

gb SARS-CoV-2 Multiplex

Cat. no.: 3231-050
3231-200



INDICACIONES

gb SARS-CoV-2 Multiplex permite la detección del virus SARS-CoV-2 (coronavirus de Wuhan 2019). La detección se basa en los genes virales E y RdRP. La evaluación se origina en el protocolo publicado por el laboratorio Charité (Berlín) y el laboratorio Institut Pasteur (París).

FUNDAMENTOS DEL TEST

La prueba se basa en una metodología RT-qPCR de un solo paso. El kit contiene todos los componentes necesarios para realizar la prueba.

INSTRUCCIONES

- Deje que los reactivos se descongelen por completo, mezcle bien y volteándolos brevemente antes de cada uso.

Extracción del ARN

- Añádanse **10 µl** de **EPC Template RNA** (tubo con tapa amarilla) en cada tubo de muestra en que se realice la extracción.
- Utilice **Agua Desionizada** como Control Negativo y añada también como en el paso anterior

- Proceda con la extracción según el método que se emplee en el laboratorio

Procesamiento de RT-qPCR

- En un tubo tipo Eppendorf ponga **10 µl** de **Master Mix OneStep Multi** (tubo con tapa azul) y **5 µl** de **Assay CoV-2 E-RdRP** (tubo con tapa verde), tantas veces como muestras (N) vaya a procesar, incluyendo Controles (positivo y negativo): **10 x N + 5 x N**
Mézclelo bien (vortex), haga un pulso de centrifuga y reserve. De esta forma queda preparado para un ensayo completo. Maneje la mezcla de acuerdo con las instrucciones del capítulo Condiciones de almacenamiento y manipulación.

Paso alternativo: en el caso de que **EPC Template RNA** no se haya agregado en la extracción, se puede usar solamente como control interno de amplificación en la PCR agregando **0.25 µl** (x N número de muestras) en el tubo anterior.

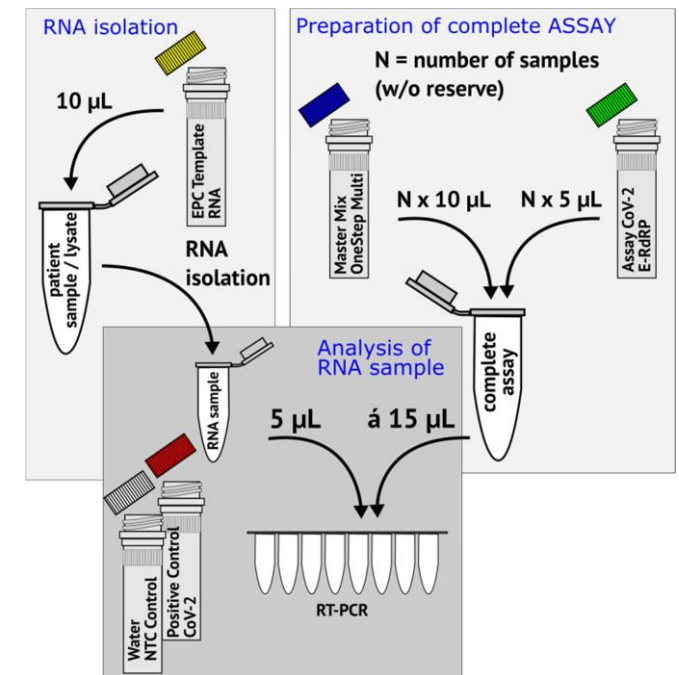
- Dispense y reparta la mezcla anterior añadiendo **15 µl** en cada microtubo o pocillo de la placa de PCR.
- Añadir **5 µl** de muestras y controles y cada uno de los tubos.
 - En cada tanda, debe añadirse un tubo con **Control Positivo CoV-2** y el **Agua Desionizada** preparada como Control Negativo
 - Utilice los ARN extraídos a la mayor brevedad
 - gb Human B2M mRNA (Cat. no. 3153) kit puede usuar como control de calidad en la extracción de ARN
- Ponga en marcha el ensayo en la mayor brevedad después de haber preparado las mezclas anteriores

Protocolo de amplificación y análisis de datos

- Programe su termociclador en base al siguiente perfil térmico:

Retranscripción	42 °C	30 min	50 ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 min	
Desnaturalización	95 °C	10 seg	
Aliniamiento+Elongación (+ lectura fluorescencia)	60 °C	30 seg	

- El volumen total de las reacciones de PCR es **20 µl**; también debe configurarse en el programa.
- Si se utiliza un Rotor-Gene, debe establecerse una ganancia idéntica para todos los canales, de modo que la fluorescencia básica esté dentro de 5–10 RFU.
Atención:
- en caso de establecer la ganancia antes del análisis, la temperatura de optimización de ganancia no debe exceder los **42 ° C**.
- La adquisición de fluorescencia debe seleccionarse para los canales FAM / SYBR, HEX / JOE / VIC y Cy5.
- Las instrucciones de configuración del termociclador pueden encontrarse en: <https://www.generi-biotech.com>: consulte la sección de "descarga" o siga las instrucciones de uso del fabricante del instrumento.



ANÁLISIS DE DATOS

Determine la presencia de SARS-CoV-2 en una muestra analizando los valores de Ct obtenidos con el software de su termociclador de PCR en tiempo real.

Expresa la señal como Ct (ciclo umbral) en un canal de fluorescencia dado en el modo de cuantificación. Lea los **valores de Ct para los genes virales en los canales FAM y HEX, los valores de Ct para el control positivo externo en el canal Cy5**. Para muestras fuertemente positivas, el control positivo externo puede no amplificarse. Para todos los canales activos, **se debe establecer el mismo valor de umbral de fluorescencia (umbral)** para la lectura. Siga las instrucciones del fabricante del termociclador.

Verifique primero la validez del ensayo atendiendo a las señales de de control.

Validación del ensayo

El análisis se considera válido cuando las señales de los controles se ajustan al siguiente patrón de diseño:

- Control positivo CoV-2 - señal en los canales FAM / SYBR, HEX / JOE / VIC y Cy5
- Agua desionizada como control de aislamiento negativo - señal en el canal Cy5
- Agua desionizada como NTC - sin señales FAM/HEX

Si el análisis es válido, continúe con la evaluación de las muestras. De lo contrario, siga las recomendaciones indicadas en el capítulo Solución de problemas.

Interpretación de resultados

El resultado final del análisis es la evaluación de la presencia de SARS-CoV-2 (es decir, positividad de la muestra).

Resultados VALIDOS	FAM	HEX	Cy5
Positivo	+	+	+/-
Negativo	-	-	+
Baja positividad “	Ct ≥ 35	-	+
	-	Ct ≥ 35	+
Positivo para otro virus como SARS-CoV-2 del subgénero Sarbecovirus”	Ct < 35	-	+/-
Resultados NO VALIDOS “”	FAM	HEX	Cy5
Failed isolation or inhibition of RT-PCR occurred, repeat analysis	-	-	-
	Ct ≥ 35	-	-
	-	Ct ≥ 35	-
Unreliable result	-	Ct < 35	+/-

“ Para estos resultados, recomendamos un análisis independiente con los kits **gb Sarbeco N** (prueba primaria) y **gb SARS-CoV-2 N** (prueba de confirmación) para verificar la presencia de virus basado en el gen N.

“” La calidad de la muestra se puede verificar utilizando el **gb Human B2M mRNA kit**

SOLUCIÓN A LOS PROBLEMAS

Los resultados del ensayo prueba pueden considerarse correctos solo si se siguen las instrucciones indicadas en este manual adjunto. Cuando las muestras de control den resultados incorrectos, verifique lo siguiente:

- la fecha de caducidad del kit
- las condiciones de almacenamiento y manipulación
- pipeteos y programación de termociclador

Problema:	Sugerencia correctiva
Se detecta una señal FAM y / o HEX en la reacción de control negativo (agua desionizada).	Las reacciones fueron muy probablemente contaminadas. Repite el análisis.
Se detecta una señal FAM y / o HEX en Repetidamente en la reacción de control negativo (agua desionizada)	Los reactivos se han contaminado. Elimínelos y abra viales nuevos
Se detecta una señal FAM y / o HEX en Repetidamente en la reacción de control negativo (agua desionizada)	El agua desionizada se ha contaminado. Elimínela y abra vial nuevo
El control positivo estándar no se detectó o se detectó solo en uno / dos de los canales.	Probablemente se produjo un error de pipeteo. Repite el análisis.
Se detectó una señal en el canal FAM y / o HEX en el control de aislamiento negativo; sin embargo, no se detectó señal en la PCR negativa control (NTC).	Probablemente se produjo una contaminación cruzada entre muestras. Prepare nuevos aislamientos de ARN.
No se midió ninguna señal en el canal Cy5 en el control de aislamiento negativo.	El ARN EPC quizás no se incluyó en las reacciones de extracción o se produjo un fallo de extracción. Repita el análisis siguiendo las instrucciones de uso.
No se midió señal en todos los canales para la muestra examinada, aunque el análisis se evaluó como válido.	La inhibición de la PCR probablemente causó el fracaso del análisis. Realice el análisis con un nuevo aislado de ARN.

CONTENIDO del KIT - COMPOSICIÓN

Componente ¹⁾	Volumen	Qty ²⁾	Concentración
● Assay CoV-2 E-RdRP	0,25 ml ³⁾	1 4	4x
● Master Mix OneStep Multi	0,5 ml ³⁾	1 4	2x
● Positive Control CoV-2	0,2 ml	1 1	4x
● EPC Template RNA	0,25 ml	2 8	
○ Deionized Water	1,0 ml	1 1	

¹⁾ TColor de tapón corresponde a tipo de reactivo.

²⁾ Número depende de tamaño del kit 50 | 200 reacciones.

³⁾ La suma equivale a 50 reacciones PCR con volumen final de 20 µl.

Ensayo CoV-2 E-RdRP

El ensayo CoV-2 E-RdRP es una mezcla de cebadores de amplificación y sondas marcadas con fluorescencia. Las sondas permiten la detección del **gen E viral en un canal FAM** ($\lambda_{\text{EXCITACIÓN}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISIÓN}} = 520 \text{ nm}$); y el **gen viral RdRP en un canal HEX** ($\lambda_{\text{EXCITACIÓN}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISIÓN}} = 556 \text{ nm}$); y **control positivo externo en un canal Cy5** ($\lambda_{\text{EXCITACIÓN}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISIÓN}} = 670 \text{ nm}$). De este modo, podemos detectar hasta tres señales cuando los genes virales están presentes, mientras que en su ausencia solo se detectará una señal de control positivo externo en el canal Cy5. El ensayo se suministra en un microtubo con una tapa verde. Su mezcla con Master Mix OneStep Multi proporciona un ensayo completo listo para usar.

Master Mix OneStep Multi

Master Mix OneStep, en el micro tubo de tapa azul, es una mezcla optimizada de tampón, transcriptasa inversa, polimerasa y mezcla de nucleótidos que es necesaria para RT-qPCR.

Positive Control CoV-2

Control positivo CoV-2 sirve como control positivo (estándar) para una verificación de la validez del análisis. Se suministra en un microtubo con una tapa roja. Maneje el control positivo para evitar la contaminación cruzada con otros componentes del kit y muestras analizadas.

EPC Template RNA

EPC Template RNA es un control positivo externo para la verificación del proceso de extracción de ARN. Se suministra en un microtubo con una tapa amarilla.

Agua desionizada

El agua desionizada sirve como control de aislamiento negativo y control sin plantilla (NTC) en la PCR. Se suministra en un tubo con tapa transparente.

Reactivos y equipos no incluidos en el kit.

- kit o reactivos para extracción de ARN viral
- microtubos, tiras o placas de plástico de un solo uso, convenientes para usar en PCR
- micropipetas ajustables con el rango correspondiente
- puntas de pipeta desechables con filtros
- vortex de laboratorio y microcentrífuga
- Termociclador de PCR en tiempo real con software

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Condiciones de almacenamiento y manipulación.

- Almacene todos los componentes del kit a una temperatura inferior a **-20°C**.
- El ensayo es fotosensible; por lo tanto, limite su uso bajo la luz al menor tiempo posible.
- Los reactivos están diseñados para trabajar a temperatura de laboratorio.
- Los componentes individuales del kit pueden descongelarse y congelarse repetidamente **5 veces como máximo**. No congele el ensayo completo resultante de mezclar Master Mix OneStep Multi y Assay CoV-2 E-RdRP. La mezcla de reacción final es **desechable**.
- Si se siguen las condiciones mencionadas anteriormente, el kit es estable hasta su fecha de **caducidad** indicada en la **etiqueta** de la caja.

Medidas de seguridad

- El kit está diseñado solo para uso profesional.
- Cuando trabaje con reactivos y material RT-qPCR, use siempre ropa de laboratorio y guantes de seguridad.
- En caso de contacto de la piel o los ojos con reactivos, enjuague el área afectada con agua corriente.

Modo de empleo

- Utilice siempre este manual. El número de versión correspondiente está marcado en la etiqueta.
 - El manejo inadecuado de los reactivos o los ajustes del flujo de trabajo pueden influir negativamente en los resultados y, por lo tanto, es necesario seguir estrictamente los volúmenes de pipeteo, los tiempos de incubación y las condiciones de temperatura como se indica en el manual.
 - Ajústese a la fecha de vencimiento del kit indicada en la etiqueta de la caja.
 - No mezcle componentes de diferentes lotes del kit.
 - Si algún componente está dañado cuando lo reciba, no lo use y contacte al fabricante inmediatamente. Consérvelo con el fin de una eventual reclamación.
 - Use pipetas e instrumentos calibrados.
 - Deseche todos los materiales de desecho de acuerdo con la legislación aplicable. El empaque externo está hecho de papel, el segmento interno de poliuretano y los microtubos de polipropileno. Los reactivos pueden manejarse como residuos comunes. Deseche el producto de análisis de PCR final teniendo en cuenta el riesgo de contaminación del espacio de trabajo.
- ### Precauciones de contaminación
- Asigne espacios, equipos, materiales y equipos de protección específicos para la extracción del ARN de las muestras; deben ser diferentes para preparar RT-qPCR.
 - Cambie sus guantes y ropa protectora cuando sospeche contaminación.
 - Nunca abra un producto de PCR amplificado en el lugar donde se preparan las reacciones de PCR.
 - Deje los reactivos abiertos solo durante el tiempo necesario para preparar las reacciones de PCR.
 - Use puntas con filtros al pipetear.
 - Al preparar una mezcla de reacción, tenga cuidado de no contaminar ningún componente ni las muestras con el control positivo. Esto puede evitarse cerrando todos los microtubos antes de manipular un control positivo.
 - Use agua ultra limpia para la dilución de la muestra; El agua desionizada provista con el kit puede usarse para este propósito.

SÍMBOLOS

GENERI BIOTECH s.r.o.



Machkova 587/42
CZ-500 11, Hradec Kralove - Trebes
CZECH REPUBLIC

	Lote
	Fecha de caducidad
	Tª de almacenamiento
	Contenido
	Fabricante
	Número de test

www.generi-biotech.com

Phone: +420 495 056 314

E-mail: info@generi-biotech.com

Versión del manual: 1.2

Fecha de la última revisión: 27. 07. 2020

GAMA DE PRODUCTOS

gb Sarbeco E (primary test)	cat nº 3227
gb SARS-CoV-2 RdRP (confirmation test)	cat nº 3228
gb Sarbeco N (primary test)	cat nº 3229
gb SARS-CoV-2 N (confirmation test)	cat nº 3230
gb Human B2M mRNA	cat nº 3153

REFERENCIAS

Cuando use el kit, siga el manual del fabricante del termociclador. La lista de aquellos en los que se han probado los parámetros de rendimiento del kit están disponible en el sitio web del fabricante.

Para obtener información adicional, contáctenos en nuestra dirección de correo electrónico: info@generi-biotech.com o por teléfono: +420 495 056 314. También puede encontrar más información en nuestro sitio web www.generi-biotech.com.