

MANUAL DE USO

DÉTECTION EXPERT 1S SARS COV-2

KIT ONE STEP REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN
REACTION PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA DE SARS-CoV-2
[Formato para PCR de 5 canales]

V2.7.



DIAGNÓSTICO CUALITATIVO IN-VITRO



GeneStore Francia SAS
800 Avenue du Château de Jouques,
13420 Gémenos
Provence-Alpes-Côte d'Azur France

REF

GS.D1F.31519.100
GS.D1F.31519.1000



GS.D1F.31519.2.HB.EN.V.2.7.

MAT

GS.D1F.31519.2.HB.EN.V.2.7.



100

[Cat. No. GS.D1F.31519.2.100]



1000

[Cat. No. GS.D1F.31519.2.1000]

GENESTORE®
FRANCE

COMPROMETIDOS CON EL AVANCE Y LA CALIDAD DE LAS TECNOLOGÍAS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

GeneStore es una empresa de diagnóstico genómico con sede en Provenza, Francia.

En la actualidad, GeneStore opera instalaciones de I+D+i y producción en Europa, Oriente Medio, América del Sur y Asia.

Creemos firmemente en la importancia de proporcionar productos técnicamente avanzados y de alta calidad en todo el mundo para garantizar un procedimiento de muestra a resultado simplificado y robusto.

Para obtener más información sobre la empresa, visite: www.genestore.org.

ÍNDICE

USO PREVISTO	04
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	05
SÍMBOLOS	06
ALMACENAMIENTO, MANEJO Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS	07
COMPONENTES DEL KIT	08
MATERIAL NO SUMINISTRADO EN EL KIT	10
EQUIPOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS CON ESTE KIT	11
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	12
LIMITACIONES ANALÍTICAS	14
CONTROL DE LA EXTRACCIÓN A UTILIZARSE CON DETECTION EXPERT 1S © SARS COV-2 RT-PCR KIT	16
PROTOCOLO DE ENSAYO	18
DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR	19
ANÁLISIS DE DATOS	28
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	29
CONTROL DE CALIDAD	34
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	35
SOPORTE TÉCNICO	42
GARANTÍA LIMITADA	42

USO PREVISTO

El kit GeneStore Detection Expert 1S © SARS CoV-2 es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR de un solo paso para la detección cualitativa del ácido nucleico viral del SARS CoV-2 en muestras respiratorias superiores e inferiores (hisopo orofaríngeo, aspirado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar (BAL)) de personas sospechosas de COVID-19 por su médico.

Los resultados sirven para la identificación de RNA del SARS-CoV-2, que es detectable generalmente en muestras respiratorias durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2. La correlación clínica con el historial del paciente y otra información diagnóstica es necesaria para determinar el estado de la infección del paciente. Los resultados positivos no descartan infección bacteriana o coinfección con otros virus. El patógeno detectado puede no ser la causa definitiva de la enfermedad.

Los resultados negativos no excluyen la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para las decisiones de manejo del paciente. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes del paciente e información epidemiológica.

La prueba con Detection Expert 1S © SARS-CoV-2 RT-PCR está diseñada para que la utilice personal de laboratorio clínico específicamente instruido y capacitado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico in vitro.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El kit de GeneSotre Detection Expert SARS-CoV-2© incluye reactivos y controles para la amplificación directa y detección cualitativa mediante PCR multiplex en tiempo real de ARN SARS-CoV-2 en muestras de torunda nasofaríngea, lavados broncoalveolares y aspirados nasofaríngeos, de individuos sospechosos de COVID-19 por su médico.

El kit One Step rRT-PCR GeneStore Detection Expert SARS-CoV-2 © incluye los siguientes componentes:

- A. Ensayo multiplexado de PCR en tiempo real del SARS CoV-2 que contiene dos conjuntos de cebadores y sondas para detectar dos regiones en el gen N del genoma del SARS-CoV-2, y
- B. Un conjunto de sonda de cebador para detectar la RNasa P (RP) humana en una muestra clínica.
- C. Controles positivos que contienen dianas específicas de las regiones genómicas del SARS CoV 2 cubiertas por el ensayo

SÍMBOLOS



<N> Contiene reactivos para <N> pruebas



Fecha de caducidad



Producto sanitario de diagnóstico in vitro



Número de referencia



Número de lote



Número de material



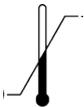
Componentes



Contiene



Número



Límites de temperatura



Fabricante



Consulte instrucciones de uso



Nota importante



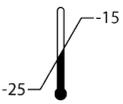
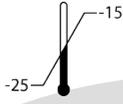
Marca CE - conformidad europea

ALMACENAMIENTO, MANEJO Y ESTABILIDAD DE REACTIVOS

1. Almacene todos los cebadores y sondas secos y el control positivo a 2-8 °C hasta que se rehidrate para su uso. Almacene los materiales líquidos entre -25 °C y -15 °C.
2. Siempre verifique la fecha de caducidad antes de usar los reactivos. No utilice reactivos caducados.
3. Proteja las sondas fluorogénicas de la luz.
4. Los cebadores, sondas (incluidas las alícuotas) y el Master de enzimas deben descongelarse y mantenerse en un bloque frío en todo momento durante la preparación y el uso.
5. No vuelva a congelar las sondas.
6. Los controles y las alícuotas de los controles deben descongelarse y mantenerse en hielo en todo momento durante la preparación y el uso.
7. Uso exclusivo para diagnóstico in vitro por profesional de laboratorio cualificado.

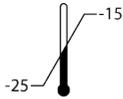
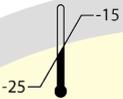
COMPONENTES DEL KIT

Detection Expert SARS CoV-2 © One Step rRT PCR Kit 100 Reacciones
 [Cat No. GS.D1F.31519.2.100]

Componente	Descripción	Cantidad	Condiciones almacen.
Detection Expert 1S © SARS CoV-2 One Step rRT PCR Kit 100 Reactions CAT. NO. GS.D1F.31519.2.100	SARS CoV 2 PROBE MIX <ul style="list-style-type: none"> • N1 [FAM] • N2 [HEX] • RNaseP [CY5] 	454.50 µL	 -25°C to -15°C
	Probe Expert© One Step RT PCR ENZYME MIX	1212.00 µL	
Detection Expert © SARS CoV-2 Control Pack Cat. No. GS. REFMA. QUAL.31519.2.100	Positive Control SARS CoV 2 N1 + N2	100.00 µL	 -25°C to -15°C

COMPONENTES DEL KIT

Detection Expert SARS CoV-2 © One Step rRT PCR Kit 1000 Reacciones
 [Cat No. GS.D1F.31519.2.1000]

Componente	Descripción	Cantidad	Condiciones almacen.
Detection Expert 1S © SARS CoV-2 One Step rRT PCR Kit 1000 Reactions Cat. No.: GS.D1F.31519 .2.1000	SARS CoV 2 PROBE MIX <ul style="list-style-type: none"> • N1 [FAM] • N2 [HEX] • RNaseP [CY5] 	454.50 µL [10 Tubes]	 -25°C to -15°C
	Probe Expert© One Step RT PCR ENZYME MIX	1212.00 µL [10 Tubes]	
Detection Expert © SARS CoV-2 Control Pack Cat. No. GS.REFMA. QUAL. 31519.1000	Positive Control SARS CoV 2 N1 + N2	100.00 µL	 -25°C to -15°C

MATERIAL NO SUMINISTRADO EN EL KIT

1. Mezclador Vortex
2. Microcentrifuga
3. Micropipetas (2 ó 10 μL , 200 μL y 1000 μL)
4. Micropipetas multicanal (5-50 μl)
5. Bastidores para tubos de microcentrifuga de 1,5 ml.
6. 2 x bloques fríos de 96 pozos $-20\mu\text{C}$
7. Sistemas de PCR en tiempo real con software de análisis
8. Sistemas de extracción de ácido nucleico
9. Agua de grado molecular, sin nucleasas (para usar como control negativo) 12. 10% de lejía (dilución 1:10 de hipoclorito comercial blanqueador)
10. DNAZapTM (Ambion, cat. # AM9890) o equivalente
11. RNase AwayTM (Fisher Scientific; cat. # 21-236-21) o equivalente
12. Guantes desechables sin polvo y batas quirúrgicas
13. Puntas de pipeta de barrera de aerosol
14. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml (sin ADNasa / RNasa)
15. Placas de reacción de PCR de 0.2 ml / tubos de tira
16. Tiras ópticas de 8 tapas (si se usan tubos de tira)

EQUIPOS E INSTRUMENTOS COMPATIBLES CON ESTE KIT

Este kit ha sido validado para su uso con los siguientes instrumentos:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- 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)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems)
- Mic qPCR Cyclers (bio molecular systems)
- BIOER Linegene 9600
- SLAN 96P

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Diseñado para uso profesional para el diagnóstico in vitro (IVD).
- Siga las precauciones estándar. Todas las muestras de pacientes y controles positivos deben considerarse potencialmente infecciosos y manipularse como tal.
- No coma, beba, fume, aplique cosméticos ni toque lentes de contacto en áreas donde se manipulan reactivos y muestras humanas.
- Maneje todas las muestras como si fueran infecciosas utilizando procedimientos de laboratorio seguros. Consulte las Directrices provisionales de bioseguridad de laboratorio para el manejo y procesamiento de muestras asociadas con SARS-CoV-2 (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-Guidelines.html>).
- El procesamiento de la muestra debe realizarse de acuerdo con las normas nacionales de seguridad biológica.
- Si se sospecha una infección con SARS-CoV-2 en base a los criterios clínicos y epidemiológicos actuales recomendados por las autoridades de salud pública, las muestras se deben recolectar con las precauciones adecuadas de control de infecciones.
- Las características de rendimiento se han determinado con muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores de pacientes humanos con signos y síntomas de infección respiratoria.
- Realice todas las manipulaciones de muestras de virus vivos dentro de un gabinete de seguridad biológica de Clase II (o superior).
- Use equipo de protección personal como (pero no limitado a) guantes, protección para los ojos y batas de laboratorio, al manipular los reactivos del kit mientras realiza este ensayo y manipula materiales, incluidas muestras, reactivos, pipetas y otros equipos y reactivos.
- Las tecnologías de amplificación como la PCR son sensibles a la introducción accidental de productos de PCR de reacciones de amplificación anteriores. Se podrían producir resultados incorrectos si la muestra clínica o los reactivos en tiempo real utilizados en la etapa de amplificación se contaminan por la introducción accidental del producto de amplificación (amplición). El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional.

Continúa en la siguiente página

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Mantener áreas separadas para la configuración del ensayo y el manejo de ácidos nucleicos.
- Siempre verifique la fecha de caducidad antes del uso. No use el reactivo caducado. No sustituya ni mezcle reactivos de diferentes lotes de kits o de otros fabricantes.
- Cambie las puntas de pipeta entre todas las transferencias manuales de líquidos.
- Durante la preparación de las muestras, el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio es esencial para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras y la introducción accidental de nucleasas en las muestras durante y después del procedimiento de extracción. Siempre se debe usar una técnica aséptica adecuada cuando se trabaja con ácidos nucleicos.
- Mantenga equipos separados y dedicados (por ejemplo, Pipetas, microcentrifugadoras) y suministros (por ejemplo, tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta) para la configuración del ensayo y la manipulación de ácidos nucleicos extraídos.
- Use una bata de laboratorio limpia y guantes desechables sin polvo (no usados previamente) cuando configure los ensayos.
- Cambie los guantes entre muestras y siempre que se sospeche de contaminación.
- Mantenga el reactivo y los tubos de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible.
- Los primers, las sondas (incluidas las alícuotas) y la Master Mix deben descongelarse y mantenerse en bloques fríos en todo momento durante la preparación y el uso.
- Las superficies de trabajo, las pipetas y las centrifugas deben limpiarse y descontaminarse con productos de limpieza, como lejía al 10%, para minimizar el riesgo de contaminación por ácido nucleico. El blanqueador residual debe eliminarse con etanol al 70%.
- El ARN debe mantenerse en bloques fríos o en hielo durante la preparación y el uso para garantizar la estabilidad.
- Deseche los reactivos del kit no utilizados y las muestras humanas de acuerdo con las reglamentaciones locales, estatales y federales.

LIMITACIONES

El rendimiento del kit GeneStore Detection Expert 1ST © SARS-CoV-2 rRT-PCR se estableció utilizando únicamente muestras de hisopado nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo, aspirado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar. No se han evaluado otros tipos de muestras y no deben probarse con este ensayo. Las muestras deben recolectarse, transportarse y almacenarse utilizando los procedimientos y condiciones adecuados. La recogida, el transporte o el almacenamiento incorrectos de las muestras pueden dificultar la capacidad del ensayo para detectar las secuencias diana.

La extracción y amplificación de ácido nucleico de muestras clínicas debe realizarse de acuerdo con los métodos especificados enumerados en este procedimiento. No se han evaluado otros enfoques de extracción y sistemas de procesamiento.

Los resultados falsos negativos pueden surgir de:

- Recolección de muestras inadecuada
- Degradación del ARN del SARS-CoV-2 durante el envío / almacenamiento
- La recolección de muestras después del ARN del SARS-CoV-2 ya no se puede encontrar en la matriz de la muestra
- Uso de reactivos de extracción o ensayo no autorizados
- La presencia de inhibidores de RT-PCR
- Mutación en el virus SARS-CoV-2
- No seguir las instrucciones de uso

Los resultados falsos positivos pueden deberse a:

- Contaminación cruzada durante la manipulación o preparación de muestras
- Contaminación cruzada entre muestras de pacientes
- Mezcla de muestras
- Contaminación por ARN durante la manipulación del producto

Continúa en la siguiente página

LIMITACIONES

- No se han evaluado los impactos de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, fármacos quimioterapéuticos o inmunosupresores. El kit GeneStore Detection Expert 1S © SARS-CoV-2 rRT PCR no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos o virales.
- Los resultados negativos no excluyen la infección por el virus SARS-CoV-2 y no deben ser la única base de una decisión de manejo del paciente.
- Los laboratorios deben informar todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.

CONTROLES A UTILIZARSE CON DETECTION EXPERT 1S© SARS CoV-2 rRT-PCR

Las muestras de pacientes deben recolectarse de acuerdo con las pautas de laboratorio apropiadas. Deben incluirse controles de prueba positivos y negativos para interpretar con precisión los resultados de las pruebas del paciente.

Incluya los siguientes controles:

Control	Condiciones de uso	Ensayos
GeneStore Detection Expert © SARS CoV-2 Positive Control Pack	Configuración de la reacción de RT-PCR e integridad del reactivo	Ensayo Detection Expert 1S © SARS CoV-2 rRT PCR
RNase P ** (Mezcla de sonda incluida en el ensayo RT PCR)	Extracción de RNA	Ensayo Detection Expert 1S © SARS CoV-2 rRT PCR
Control Negativo (no suministrado con el kit, use agua libre de nucleasas)	Contaminación cruzada durante la extracción de RNA y preparación de la reacción	Ensayo Detection Expert 1S © SARS CoV-2 rRT PCR

** El marcador RNase P incluido en el ensayo multiplex SARS CoV2 RT PCR sirve como medida de rendimiento del método de extracción de ácido nucleico y un control interno. El ensayo RNaseP se basa en la disponibilidad del ADN genómico/ARN de la muestra humana que ha sido objeto de extracción, y amplificará si el rendimiento de extracción es adecuado.

Preparación del control positivo:

Precauciones: este reactivo debe manipularse con precaución en un área de manejo de ácido nucleico dedicada para prevenir la posible contaminación. Se deben evitar los ciclos de congelación y descongelación. Mantener en hielo una vez descongelado.

Haga alícuotas de un solo uso (aproximadamente 30 µL) y almacene a $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Descongele una sola alícuota de control positivo diluido para cada experimento y manténgala en hielo hasta que se agregue a la placa. Deseche cualquier porción no utilizada de la alícuota.

Control de extracción humana (HEC) (RNaseP)

El control de extracción humana (HEC) se realiza a través del ensayo RNasa P, que se basa en el genoma de ARN y ADN que se extrae de la muestra humana sometida a prueba. El marcador RNasa P se incluye en el ensayo RT PCR para SARS-CoV-2, y utiliza la plantilla de ARN como plantilla primaria.

Control sin plantilla (NTC) (no incluido)

1. Agua estéril, libre de nucleasas.
2. Alicuotar en volúmenes pequeños.
3. Se utiliza para verificar la contaminación durante la extracción de muestras y /o la configuración de la placa.

PROTOCOLO DEL ENSAYO

Preparación de los equipos

Limpie y descontamine todas las superficies de trabajo, pipetas, centrifugas y otros equipos antes de su uso. Deben usarse agentes de descontaminación que incluyan lejía al 10%, etanol al 70%, para minimizar el riesgo de contaminación por ácido nucleico.

Extracción de Ácidos Nucleicos

El rendimiento del ensayo de RT-PCR en tiempo real depende de la cantidad y la calidad de la plantilla de ARN purificada a partir de muestras humanas. Utilice kits y procedimientos de extracción de ARN disponibles comercialmente que hayan sido calificados y validados para la recuperación y pureza del ARN viral en muestras de hisopado nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo y lavado broncoalveolar. Se deben seguir los procedimientos recomendados por el fabricante para la extracción de muestras.

RT PCR directa usando inactivación por calor

El equipo del laboratorio también puede optar por proceder directamente a la configuración del ensayo RT-PCR sin extracción de ácido nucleico de muestras de hisopos suspendidos en medio de transporte viral (VTM) o hisopos secos. Para hisopos secos, se requiere volver a suspender en 1.0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la inactivación por calor.

Protocolo para la inactivación por calor antes de la configuración del ensayo de RT PCR:

1. Coloque alícuotas de 0,5 ml -1,0 ml (hisopo + solución VTM) o (hisopo seco + solución de PBS) en tubos Eppendorf de 1,5 / 2,0 ml.
2. Incubar los tubos en baño seco durante 10 minutos a 95°C o en un horno de aire caliente 15 minutos a 120°C.
3. Continúe con la adición de la plantilla para RT PCR.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

NOTA IMPORTANTE

- Prepare la placa de análisis en hielo y manténgala en hielo hasta que se cargue en el instrumento de PCR en tiempo real.
- Ejecute la placa inmediatamente después de la preparación. Si no lo hace, las muestras de ARN podrían degradarse.
- Para evitar la contaminación, prepare los reactivos en una estación de trabajo de PCR o en un área equivalente sin amplicones. No utilice la misma pipeta para controles y muestras, y utilice siempre puntas de pipeta con barrera para aerosoles.
- Mantenga un entorno libre de RNasa.
- Proteja los ensayos de la luz.
- Mantenga las muestras y los componentes en hielo durante su uso.
- Incluya un control positivo y un control negativo en cada ciclo / placa, y configure y ejecute el instrumento de PCR en tiempo real.

Preparación del ensayo RT PCR

Nota: La configuración de la placa / ejecución puede variar con el número de muestras y la organización de la jornada laboral. Se deben incluir NTC y controles positivos en cada carrera.

1. Si está congelado, descongele el ácido nucleico purificado o el VTM tratado térmicamente o los hisopos secos resuspendidos en muestras de PBS y reactivos en hielo.
2. Agite suavemente las muestras y los reactivos, luego centrifugue brevemente para recolectar líquido en el fondo de la placa de 96 pocillos / tubos individuales.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

Preparación de la mezcla de reacción de ADNc

Para cada ejecución, combine los siguientes componentes suficientes para el número de pruebas, más un Control Positivo y un Control Negativo.

Para reacciones N1 y N2 multiplexadas		
Componente	Volumen por muestra o control	Volumen para N muestras o controles
ENZYME MIX	12.00 µL	12.00 * [N + 1] µL
PROBE MIX	4.50 µL	4.50 * [N + 1] µL
Volumen total del Mix	16.50 µL	-

1. Dispense los reactivos en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetado respectivo. Después de la adición de los reactivos, mezcle las mezclas de reacción pipeteando hacia arriba y hacia abajo. No agite.
2. Centrifugue durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo y luego coloque el tubo en una rejilla fría.
3. Coloque los tubos o las placas de tiras de reacción en una rejilla de refrigeración de 96 pocillos.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

4. Dispense 16,50 μL de cada mezcla de preparación de RT PCR en los pocillos correspondientes a las muestras y controles.
5. Antes de pasar al área de manipulación de ácidos nucleicos, prepare las reacciones de control sin molde (NTC) para la columna n. ° 1 en el área de preparación del ensayo.
6. Pipetee 5,00 μL de agua libre de nucleasas en los pocillos de muestra de NTC. Tape bien los pozos de NTC antes de continuar.
7. Cubra toda la placa / tubos de reacción y mueva la placa / tubos de reacción al área de manipulación de ácido nucleico de la muestra.

Adición de plantilla de ácido nucleico

8. Agite suavemente los tubos de muestra de ácido nucleico durante aproximadamente 5 segundos.
9. Centrifugue durante 5 segundos para recoger el contenido en el fondo del tubo.
10. Después de la centrifugación, coloque los tubos de muestra de ácido nucleico extraídos en la rejilla fría.
11. Pipetee con cuidado 3.5-5,00 μL de la primera muestra en todos los pocillos etiquetados para esa muestra (Tube1: N1 + N2 + RNaseP multiplex). Mantenga los otros pocillos de muestra cubiertos durante la adición. Cambie las puntas después de cada adición.
12. Tape de forma segura la columna a la que se ha añadido la muestra para evitar la contaminación cruzada y garantizar el seguimiento de la muestra.
13. Cámbiese los guantes con frecuencia y cuando sea necesario para evitar la contaminación.
14. Repita los pasos # 11 y # 12 para las muestras restantes.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

Figura: Ejemplo de configuración de la placa de mezcla maestra de reacción

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N1											
	N2											
	RP											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Programación del termociclador:

Etapa 1: 42°C for 5 mins

Etapa 2: 95°C for 5 mins

Ejecute **40 ciclos** según las instrucciones siguientes:

Denaturalización: 95°C durante 15 segundos

Recogida de datos: 58°C durante 30 segundos

Canales de adquisición:

- N1+N2 reacción multiplexada:
 - N1 en FAM (canal verde) + N2 en HEX (canal amarillo)
- RNasa P en CY5 (canal rojo).

Configuración de su instrumento de reacción RT PCR

1. Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del instrumento Rotor-Gene) se coloca en la parte superior del rotor para evitar la apertura accidental de los tubos durante la ejecución.
2. Para la detección del ARN del SARS CoV 2, cree un perfil de temperatura de acuerdo con los pasos de la siguiente página:

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

Establecer los parámetros del ensayo general

1. En primer lugar, abra el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para nueva serie). Marque la casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en “Next” (Siguiente).

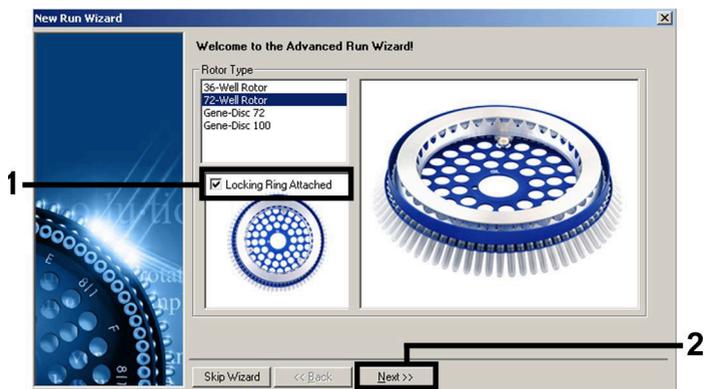


Figura. Cuadro de diálogo “New Run Wizard”.

2. Seleccione 25 para el volumen de reacción de PCR y haga clic en “Siguiente”.

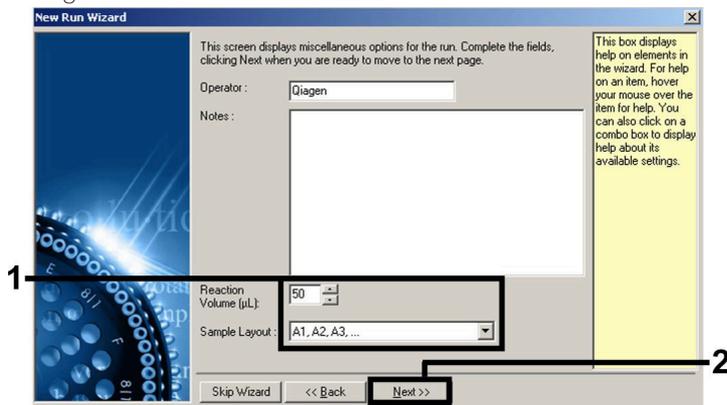


Figura. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

Continúa en la siguiente página

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

3. Haga clic en el botón “Edit Profile” (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo “New Run Wizard” y programe el perfil de temperatura como se muestra en las siguientes figuras.

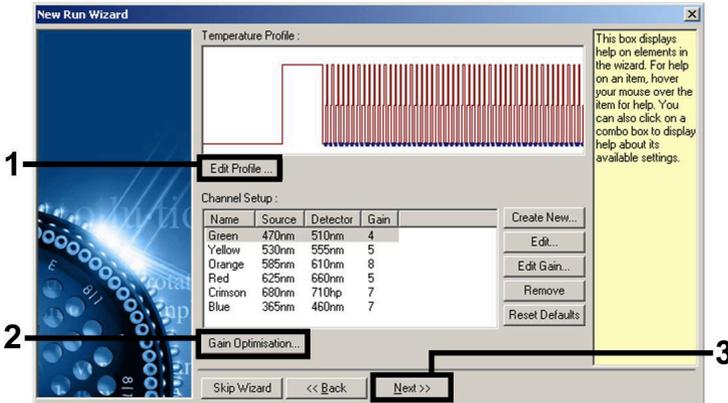


Figura. Edición del perfil.

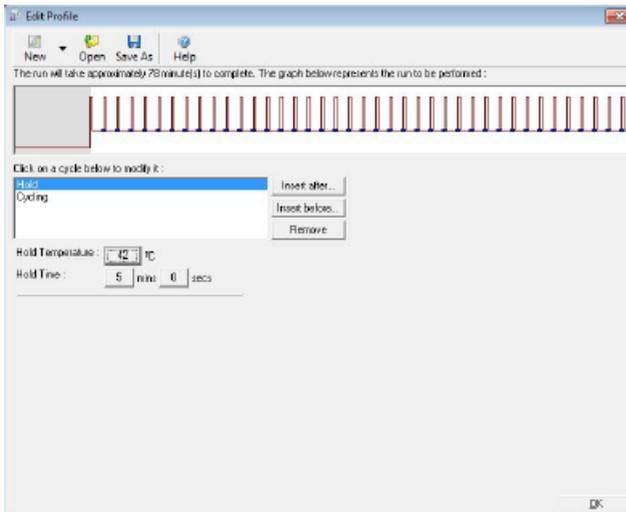


Figura. Transcripción inversa del ARN.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

4. El intervalo de detección de los canales de fluorescencia debe determinarse según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Configure la temperatura de calibración en 58 para que coincida con la temperatura de apareamiento del programa de amplificación.

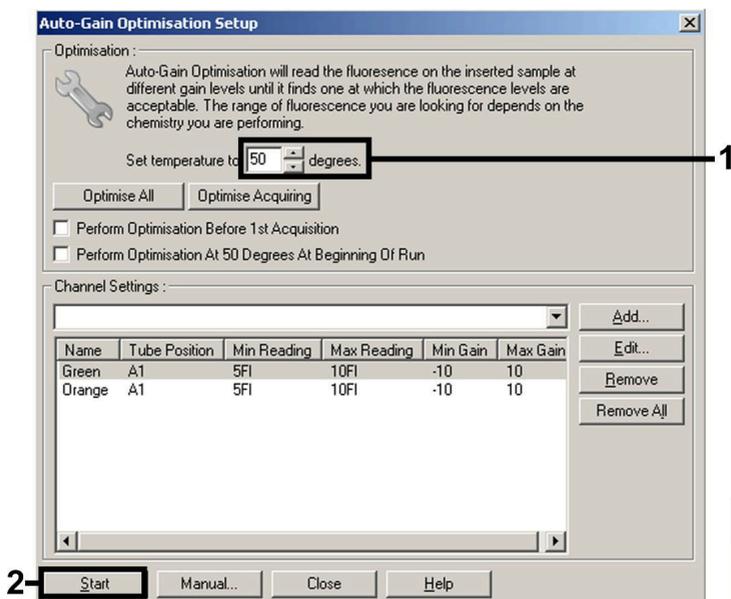


Figura. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

DIRECTRICES PARA LA CONFIGURACIÓN PARA LA RT-PCR

5. Los valores de ganancia determinados por la calibración de los canales se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación. Haga clic en “Start Run” (Iniciar serie).

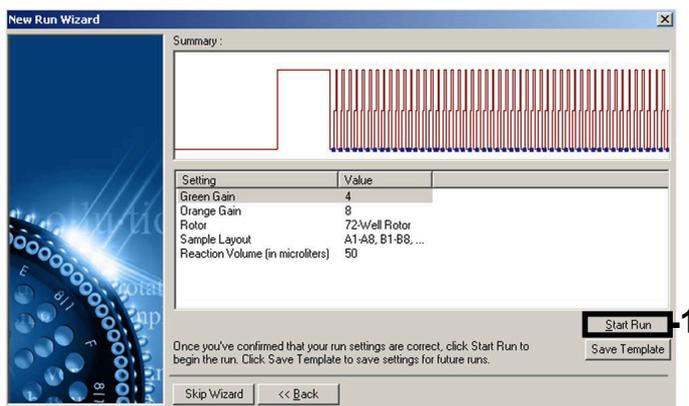


Figura. Inicio de la serie.

6. Cuando haya finalizado la serie, analice los datos.

6a. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ARN del SARS-CoV-2.

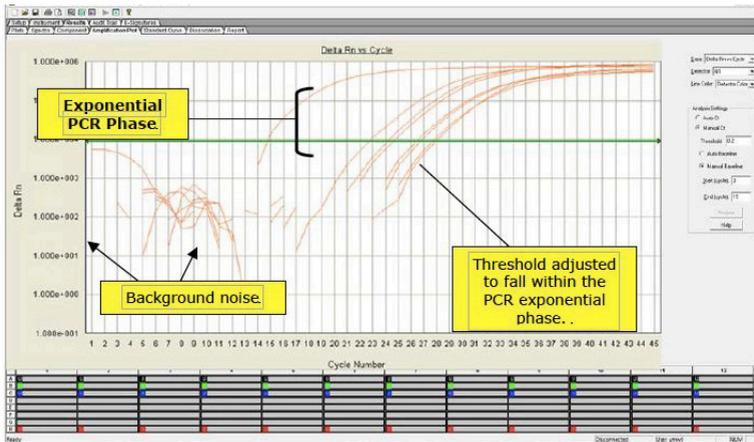
6b. No se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del control interno en el canal Cycling Orange. En la muestra no hay ARN del SARS-CoV-2 detectable. Puede considerarse negativa.

En el caso de una RT-PCR negativa del SARS-CoV-2, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de una inhibición de la RT-PCR.

DATA ANALYSIS

Nota: Consulte el manual de su instrumento para generar el diagrama de amplificación y generar valores de Ct para cada muestra.

Nota sobre la determinación de los valores de Ct: ajuste la línea de umbral hasta que se encuentre dentro de la fase exponencial de las curvas y por encima de cualquier señal de fondo.



Determine el valor de Ct de cada marcador evaluado y cree una tabla según el siguiente formato:

ID muestra	Marcador N1 (Ct)	arcador N1 (Ct)	RNasa P (Ct)
uestra			
Control Positivo			
Control Negativo			

INTERPRETACIÓN E INFORMES DE RESULTADOS

Interpretación de resultados de extracción y control positivo

Control de muestra sin plantilla (NTC) (No incluido en el Kit)

El NTC consiste en utilizar agua libre de nucleasas en las reacciones rRT-PCR en lugar de ARN. Las reacciones NTC para todos los conjuntos de cebadores y sondas no deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral. Si alguna de las reacciones NTC exhibe una curva de crecimiento que cruza el umbral del ciclo, es posible que se haya producido una contaminación de la muestra. Invalide la ejecución y repita el ensayo con estricto cumplimiento de las pautas.

Control Positivo

Los plásmidos de control positivo contienen la secuencia de las regiones génicas de la nucleocápside 1 (N1) y 2 (N2) del SARS CoV2. El control positivo dará un resultado positivo con los siguientes conjuntos de cebadores y sondas: solo N1 y N2.

Control de extracción humana (HEC) (RNaseP)

La RNasa P funciona como un HEC (consulte la sección anterior sobre Configuración del ensayo) y se utiliza como un control de procedimiento de extracción de ARN para demostrar la recuperación exitosa del ARN, así como la integridad del reactivo de extracción. El ácido nucleico purificado con éxito debería producir un resultado positivo con el conjunto de sonda y cebador RNaseP.

INTERPRETACIÓN E INFORMES DE RESULTADOS

Rendimiento diagnóstico esperado de los controles incluidos en el panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real según el CDC para SARS-CoV-2.

Tipo de control	Nombre del control externo	Usado para monitorizar	Región 1 SARS-CoV-2	Región 2 SARS-CoV-2	RNasa P	Valores de Ct esperados
Positivo	SARS CoV2 Positive Control	Fallo sustancial del reactivo, incluida la integridad del cebador y la sonda	[+]	[+]	[-]	< 35.00 Ct
Negativo	NTC	Reactivo y/o contaminación ambiental	[-]	[-]	[-]	Ninguna detección
Extracción	RNasa P	Fallo en el procedimiento de lisis y extracción, contaminación potencial durante la extracción.	[-]	[-]	[+]	< 35.00 Ct

NOTA IMPORTANTE

Si alguno de los controles anteriores no exhibe el rendimiento esperado como se describe, el ensayo puede haberse configurado y/o ejecutado incorrectamente, o podría haber ocurrido un mal funcionamiento del reactivo o del equipo. Invalidar la ejecución y volver a probar.

Continúa en la siguiente página

INTERPRETACIÓN E INFORMES DE RESULTADOS

Control de extracción RNasaP

1. Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia en la reacción de RNasa P que cruzan la línea de umbral en 35,00 ciclos ($<35,00$ Ct), lo que indica la presencia del gen de RNasa P humana. La falta de detección de RNasa P en cualquier muestra clínica puede indicar:

- Extracción inadecuada de ácido nucleico de materiales clínicos que resulta en pérdida de ARN y / o degradación del ARN.
- Ausencia de suficiente material celular humano debido a una mala recolección o pérdida de la integridad de la muestra.
- Configuración y ejecución inadecuadas del ensayo.
- Mal funcionamiento del reactivo o del equipo.

2. Si el ensayo de RP no produce un resultado positivo para muestras clínicas humanas, interprete de la siguiente manera:

- Si las sondas N1 y N2 son positivas incluso en ausencia de un RP positivo, el resultado debe considerarse válido. Es posible que algunas muestras no presenten curvas de crecimiento de RNasa P debido al bajo número de células en la muestra clínica original. Una señal de RP negativa no excluye la presencia de ARN del virus CoV 2 del SARS en una muestra clínica.
- Si todos los marcadores 2019-nCoV Y RNasa P son negativos para la muestra, el resultado debe considerarse inválido para la muestra. Si hay una muestra residual disponible, repita el procedimiento de extracción y repita la prueba. Si todos los marcadores siguen siendo negativos después de volver a realizar la prueba, notifique que los resultados no son válidos y, si es posible, se debe recolectar una nueva muestra.

INTERPRETACIÓN E INFORMES DE RESULTADOS

Marcadores SARS CoV 2: N1 y N2

1. Cuando todos los controles exhiben el rendimiento esperado, una muestra se considera **NEGATIVA** si todas las curvas de crecimiento del umbral del ciclo de los marcadores de 2019-nCoV (N1, N2) NO cruzan la línea del umbral dentro de los 35,00 ciclos (<35,00 Ct) Y la curva de crecimiento de la RNasa P Sí cruza la línea de umbral en 35,00 ciclos (<35,00 Ct).
2. Cuando todos los controles exhiben el rendimiento esperado, una muestra se considera **POSITIVA** para 2019-nCoV si cualquiera de las curvas de crecimiento del umbral del ciclo del marcador 2019-nCoV (N1, N2) cruzan la línea del umbral dentro de 35,00 ciclos (<35,00 Ct). La RNasa P puede ser positiva o no como se describió anteriormente, pero el resultado de 2019-nCoV sigue siendo válido.
3. Cuando todos los controles exhiben el desempeño esperado y las curvas de crecimiento para los marcadores 2019-nCoV (N1, N2) Y el marcador RNasa P NO cruza la curva de crecimiento del umbral del ciclo dentro de 35.00 ciclos (<35.00 Ct), el resultado es INVALIDO . El ARN extraído de la muestra debe volver a analizarse.
4. Si no se dispone de ARN residual, vuelva a extraer el ARN de la muestra residual y vuelva a realizar la prueba. Si la muestra nuevamente analizada es negativa para todos los marcadores y RNasa P, el resultado no es válido y se debe considerar la recolección de una nueva muestra del paciente.

IMPORTANTE:

Los valores de Ct de las muestras se reducirán por el manejo inadecuado de las muestras de ARN extraídas (repetición de la congelación y descongelación, condiciones de congelación inadecuadas, retraso en la extracción de ARN de la muestra biológica recolectada). Estos errores pueden dar lugar a un aumento de los valores de Ct observados para una muestra determinada y pueden ser relevantes al procesar muestras con baja carga viral.

GUÍA DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La siguiente tabla enumera los resultados esperados para el ensayo de PCR rRT del GeneStore Detection Expert 1S © SARS-CoV-2. Si un laboratorio obtiene resultados inesperados para los controles del ensayo o si se obtienen resultados no concluyentes o no válidos y no se pueden resolver mediante la repetición de la prueba recomendada, comuníquese con su Representante de GeneStore para una consulta y una posible derivación de muestras.

SARS CoV-2 Region 1	SARS CoV-2 Region 2	RNase P	Interpretación del resultado	Reporte	Acciones
[+]	[+]	[+/-]	SARS CoV 2 Detectado	Positivo SARS CoV 2	Informe los resultados a la autoridad sanitaria local y al remitente.
Si solo uno o ambas dianas son positivas		[+/-]	SARS CoV 2 Detectado	Positivo SARS CoV 2	Informe los resultados a la autoridad sanitaria local y al remitente.
-	-	[+]	SARS CoV 2 Not Detectado	No Detectado	Informe los resultados al remitente. Considere la posibilidad de realizar pruebas para detectar otros virus respiratorios. (ii)
-	-	-	Resultado inválido	Inválido	Repita la extracción y rRT-PCR. Si el resultado repetido sigue siendo inválido, considere recolectar una nueva muestra del paciente.

i Los laboratorios deben informar su resultado de diagnóstico según corresponda y de conformidad con su sistema de notificación específico.

ii No se han determinado los tipos óptimos de muestras y el momento para los niveles máximos de virus durante las infecciones causadas por 2019-nCoV. Puede ser necesario recolectar múltiples muestras del mismo paciente para detectar el virus. La posibilidad de un resultado falso negativo debe considerarse especialmente si las exposiciones recientes del paciente o la presentación clínica sugieren que la infección por SARS CoV 2 es posible y las pruebas de diagnóstico para otras causas de enfermedad (por ejemplo, otras enfermedades respiratorias) son negativas. Si aun se sospecha infección por SARS CoV 2, se debe considerar la posibilidad de volver a realizar la prueba en consulta con las autoridades de salud pública.

CONTROL DE CALIDAD

- Los requisitos de control de calidad deben realizarse de conformidad con las regulaciones locales, estatales y federales o los requisitos de acreditación y los procedimientos de control de calidad estándar del laboratorio del usuario. Para obtener más orientación sobre las prácticas de control de calidad adecuadas, consulte el organismo de acreditación de laboratorio de su gobierno.
- Los procedimientos de control de calidad están destinados a monitorear el desempeño de los reactivos y ensayos.
- Pruebe todos los controles positivos antes de ejecutar muestras de diagnóstico con cada nuevo lote de kit para asegurarse de que todos los reactivos y componentes del kit funcionen correctamente.
- Las buenas prácticas de laboratorio (cGLP) recomiendan incluir un control de extracción positivo en cada lote de aislamiento de ácido nucleico.
- Incluya siempre un control negativo (NTC) y el control positivo apropiado (nCoVPC) en cada análisis de amplificación y detección. Todas las muestras clínicas deben analizarse para detectar el gen de la ARNasa P humana para controlar la calidad y la extracción de la muestra.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección [LoD]

El estudio LoD estableció la concentración viral de SARS-CoV-2 más baja (Equivalentes de copia genómica o GCE) que puede ser detectada por el kit GeneStore Detection Expert 1S © SARS CoV-2 en un tipo de muestra particular al menos el 95% del tiempo.

Las muestras de hisopado nasofaríngeo (NP) y lavado broncoalveolar (BAL) almacenadas, obtenidas de pacientes en los años 2019, se combinaron, respectivamente, y se enriquecieron con ARN genómico viral del SARS-CoV-2 purificado en varias concentraciones y se procesaron a través del GeneStore Detection Expert 1S © Flujo de trabajo del kit SARS CoV-2.

Se utilizó un enfoque de tres fases para determinar el LoD para cada tipo de muestra. En las fases I y II, se estableció el LoD preliminar y se confirmó en la fase III probando 20 réplicas.

Continúa en la siguiente página.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Determinación de LoD de muestras de lavado Bronchoalveolar(BAL):

Concentración eficaz	Réplicas	Ct medio		Interpretación	% Positivos
		Region 1	Region 2		
100 GCE	1	34.03	33.02	Positivo	100%
	2	33.90	33.25	Positivo	
	3	34.10	33.10	Positivo	
	4	34.04	33.10	Positivo	
	5	34..10	33.20	Positivo	
	6	34.10	33.03	Positivo	
	7	34.15	33.02	Positivo	
	8	34.12	33.05	Positivo	
	9	31.10	33.06	Positivo	
	10	34.09	33.07	Positivo	
	11	34.20	33.06	Positivo	
	12	34.05	33.06	Positivo	
	13	34.02	33.15	Positivo	
	14	34.06	33.10	Positivo	
	15	34.25	33.12	Positivo	
	16	34.11	33.12	Positivo	
	17	34.11	33.18	Positivo	
	18	34.25	33.20	Positivo	
	19	34.06	33.22	Positivo	
	20	34.03	33.10	Positivo	

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Determinación de LoD de muestras de hisopo nasofaríngeo (NP)

Concentración eficaz	Réplicas	Ct medio		Interpretación	% Positivos
		Region 1	Region 2		
100 GCE	1	34.02	33.10	Positivo	100%
	2	34.02	33.15	Positivo	
	3	34.05	33.11	Positivo	
	4	34.08	33.12	Positivo	
	5	34.12	33.05	Positivo	
	6	34.05	33.00	Positivo	
	7	34.06	33.05	Positivo	
	8	34.15	33.23	Positivo	
	9	34.19	33.12	Positivo	
	10	34.22	33.21	Positivo	
	11	34.14	33.15	Positivo	
	12	34.05	33.18	Positivo	
	13	34.02	33.32	Positivo	
	14	34.02	33.12	Positivo	
	15	34.11	33.25	Positivo	
	16	34.10	33.24	Positivo	
	17	34.11	33.52	Positivo	
	18	34.17	33.21	Positivo	
	19	34.05	33.23	Positivo	
	20	34.02	33.21	Positivo	

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Resultados del LoD

Tipo de muestra	Límite de Detección [GCE/Reacción]
Torunda nasofaríngea (NP)	100 GCE/Reacción
Lavado broncoalveolar (BAL)	100 GCE/Reacción

Evaluación de la sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de la prueba se evaluará más a fondo mediante la evaluación de un material de referencia recomendado por la FDA de los EE. UU. Utilizando un protocolo desarrollado por la FDA, si corresponde y / o cuando esté disponible.

Análisis in silico de secuencias de cebadores y sondas

Se realizó una alineación con el cebador oligonucleotídico y las secuencias de sonda del Panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real nCoV de CDC 2019 con todas las secuencias de ácido nucleico disponibles públicamente para 2019- nCoV en GenBank a partir del 1 de febrero de 2020 para demostrar la inclusividad predicha del Panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real CDC 2019 nCoV. Todas las alineaciones muestran una identidad del 100% del panel de CDC con las secuencias disponibles de 2019-nCoV con la excepción de un desajuste de nucleótidos con el cebador directo N1 en una secuencia depositada. El riesgo de un solo desajuste que resulta en una pérdida significativa de reactividad y un resultado falso negativo, es bajo debido al diseño de los cebadores y las sondas con temperaturas de fusión > 60 ° C y las condiciones de ejecución del ensayo con temperatura de recocido a 58 ° C para tolerar uno o dos desajustes.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Pruebas de especificidad / exclusividad: análisis in silico

Las consultas de análisis BLASTn de los cebadores y sondas de ensayos de rRT-PCR 2019-nCoV se realizaron contra secuencias de nucleótidos de dominio público. Los parámetros de búsqueda en la base de datos fueron los siguientes: 1) La colección de nucleótidos consta de secuencias GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + RefSeq, pero excluye EST, STS, GSS, WGS, TSA, secuencias de patentes, así como las fases 0, 1 y 2. Secuencias HTGS y secuencias de más de 100 Mb; 2) La base de datos no es redundante. Secuencias idénticas se han fusionado en una entrada, mientras se preserva la información de acceso, IG, título y taxonomía para cada entrada; 3) La base de datos se actualizó el 10/03/2019; 4) Los parámetros de búsqueda se ajustan automáticamente para secuencias de entrada cortas y el umbral esperado es 1000; 5) Las puntuaciones de coincidencia y falta de coincidencia son 1 y -3, respectivamente; 6) La penalización por crear un espacio en una alineación es 5 y 2 respectivamente.

Ensayo 2019-nCoV_N1:

La secuencia de la sonda del ensayo N1 de rRT-PCR de 2019-nCoV mostró una alta homología de secuencia con el coronavirus del SARS y el genoma del coronavirus tipo Bat SARS. Sin embargo, los cebadores directos e inversos no mostraron homología de secuencia con el coronavirus del SARS y el genoma del coronavirus tipo Bat SARS. Combinando cebadores y sondas, no existen homologías significativas con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana que puedan predecir posibles resultados falsos positivos de rRT-PCR.

Ensayo 2019-nCoV_N2:

La secuencia del cebador directo del ensayo N2 de rRT-PCR de 2019-nCoV mostró una alta homología de secuencia con los coronavirus de tipo Bat SARS. El cebador inverso y las secuencias de la sonda no mostraron una homología significativa con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana. Combinando cebadores y sondas, no hay predicción de posibles resultados falsos positivos de rRT-PCR.

En resumen, el ensayo 2019-nCoV rRT-PCR N1 y N2, diseñado para la detección específica de 2019-nCoV, no mostró homologías combinadas significativas con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana que pudieran predecir posibles resultados falsos positivos de rRT-PCR.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Evaluación Clínica

Se realizó un estudio de evaluación clínica para evaluar el rendimiento del kit GeneStore Detection Expert 1S © SARS CoV-2 utilizando muestras de hisopado nasofaríngeo (NP) y lavado broncoalveolar (BAL).

Se analizaron un total de sesenta (60) muestras positivas artificiales:

- 30 muestras de hisopos nasofaríngeos (NP) positivos artificiales
- 30 muestras de lavado broncoalveolar positivo artificial (BAL)

Las muestras se diseñaron añadiendo concentraciones conocidas de ARN genómico viral del SARS-CoV-2 extraído, en relación con el producto LoD, en matrices que el kit GeneStore Detection Expert 1S © SARS CoV-2 determinó que eran negativas antes de añadir el ARN .

Además de las muestras positivas artificiales, se analizaron sesenta (60) muestras negativas:

- 30 muestras de hisopado nasofaríngeo (NP) negativas
- 30 muestras negativas muestras de lavado broncoalveolar (BAL)
- Todas las muestras negativas dieron resultados negativos

Los resultados de las muestras positivas y negativas se muestran en las tablas de la página siguiente.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Estudio de evaluación clínica de torunda nasofaríngea (NP)

Concentración final de ARN en muestra	Cantidad de muestras positivas	Ct Medio	
		Region 1	Region 2
2X LoD	20/20	33.12	32.11
3X LoD	5/5	32.95	31.88
5X LoD	5/5	31.45	31.74

Estudio de evaluación clínica de lavado broncoalveolar (BAL)

Concentración final de ARN en muestra	Cantidad de muestras positivas	Ct Medio	
		Region 1	Region 2
2X LoD	20/20	33.05	32.08
3X LoD	5/5	32.95	31.90
5X LoD	5/5	31.33	30.68

SOPORTE TÉCNICO

Para obtener información de servicio y soporte para este kit, envíenos un correo electrónico a: corporate@genestore.eu

GARANTÍA LIMITADA

GeneStore France SAS y / o sus afiliados garantizan sus productos según lo establecido en los Términos y condiciones generales de venta de GeneStore en www.genestore.org/terms-and-conditions.html. Si tiene alguna pregunta, contáctenos en corporate@genestore.eu.



GeneStore France SAS

800 Avenue du Château de Jouques,
13420 Gémenos, Provence-Alpes-
Côte d'Azur France

GENESTORE®
FRANCE