en Tiempo Real validados:** : Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx.
- **Compatible con los sistemas PCR en tiempo real** 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 del **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** 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 **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** 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
<b>Total</b>	<b>20</b>



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@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0




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 Fig. 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:

**Tabla 4: Perfil térmico del Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 L452R DIAGNOVITAL®**

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™** (Tipo salvaje P681 SARS-CoV-2), **HEX / VIC** (Mutación H681 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.



# Análisis y Resolución de Problemas

## RESULTADOS EJEMPLARES

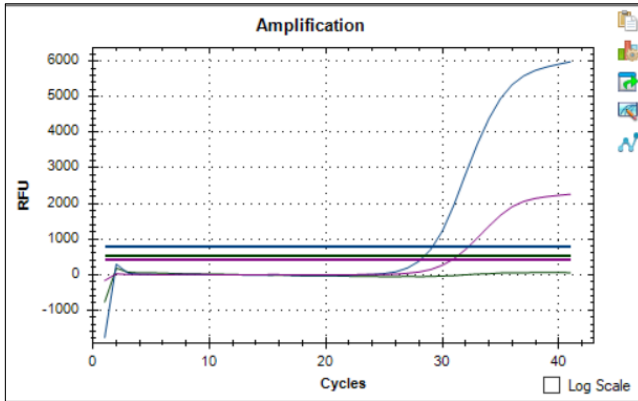


Figura 2: Curvas azules: P681 Tipo Salvaje muestra en el canal FAM, Curvas Moradas: control interno en el canal Cy5.

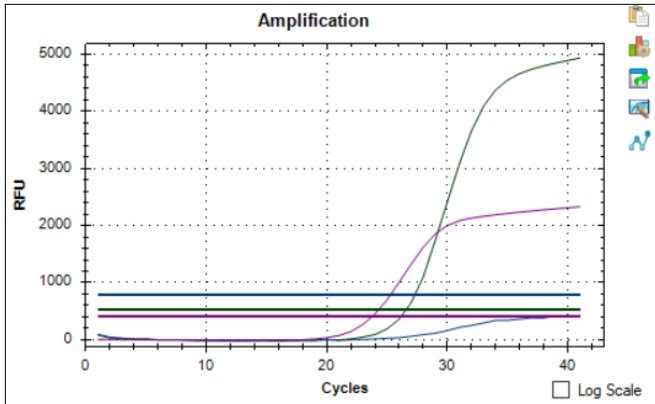


Figura 3: Curvas verdes: H681 Mutante muestra positiva en el canal HEX, Curvas Moradas: control interno en el Canal Cy5.

- Los controles dH<sub>2</sub>O (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  $\leq 38$  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 **negativo para mutación P681H**, el FAM™ y el Cy5 los canales deben dar un valor Ct positivo  $\leq 38$  ciclos. Amplificación del HEC en canal Cy5 se espera alrededor de Ct 20-38.

- Para tener en cuenta una muestra **positivo para mutación P681H**, el **HEX / VIC** el canal debe dar un valor **Ct positivo ≤ 38 ciclos**. Amplificación del HEC en canal **Cy5** se espera alrededor de Ct 20-38. Si el HEC no se amplifica, la muestra debe considerarse positiva. Este resultado es posible cuando se tiene un título de virus inusualmente alto, o la muestra no era de origen humano, sino un cultivo celular o un análisis de contaminación de la superficie.
- 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 <b>SARS-CoV-2</b> . Este kit está diseñado para analizar únicamente muestras que previamente hayan demostrado ser positivas para el <b>SARS-CoV-2</b> . -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 <b>negativo</b> para la mutación <b>P681H</b> .
-	+	+	La muestra es <b>positivo</b> para la mutación <b>P681H</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 el **Kit de Detección de Mutaciones SARS-CoV-2 P681H DIAGNOVITAL®** para sistemas de detección de PCR. Si el aumento de una muestra en cualquier canal es **inferior al 10%** del aumento del **Control positivo** 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.
	Es posible que el aislamiento de ARN no se realice correctamente.	El estudio debe repetirse desde el aislamiento.
	El aislado puede contener un inhibidor.	La etapa de PCR en tiempo real debe repetirse diluyendo el aislado 1/10.
<b>Resultado positivo para 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 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.



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@rta\\_labs.com.tr](mailto:rt@rta_labs.com.tr)  
Web: [www.rta\\_labs.com.tr](http://www.rta_labs.com.tr)

Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



- 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@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)

Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)

Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0



## Símbolos



Fecha de vencimiento



Lote / Número



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](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 **Telefona:** +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677 Correo electrónico: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)

Fecha de revisión de RTA / No de revisión: 0

