



HDV RNA RETROTRANSCRIPTION KIT

Equipo para la transcripción inversa de ARN
del virus de la hepatitis D



4BShopLab

Equipo de retrotranscripción de ARN de VHD

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

El equipo de retrotranscripción de ARN con código RNART.HDV.CE ha sido diseñado para la transcripción inversa a ADNc de ARN del virus de la hepatitis D.

B. INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) se dirige a la generación de múltiples copias de un ADNc de una molécula de ARN usando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc resultante puede usarse como plantilla de una PCR en tiempo real usando el equipo DRNA.CE (Dia.Pro).

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ARN viral de VHD, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se retrotranscribe en ADNc usando los reactivos suministrados con el equipo.

D. REACTIVOS

El formato estándar del producto con código RNART.CE contiene reactivos suficientes para realizar 25 pruebas.

Reactivo	Etiquetado y contenido	RNART.HDV.CE 25 reacciones
REACTIVO A CÓDIGO: RNART/A CÓDIGO COLOR: AMARILLO	ENZIMA MMLV	2viales/35 µl
REACTIVO B CÓDIGO: RNART/B CÓDIGO COLOR: ANARANJADO	MEZCLA RETRO	2viales/0,285 ml
REACTIVO C CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: ROJO	AGUA GRADO BIOLOGÍA MOLECULAR	2viales/1,5 ml
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	1

Nota importante: A petición, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25,100 pruebas, como se indica a continuación:

1. Reactivo A	n°1 viales/35 µl	n°4 viales/35 µl
2. Reactivo B	n°1 viales /0,285 ml	n°4 viales /0,285 ml
3. Reactivo C	n°1 viales /1,5 ml	n°3 viales /1,5 ml
4. Manual instrucc.	n°1	n°1
Número de pruebas	25	100
Código	RNART.HDV.CE.25	RNART.HDV.CE.100

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas
2. Equipo de purificación de ARN
3. Microcentrífuga
4. Racks para tubos
5. Puntas filtradas estériles con barrera contra aerosoles
6. Microtubos de 0,2 ml recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR
7. Guantes desechables, sin polvo
8. Termociclador programable
9. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR.
3. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentos protectores adecuados de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo.
6. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre -15 °C y -35 °C en un refrigerador o en una cámara de refrigeración con control de temperatura.
7. No intercambiar reactivos de distintos lotes ni tampoco de distintos equipos del mismo lote.
8. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
10. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
11. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los reactivos en hielo o en un bloque de refrigeración.
14. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores. No introducir nunca un producto de amplificación en la zona designada para la extracción/preparación de productos de amplificación.
15. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados para evitar contaminación cruzada.
16. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los

residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infectivos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.

17. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

18. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de preparación de muestras de los laboratorios de análisis clínicos.

2. No se ha detectado ninguna influencia en la preparación de la muestra con citrato, EDTA.

Atención: La heparina (>10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR. Las muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante no deben usarse. Por lo tanto, las muestras de pacientes heparinizados no deben usarse.

3. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.

4. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras y la lectura electrónica.

5. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados. al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.

6. El suero, si no se usa inmediatamente, debe almacenarse en alícuotas a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la extracción. Las muestras pueden almacenarse congeladas a una temperatura de -20 °C a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.

7. No usar muestras inactivadas con calor porque pueden originar falsa reactividad.

H. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS Y ADVERTENCIAS

Todos los reactivos están **listos para el uso**.

Antes del uso, todos los componentes del equipo deberán centrifugarse brevemente.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los reactivos del equipo.

2. **Dispositivo de extracción:** El equipo RNART.HDV.CE está previsto para utilizarse sólo en combinación con equipos de extracción de calidad. Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por el fabricante.

3. **Termocicladores.** El equipo RNART.HDV.CE está previsto para utilizarse en combinación preferiblemente con termocicladores de PCR en tiempo real o termocicladores PCR solo si se calibra y mantiene correctamente.

Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.

2. Comprobar que los reactivos líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.

3. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.

4. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores.

5. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.

6. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.

7. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

M.1 Extracción de ARN viral.

La fase de extracción del ARN genómico de VHD debe realizarse exclusivamente en combinación con el siguiente equipo:

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Suero/plasma	QIAamp Viral RNA mini kit®	52906	Qiagen™

El aislamiento de ARN debe realizarse solo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

M.2 Retrotranscripción de ARN viral (VHD) a ADNc

- Descongelar la mezcla Retro (REACTIVO B) poco antes del uso y trabajar en hielo.
- Descongelar el REACTIVO C (ALL/C) poco antes del uso y trabajar en hielo.
- Antes del uso, todos los componentes del equipo deben centrifugarse brevemente. Trabajar en hielo.
- Preparar la mezcla Retro como se indica a continuación:

Preparación de la mezcla Retro

Numero di reazioni		1	25
REAGENTE A (RNART.CE)	MMULV	1 µl	25 µl
REAGENTE B (RNART.CE)	Retro mix	9.5 µl	237.5 µl
REAGENTE C (RNART.CE)	MB WATER	8.5 µl	212.5 µl
HDV/REV (*)	Specific Reverse Primer	1 µl	25 µl
Vol. tot.		20 µl	500 µl

(*) **Nota importante:** el reactivo Specific Reverse Primer (HDV/REV) está incluido en el equipo DRNA.CE.

Preparación del ensayo de retrotranscripción

La retrotranscripción de ARN de VHD debe realizarse como se indica a continuación:

Número de reacciones	1
MEZCLA RETRO	20 µl
Muestra (ARN) o ALL/C	10 µl
Vol. tot.	30 µl

- Preparar el número requerido de probetas de reacción para las muestras que se vayan a analizar (se recomienda comprobar las muestras por duplicado).
- Prever una probeta adicional para el control negativo (ALL/C).
- Añadir las **muestras** a las probetas de reacción.
- Cerrar bien las probetas de reacción.
- Centrifugar brevemente las probetas de reacción a 2000 r.p.m.
- Cargar las probetas en el soporte del bloque térmico del termociclador y configurar el perfil térmico indicado en la siguiente tabla:

Fase	Ciclo	Temp.	Duración
1	1	42 °C	60 min
2	1	99 °C	10 min

Ajustar el termociclador con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

Al finalizar la fase de retrotranscripción, las muestras deben conservarse en hielo o bien a -20 °C.

Si no se va a usar el ADNc inmediatamente, se puede mantener durante 24 horas a una temperatura de 2 °C a +8 °C. Para períodos más largos (1 ó 2 semanas), el ADNc se debe mantener a una temperatura de -15 °C a -35 °C.

N. CONTROL DE CALIDAD INTERNO Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Se puede realizar un control de la calidad de la reacción sólo después de la fase de amplificación. Los siguientes resultados son posibles:

Tabla de solución de problemas

	Resultado	Posibles causas	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	FALSO POSITIVO	<i>Error durante el pipeteado de ARN</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que se abra un tubo de ensayo a la vez, evitando que se derrame su contenido • Que se hayan cambiado las puntas en cualquier momento
		<i>Contaminación de los reactivos preparados en la sesión</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que se haya controlado la dispensación de los reactivos • Que se hayan cambiado las puntas en cualquier momento
		<i>Contaminación de la ZONA designada para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que las superficies y herramientas estén limpias, de acuerdo con lo descrito en la sección F
		<i>Exceso de ARN extraído en la reacción</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que la concentración de ARN extraído añadido al tubo de reacción se haya cuantificado correctamente • No exceder la concentración de 40 ng/ul (un total de 1 ug de ARN) en la transcripción inversa
MUESTRA desconocida	FALSO NEGATIVO	<i>Exceso de ADNc o reactivos de transcripción inversa en la amplificación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que no se haya añadido una cantidad excesiva de producto de reacción para transcripción inversa en la reacción de amplificación
		<i>Error durante la dispensación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que la dispensación se haya realizado con cuidado
		<i>Pérdida de actividad de las enzimas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que los tubos se hayan mantenido en hielo
		<i>Error en la configuración del perfil térmico</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que el perfil térmico configurado en el termociclador se haya comprobado antes de iniciar el experimento
		<i>Degradación del ácido nucleico extraído</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Que se haya usado plástico libre de DNAsa y RNAsa • Que se hayan seguido estrictamente todas las buenas prácticas de laboratorio al manipular ARN
		<i>Mala calidad de la extracción de ARN</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Repetir la fase de extracción con una muestra nueva

Si los resultados de la prueba coinciden con los requisitos del **RESULTADO CORRECTO** establecidos anteriormente, proceder con la fase de amplificación siguiendo el diseño del protocolo específico del equipo DRNA.CE (Dia.Pro srl).

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

O. RENDIMIENTO

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS).

P. BIBLIOGRAFÍA

Perez-Novo, C.A. et al. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques* 39, 52,54,,56 (2005)

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

5. Símbolos

LEYENDA			
REF	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
IVD	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
LOT	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

4BShopLab



consip

acquistinretepa

DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND
Because diagnosis matters