

Instruções de uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

03/2020 PT

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Apenas para uso de investigação!

(RUO)



821005



384



03 2020



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

Conteúdo

1.	Aplicação	5
2.	Componentes do Kit	5
3.	Armazenamento	5
4.	Descrição do Produto	7
4.1	Instrumento de PCR em tempo real	8
5.	Procedimento	8
5.1	Preparação de Amostras	9
5.2	Preparação da Master Mix	10
5.3	Preparação da Reação	12
6.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real	13
6.1	Definições	13
6.2	Detetores de fluorescência (corantes)	13
6.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante	14
7.	Análise de Dados	14
7.1	Interpretação dos Resultados	15
7.1.1	Análise Qualitativa	15
8.	Apoio Técnico	15
9.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	16
10.	Explicação de Símbolos	17

1. Aplicação

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

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

2. Componentes do Kit

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

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

Internal Control (IC) = 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. Descrição do Produto

O kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 consiste em um sistema de reagentes, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa e diferenciação de ARN específico do 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 (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 repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas do ARN de B-βCoV (gene alvo E) estão marcadas com o fluoróforo FAM™, enquanto as sondas específicas do ARN de SARS-CoV-2 (gene alvo S) estão marcadas com o fluoróforo Cy5. A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associadas a colorações distinguíveis permite a deteção paralela de ARN específico de B-βCoV e de ARN específico de SARS-CoV-2, assim como a deteção do 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 Controlo Interno
- Amplificação de PCR do ADNc alvo e do Controlo Interno
- Deteção simultânea de amplificações 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
- Positive Control (B-βCoV, SARS-CoV-2)
- Internal Control
- Water (PCR grade)

Internal Control (IC) = 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) para permitir transcricção reversa, a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ARN específico de B-βCoV (gene alvo E), ARN específico de SARS-CoV-2 (gene alvo S) e um Controlo Interno numa única preparação de reação.

4.1 Instrumento de 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:

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

NOTA



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

5. Procedimento

5.1 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)

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, 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 8. Apoio Técnico).

5.2 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 Controlo Interno (Internal Control, 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 tampão de espécime/lise. O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de tampão de espécime/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 (Controlo Interno) tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.

ATENÇÃO

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

5.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da 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
Controlo da Amostra	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 centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

6. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

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

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 8. Apoio Técnico).

6.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	ROX™

6.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ARN específico do B-βCoV	Gene alvo E	FAM™	(Nenhum)
ARN específico do SARS-CoV-2	Gene alvo S	Cy5	(Nenhum)
Internal Control (Controlo Interno)	IC	JOE™	(Nenhum)

6.3 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: seg]
Transcristase 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

7. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, 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 de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 8. Apoio Técnico).

7.1 Interpretação dos Resultados

7.1.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção			Interpretação de Resultados
FAM™	Cy5	JOE™	
+	+	+*	Foi detetado ARN específico do B-βCoV (gene alvo E) e do SARS-CoV-2 (gene alvo S).
+ [†]	-	+*	Foi detetado ARN específico do B-βCoV (gene alvo E).
-	+ [†]	+*	Foi detetado ARN específico do SARS-CoV-2 (gene alvo S).
-	-	+	Não foi detetado ARN específico do B-βCoV (gene alvo E) nem do SARS-CoV-2 (gene alvo S). A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do B-βCoV (gene alvo E) ou do SARS-CoV-2 (gene alvo S).
-	-	-	Inibição da RT-PCR ou falha do reagente. Repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo Interno no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção FAM™ nem no canal de deteção Cy5. Uma carga elevada de ARN de B-βCoV (gene alvo E) e/ou de SARS-CoV-2 (gene alvo S) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo Interno.

[†] Devido à sensibilidade ligeiramente diferente nos sistemas de detecção para o alvo do B-βCoV (FAM™) e do SARS-CoV-2 (Cy5), em casos raros as amostras fracamente positivas podem mostrar um sinal positivo no canal FAM™ mas não no canal Cy5 e vice versa.

8. 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**

9. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade
















AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

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 destinado à utilização em procedimentos de diagnóstico.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

10. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Destinado apenas à investigação
	Código do lote
	Cor cap
	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
	Nota
	Versão

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com