

Manual de uso del kit

artus[®] WNV LC RT-PCR



Diagnóstico *in vitro* cuantitativo

Para utilizar con el instrumento *LightCycler*[®]

Diciembre 2014 — Versión 1



4509063, 4509065



1046924ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R3

MAT

1046924ES



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas.
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas.
- Investigación con microARN y ARNi.
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular.

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite www.qiagen.com.

Índice

1. Contenido.....	5
2. Almacenamiento.....	5
3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios	6
4. Precauciones generales	6
5. Información sobre el patógeno.....	6
6. Principio de la PCR en tiempo real.....	7
7. Descripción del producto	7
8. Protocolo.....	9
8.1 Aislamiento del ARN	9
8.2 Control interno.....	10
8.3 Cuantificación	11
8.4 Preparación de la PCR.....	12
8.5 Programación del instrumento <i>LightCycler</i>	17
9. Análisis de los datos.....	20
10. Solución de problemas.....	23
11. Especificaciones	26
11.1 Sensibilidad analítica.....	26
11.2 Especificidad	27
11.3 Precisión.....	29
11.4 Robustez	31
11.5 Reproducibilidad.....	31
11.6 Evaluación diagnóstica.....	31
12. Limitaciones del uso del producto	31
13. Información de seguridad	33

14. Control de calidad	33
15. Referencias citadas.....	33
16. Explicación de los símbolos	34

Kit *artus* WNV LC RT-PCR

Para utilizar con el instrumento *LightCycler*.

1. Contenido

	Etiquetado y contenido	Ref. 4509063 24 reacciones
Azul	<i>WNV LC Master (mezcla maestra WNV LC)</i>	2 x 12 reacciones
Rojo	<i>WNV LC/TM QS 1^a 4 x 10⁴ copias/μl</i>	1 x 200 μl
Rojo	<i>WNV LC/TM QS 2^a 4 x 10³ copias/μl</i>	1 x 200 μl
Rojo	<i>WNV LC/TM QS 3^a 4 x 10² copias/μl</i>	1 x 200 μl
Rojo	<i>WNV LC/TM QS 4^a 4 x 10¹ copias/μl</i>	1 x 200 μl
Verde	<i>WNV LC IC^a</i>	1 x 1.000 μl
Blanco	<i>Agua (de calidad para PCR)</i>	1 x 1.000 μl

- QS = *Estándar de cuantificación*
IC = *Control interno*

2. Almacenamiento

Los componentes del kit *artus* WNV LC RT-PCR deben almacenarse a una temperatura de -15 °C a -30 °C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Deben evitarse los ciclos repetidos de descongelación y congelación (> 2), ya que pueden reducir la sensibilidad. Si se piensa utilizar los reactivos de forma intermitente, deberán congelarse en fracciones alícuotas. La conservación a +4 °C no debe superar un período de cinco horas.

3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco desechables
- Kit de aislamiento de ARN (consulte el apartado **8.1 Aislamiento del ARN**)
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vorticial
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *Color Compensation Set* (juego de compensación de color) (n.º de referencia 2 158 850) para la instalación de un archivo *Crosstalk Color Compensation* (compensación de color por diafonía)
- Tubos capilares *LightCycler* (20 µl)
- Bloque de refrigeración *LightCycler*
- Instrumento *LightCycler*
- Herramienta de cierre *LightCycler*

4. Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Utilice puntas de pipeta estériles con filtro.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles y amplicones) por separado de todos los demás reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en un área separada espacialmente.
- Descongele por completo todos los componentes a temperatura ambiente antes de comenzar un ensayo.
- Una vez descongelados los componentes, mézclelos y centrifúgelos brevemente.
- Trabaje rápidamente en hielo o en el bloque de refrigeración *LightCycler*.

5. Información sobre el patógeno

El virus del Nilo Occidental (VNO) es un miembro de la familia *Flaviviridae* (género *Flavivirus*). Los mosquitos infectados suelen picar e infectar a pájaros salvajes (el huésped principal del virus), pero el VNO también puede infectar a caballos y a otros mamíferos. El 80% de todos los seres humanos infectados no presenta ningún síntoma relacionado con el VNO. Las infecciones por el VNO en personas mayores, niños y pacientes inmunodeprimidos pueden en casos raros causar miocarditis o encefalitis mortal.

6. Principio de la PCR en tiempo real

El diagnóstico de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de los patógenos. Con la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta mediante colorantes fluorescentes. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La monitorización de las intensidades de fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar y cuantificar el producto que se acumula sin tener que volver a abrir los tubos de reacción una vez finalizada la serie de PCR (Mackay, 2004).

7. Descripción del producto

El kit *artus* WNV LC RT-PCR es un sistema listo para usar para la detección del ARN del VNO mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el instrumento *LightCycler*. La *mezcla maestra* WNV LC contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la transcripción inversa y la amplificación específica de una región de 72 pb del genoma del VNO, así como para la detección directa del amplicón específico en el canal F1 del fluorímetro del instrumento *LightCycler*. Además, el kit *artus* WNV LC RT-PCR contiene un segundo sistema de amplificación heterógeno para identificar una posible inhibición de la PCR. Esto se detecta como *control interno* (IC) en el canal F3

del fluorímetro. El límite de detección de la RT-PCR analítica del VNO (consulte el apartado **11.1** Sensibilidad analítica) no se ve disminuido. Se suministran controles positivos externos (*WNV LC/TM QS 1-4*) que permiten determinar la carga patógena. Si desea obtener más información, consulte el apartado **8.3** Cuantificación.

8. Protocolo

8.1 Aislamiento del ARN

Diversos fabricantes ofrecen kits de aislamiento de ARN. Las cantidades de muestra para el procedimiento de aislamiento de ARN dependen del protocolo utilizado. Realice el aislamiento de ARN conforme a las instrucciones del fabricante. Se recomienda el siguiente kit de aislamiento:

Material de muestra	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	Número de referencia	Fabricante	ARN transportador
Suero, plasma, LCR	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	incluido

- La utilización de **ARN transportador** es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para aumentar la estabilidad del ARN transportador proporcionado con el kit QIAamp Viral RNA Mini recomendamos el siguiente procedimiento diferente del manual del usuario del kit de extracción:
 - a. Ponga en suspensión de nuevo el ARN transportador liofilizado antes del primer uso del kit de extracción en 310 µl de tampón AE o tampón AVE (tampón de elución, concentración final de 1 µg/µl, no utilice tampón de lisis). Divida esta solución de ARN transportador en un número de fracciones alícuotas adecuado para sus necesidades y almacénelas a -20 °C. Evite la descongelación repetida (> 2 veces) de una fracción alícuota de ARN transportador.
 - b. Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de *control interno*, cuando proceda; consulte el apartado **8.2** Control interno) en fresco conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de muestras	1	12
Tampón AVL	560 µl	6.720 µl
ARN transportador (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volumen total	565,6 µl	6.787,2 µl
Volumen por extracción	560 µl	560 µl (cada una)

- c. Utilice el tampón de lisis preparado en fresco inmediatamente para la extracción. ¡No se puede almacenar la mezcla!
- Si utiliza protocolos de aislamiento con tampones de lavado que contienen **etanol**, realice un paso de centrifugación adicional (tres minutos, 13.000 rpm) antes de la elución para eliminar los restos de etanol que pueda haber. Esto previene la posible inhibición de la PCR.
 - El kit *artus* WNV LC RT-PCR no debe utilizarse con métodos de aislamiento basados en el **fenol**.

Importante: El *control interno* del kit *artus* WNV LC RT-PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado **8.2** Control interno).

8.2 Control interno

Se suministra un *control interno* (*WNV LC IC*). Esto permite al usuario **controlar el procedimiento de aislamiento del ARN y comprobar una posible inhibición de la PCR** (consulte la Fig. 1). Para esta aplicación, añada el *control interno* durante el aislamiento en una proporción de 0,1 µl por 1 µl de volumen de elución. Por ejemplo, usando el kit QIAamp Viral RNA Mini, el ARN se eluye en 60 µl de tampón AVE. Por lo tanto, deben añadirse inicialmente 6 µl del *control interno*. Si realiza la elución, por ejemplo, en 50 µl, utilice el volumen correspondiente de 5 µl. La cantidad de *control interno* utilizada depende **únicamente** del volumen de elución. Tenga en cuenta que el *control interno* debe añadirse a la mezcla de tampón de lisis y material de muestra. De forma alternativa, el *control interno* puede añadirse directamente al tampón de lisis. Opcionalmente puede añadir el ARN transportador junto con el *control interno* al tampón de lisis (consulte el apartado **8.1** Aislamiento del ARN). Sin embargo, tenga en cuenta que la mezcla de *control interno*/ARN transportador y tampón de lisis debe prepararse en fresco y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o en el frigorífico durante solamente unas horas puede causar el fallo del *control interno* y una reducción de la eficiencia

de la extracción). ¡No añada el *control interno* directamente al material de muestra!

El *control interno* también puede utilizarse **exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR** (consulte la Fig. 2). Para esta aplicación, añada 0,5 µl del *control interno* por reacción directamente a 15 µl de la *mezcla maestra WNV LC*. Utilice para cada reacción de PCR 15 µl de la mezcla maestra preparada tal como se ha descrito anteriormente* y añada 5 µl de la muestra purificada. Si está preparando una serie de PCR para varias muestras, aumente el volumen de la *mezcla maestra WNV LC* y del *control interno* según el número de muestras (consulte el apartado **8.4 Preparación de la PCR**).

8.3 Cuantificación

Los *estándares de cuantificación (WNV LC/TM QS 1-4)* incluidos se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (5 µl). Para generar una curva de estándares en el instrumento *LightCycler*, debe utilizar los cuatro *estándares de cuantificación* y definirlos en la pantalla *Sample Loading Screen* (Pantalla de carga de muestras) como estándares con las concentraciones especificadas (consulte el manual del usuario del instrumento *LightCycler [LightCycler Operator's Manual]*, versión 3.5, capítulo B, 2.4. Sample Data Entry [Introducción de datos de las muestras]). La curva de estándares generada tal como se ha indicado anteriormente también puede utilizarse para series subsiguientes, siempre que se utilice al menos un estándar de **una** concentración dada en la serie actual. Para ello, es necesario importar la curva de estándares previamente generada (consulte el manual del usuario del instrumento *LightCycler [LightCycler Operator's Manual]*, versión 3.5, capítulo B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve [Cuantificación con una curva de estándares externa]). Sin embargo, este método de cuantificación puede dar lugar a desviaciones en los resultados debido a la variabilidad entre diferentes series de PCR.

* El aumento de volumen causado por la adición del *control interno* se ignora al preparar el ensayo de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve afectada.

Atención: Los *estándares de cuantificación* se definen como copias/μl. Se debe aplicar la siguiente ecuación para convertir los valores determinados utilizando la curva de estándares en copias/ml de material de muestra:

$$\text{Resultado (copias/ml)} = \frac{\text{Resultado (copias/}\mu\text{l)} \times \text{Volumen de elución (}\mu\text{l)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Tenga en cuenta que, como norma, debe añadirse a la ecuación anterior el volumen de muestra inicial. Esto debe tenerse en cuenta cuando se ha cambiado el volumen de muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos (p. ej., reduciendo el volumen mediante centrifugación o aumentando el volumen mediante reposición hasta el volumen necesario para el aislamiento).

Importante: Tiene a su disposición una guía para el análisis cuantitativo de los sistemas *artus* en el instrumento *LightCycler* en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** [nota técnica para la cuantificación en el instrumento *LightCycler*]).

8.4 Preparación de la PCR

Asegúrese de que el bloque de refrigeración y los adaptadores para tubos capilares (accesorios del instrumento *LightCycler*) están prerrefrigerados a +4 °C. Ponga el número deseado de tubos capilares *LightCycler* en los adaptadores del bloque de refrigeración. Asegúrese de que se incluya al menos un *estándar de cuantificación* y un control negativo (*agua de calidad para PCR*) para cada serie de PCR. Para generar una curva de estándares, utilice para cada serie de PCR todos los *estándares de cuantificación* (*WNV LC/TM QS 1-4*) suministrados. Antes de cada uso, todos los reactivos deben ser descongelados completamente, mezclados (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o invirtiendo el tubo varias veces) y centrifugados brevemente.

Si desea utilizar el *control interno* para controlar el procedimiento de aislamiento de ARN y comprobar una posible inhibición de la PCR, ya se ha añadido en el proceso de aislamiento (consulte el apartado 8.2 Control interno). En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (puede ver un resumen esquemático en la Fig. 1):

	Número de muestras	1	12
1. Preparación de la mezcla maestra	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Volumen total	15 µl	180 µl
2. Preparación del ensayo de PCR	Mezcla maestra	15 µl	15 µl (cada una)
	Muestra	5 µl	5 µl (cada una)
	Volumen total	20 µl	20 µl (cada una)

Si desea usar el *control interno* exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR, debe añadirlo directamente a la *mezcla maestra WNV LC*. En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (puede ver un resumen esquemático en la Fig. 2):

	Número de muestras	1	12
1. Preparación de la mezcla maestra	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Volumen total	15,5 µl*	186 µl
2. Preparación del ensayo de PCR	Mezcla maestra	15 µl	15 µl (cada una)
	Muestra	5 µl	5 µl (cada una)
	Volumen total	20 µl	20 µl (cada una)

Pipetee 15 µl de la mezcla maestra en el depósito de plástico de cada tubo capilar. A continuación, añada 5 µl del ARN eluido de la muestra. En correspondencia, deben usarse 5 µl de al menos uno de los *estándares de cuantificación (WNV LC/TM QS 1-4)* como control positivo y 5 µl de agua (*agua de calidad para PCR*) como control negativo. Cierre los tubos capilares. Para transferir la mezcla del depósito de plástico al tubo capilar, centrifugue los adaptadores que contienen los tubos capilares en una centrifugadora de mesa durante diez segundos a un máximo de 400 x g (2.000 rpm).

* El aumento de volumen causado por la adición del *control interno* se ignora al preparar el ensayo de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve afectada.

Adición del *control interno* al procedimiento de purificación

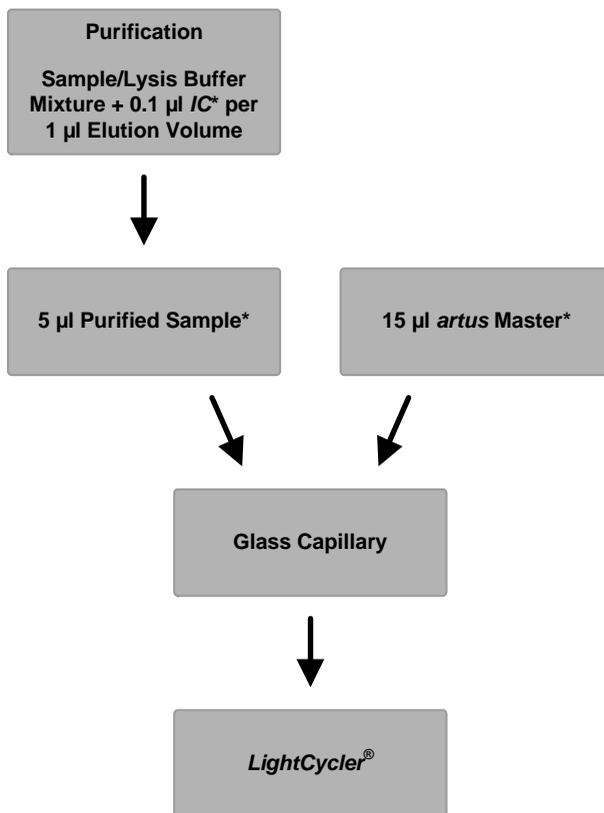


Fig. 1: Esquema del flujo de trabajo para el control del procedimiento de purificación y de la inhibición de la PCR.

*Asegúrese de que las soluciones estén completamente descongeladas y bien mezcladas y de que hayan sido centrifugadas brevemente.

Adición del control interno a la mezcla maestra *artus*

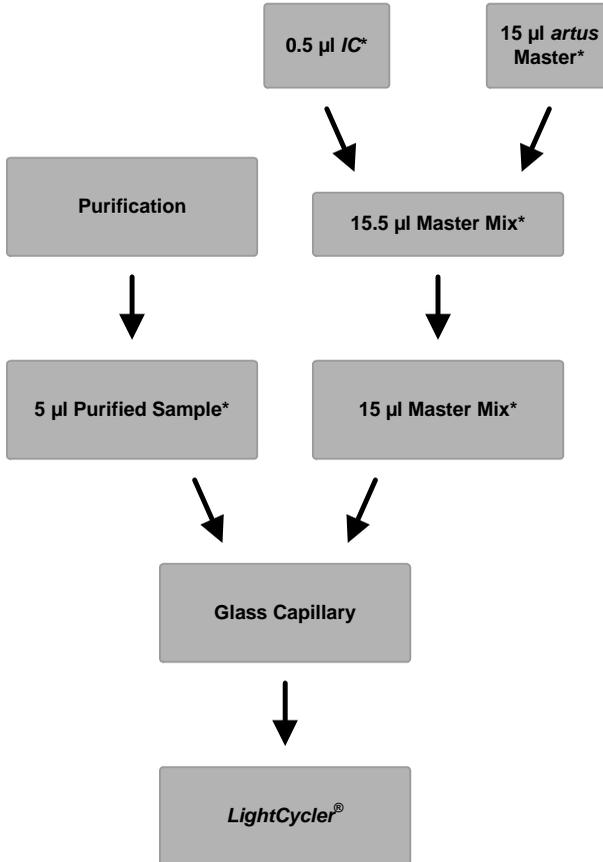


Fig. 2: Esquema del flujo de trabajo para el control de la inhibición de la PCR.

*Asegúrese de que las soluciones estén completamente descongeladas y bien mezcladas y de que hayan sido centrifugadas brevemente.

8.5 Programación del instrumento *LightCycler*

Para la detección del ARN del VNO, cree un perfil de temperatura en el instrumento *LightCycler* siguiendo los cuatro pasos indicados a continuación (consulte la Fig. 3-6).

- A. Transcripción inversa del ARN Fig. 3
- B. Activación inicial de la enzima *hot-start* (arranque en caliente) Fig. 4
- C. Amplificación del ADNc Fig. 5
- D. Refrigeración Fig. 6

Preste especial atención a los valores de configuración de los parámetros *Analysis Mode* (Modo de análisis), *Cycle Program Data* (Datos del programa de ciclo) y *Temperature Targets* (Objetivos de temperatura). En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negrita. Puede encontrar más información sobre la programación del instrumento *LightCycler* en el manual del usuario del instrumento *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*).

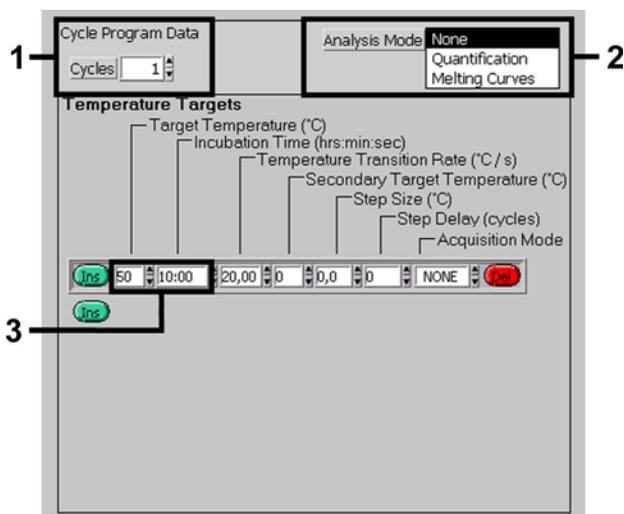


Fig. 3: Transcripción inversa del ARN.

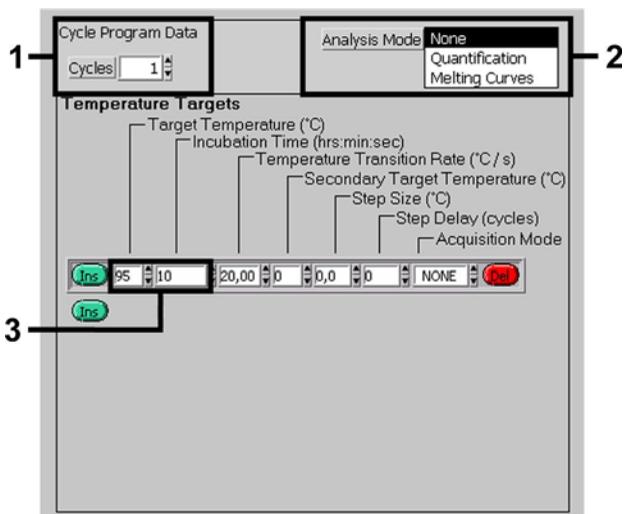


Fig. 4: Activación inicial de la enzima *hot-start*.

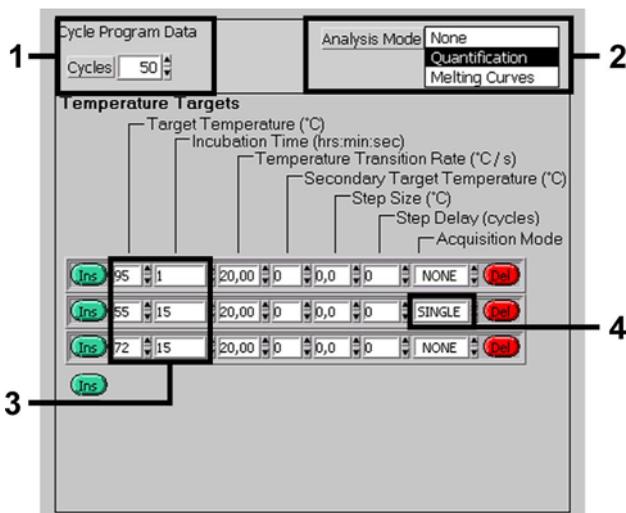


Fig. 5: Amplificación del ADNc.

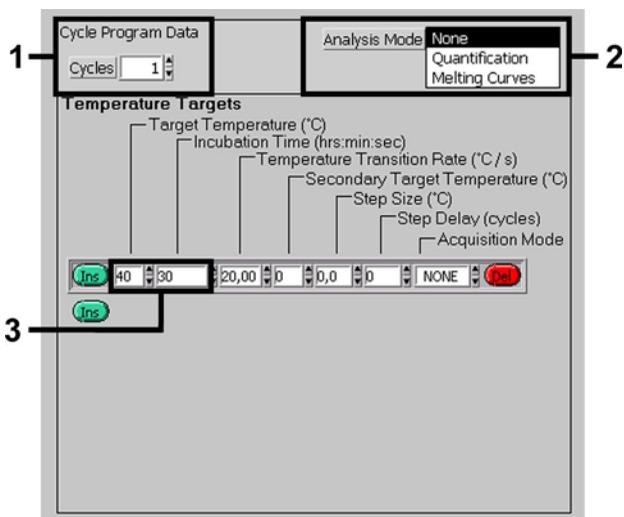


Fig. 6: Refrigeración.

9. Análisis de los datos

En los análisis multicolor se producen interferencias entre los canales del fluorímetro. El software del instrumento *LightCycler* contiene un archivo denominado *Color Compensation File* (Archivo de compensación de color), que compensa estas interferencias. Abra este archivo antes, durante o después de la serie de PCR activando los botones *Choose CCC File* (Elegir archivo CCC) o *Select CC Data* (Seleccionar datos de CC). Si no está instalado el archivo *Color Compensation File*, génerele siguiendo las instrucciones descritas en el manual del usuario del instrumento *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*). Una vez activado el archivo *Color Compensation File*, aparecen señales separadas en los canales del fluorímetro F1, F2 y F3. Para el análisis de los resultados de la PCR obtenidos con el kit *artus WNV LC RT-PCR*, seleccione las opciones de visualización de fluorescencia F1 para la PCR analítica del VNO y F3/Back-F1* para la PCR del *control interno*, respectivamente. Para el análisis de series cuantitativas, siga las instrucciones indicadas en el apartado **8.3 Cuantificación** y en el documento **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** (nota técnica para la cuantificación en el instrumento *LightCycler*) en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal del fluorímetro F1.

El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ARN del VNO.

En este caso, la detección de una señal en el canal F3/Back-F1 no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ARN del VNO (señal positiva en el canal F1) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de la señal de fluorescencia del *control interno* en el canal F3/Back-F1 (competición).

* Si se utilizan versiones anteriores del software (versiones 3.3 y anteriores), la opción de visualización F3/Back--F1 no está disponible. En este caso, seleccione F3/F1.

2. No se detecta ninguna señal en el canal del fluorímetro F1. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del *control interno* en el canal F3/Back-F1.

En la muestra no hay ARN del VNO detectable. Puede considerarse negativa.

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

3. No se detecta ninguna señal en los canales F1 o F3/Back-F1.

No es posible realizar el diagnóstico.

Puede encontrar información acerca de las fuentes de error y su solución en el apartado **10. Solución de problemas**.

En la Fig. 7 y en la Fig. 8 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

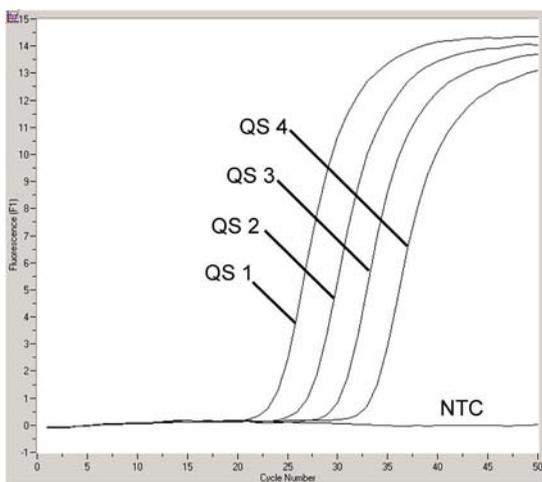


Fig. 7: Detección de los estándares de cuantificación (WNV LC/TM QS 1-4) en el canal del fluorímetro F1. NTC: control sin molde (control negativo).

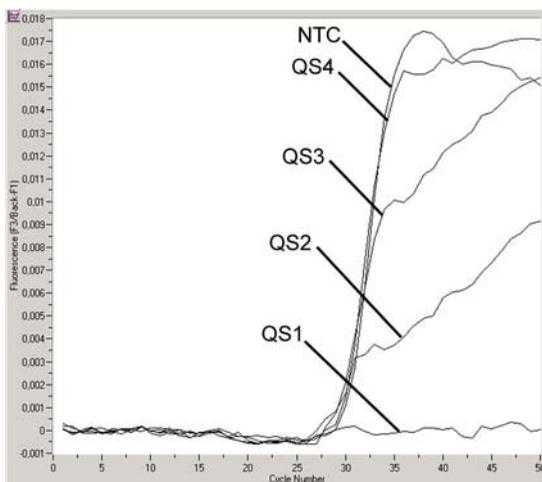


Fig. 8: Detección del control interno (IC) en el canal del fluorímetro F3/Back-F1 con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (WNV LC/TM QS 1-4). NTC: control sin molde (control negativo).

10. Solución de problemas

Ausencia de señal con los controles positivos (*WNV LC/TM QS 1-4*) en el canal del fluorímetro F1:

- El canal del fluorímetro seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo.
 - Para el análisis de los datos, seleccione el canal del fluorímetro F1 para la RT-PCR analítica del VNO y el canal del fluorímetro F3/Back-F1 para la PCR del *control interno*.
- Programación incorrecta del perfil de temperatura del instrumento *LightCycler*.
 - Compare el perfil de temperatura con el protocolo (consulte el apartado **8.5 Programación del instrumento *LightCycler***).
- Configuración incorrecta de la reacción de PCR.
 - Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo (consulte el apartado **8.4 Preparación de la PCR**) y repita la PCR en caso necesario.
- Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado **2. Almacenamiento** o el kit *artus WNV LC RT-PCR* ha caducado.
 - Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señal débil o ausente del *control interno* en el canal del fluorímetro F3/Back--F1 y ausencia simultánea de una señal en el canal F1:

- Las condiciones de la PCR no cumplen el protocolo.
 - Compruebe las condiciones de la PCR (véase anteriormente) y repita la PCR con los valores de configuración corregidos en caso necesario.
- Se produjo la inhibición de la PCR.
 - Asegúrese de que está utilizando un método de aislamiento recomendado (consulte el apartado **8.1 Aislamiento del ARN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.

- Asegúrese de que durante el aislamiento del ARN se ha realizado el paso adicional de centrifugación recomendado antes de la elución para eliminar los restos de etanol (consulte el apartado **8.1 Aislamiento del ARN**).
- Se perdió ARN durante la extracción.
 - Si se ha añadido el *control interno* a la extracción, la ausencia de una señal del *control interno* puede indicar la pérdida de ARN durante la extracción. Asegúrese de que está utilizando un método de aislamiento recomendado (consulte el apartado **8.1 Aislamiento del ARN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado **2. Almacenamiento** o el kit *artus WNV LC RT-PCR* ha caducado.
 - Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señales con los controles negativos en el canal del fluorímetro F1 de la PCR analítica.

- Se produjo contaminación durante la preparación de la PCR.
 - Repita la PCR con nuevos reactivos en duplicados.
 - Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar.
 - Pipetee estrictamente los controles positivos en último lugar.
 - Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.
- Se produjo contaminación durante la extracción.
 - Repita la extracción y la PCR de la muestra que se desea analizar utilizando nuevos reactivos.
 - Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.

Si tiene cualquier otra duda o si encuentra problemas, póngase en contacto con nuestro servicio técnico.

11. Especificaciones

11.1 Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus* WNV LC RT-PCR, se realizaron diluciones seriadas de estándares desde 40 hasta un valor nominal de 0,01265 copias de ARN transcrito *in vitro* por microlitro del amplicón del VNO y se analizaron con el kit *artus* WNV LC RT-PCR. El ensayo se realizó en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. En la Fig. 9 se muestra una representación gráfica del análisis probit. El límite de detección del kit *artus* WNV LC RT-PCR es 2,4 copias/ μ l ($p = 0,05$). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 2,4 copias/ μ l.

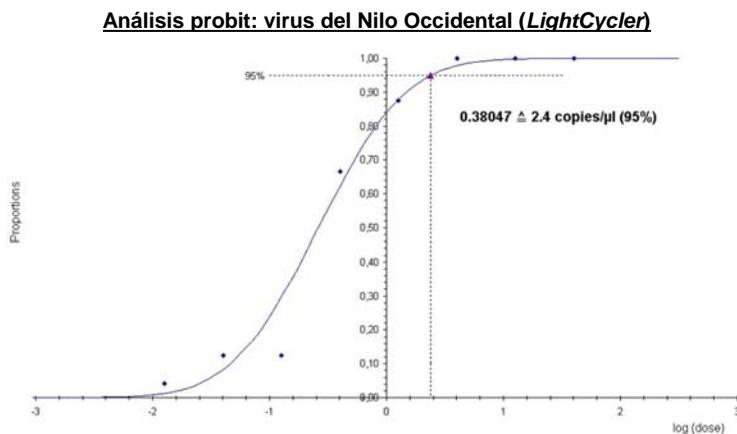


Fig. 9: Sensibilidad analítica del kit *artus* WNV LC RT-PCR.

11.2 Especificidad

La especificidad del kit *artus WNV LC RT-PCR* se asegura ante todo mediante la selección de los *primers* (cebadores) y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la reacción. Los *primers* y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha garantizado la posibilidad de detección de todas las cepas de VNO relevantes mediante una alineación de la base de datos.

Además, se ha estudiado la influencia del ADN genómico en la detección de muestras positivas para el VNO. Se ha demostrado que cantidades grandes de ADN genómico en una serie de PCR pueden inhibir la reacción de PCR. Por consiguiente, el kit *artus WNV LC RT-PCR* únicamente debe utilizarse con materiales de muestra de bajo contenido celular.

Además, la especificidad se validó con 30 muestras de plasma y de LCR negativas para el VNO diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los *primers* y las sondas específicos del VNO incluidos en la *mezcla maestra WNV LC*.

Para determinar la especificidad del kit *artus WNV LC RT-PCR* se analizó la reactividad cruzada del grupo de control indicado en la tabla siguiente (consulte la Tabla 1). Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad.

Tabla 1: Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada.

Grupo de control	VNO (F1)	Control interno (F3/Back-F1)
Virus de la encefalitis de San Luis	–	+
Virus de la encefalitis japonesa	–	+
Virus de la fiebre amarilla	–	+
Virus del dengue de tipo 1	–	+
Virus del dengue de tipo 2	–	+
Virus del dengue de tipo 3	–	+
Virus del dengue de tipo 4	–	+
Virus de la leucoencefalitis de <i>Myotis</i> de Montana	–	+
Virus de los modoc	–	+
Virus del herpes humano 1 (virus del herpes simple 1)	–	+
Virus del herpes humano 2 (virus del herpes simple 2)	–	+
Virus del herpes humano 3 (virus de la varicela-zóster)	–	+
Virus del herpes humano 5 (citomegalovirus)	–	+
Virus de la inmunodeficiencia humana	–	+
Enterovirus 71	–	+
Virus Coxsackie A7	–	+
Virus Coxsackie A24	–	+
Virus Coxsackie B3	–	+
Virus ECHO 30	–	+
Virus de la hepatitis A	–	+
Virus de la hepatitis B	–	+
Virus de la hepatitis C	–	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	–	+
<i>Listeria welshmerii</i>	–	+
<i>Listeria ivanovii</i>	–	+

11.3 Precisión

Los datos de precisión del kit *artus* WNV LC RT-PCR permiten la determinación de la varianza total del ensayo. La varianza total consta de la **variabilidad intraensayo** (variabilidad de múltiples resultados de muestras de la misma concentración en un único experimento), la **variabilidad interensayo** (variabilidad de múltiples resultados del ensayo generados en diferentes instrumentos del mismo tipo por diferentes operadores en un mismo laboratorio) y la **variabilidad interlote** (variabilidad de múltiples resultados del ensayo con diferentes lotes). Los datos obtenidos se utilizaron para determinar la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación para la PCR específica del patógeno y para la PCR del *control interno*.

Se han recogido datos de precisión del kit *artus* WNV LC RT-PCR utilizando el *estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 4; 40 copias/μl). El análisis se realizó por octuplicado. Los datos de precisión se calcularon en función de los valores de Ct de las curvas de amplificación (Ct: ciclo umbral; consulte la Tabla 2). Además, se determinaron los datos de precisión para los resultados cuantitativos en copias/μl utilizando los valores de Ct correspondientes (consulte la Tabla 3). En función de estos resultados, la dispersión estadística total de cualquier muestra dada con la concentración mencionada es del 0,79 % (Ct) o del 10,12 % (conc.), mientras que para la detección del *control interno* es del 4,28 % (Ct). Estos valores se basan en la totalidad de los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 2: Datos de precisión basados en los valores de Ct.

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Variabilidad intraensayo: <i>Control interno</i>	0,14	0,02	0,46
Variabilidad interensayo: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Variabilidad interensayo: <i>Control interno</i>	0,32	0,10	1,09
Variabilidad interlote: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Variabilidad interlote: <i>Control interno</i>	1,28	1,63	4,62
Varianza total: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,26	0,07	0,79
Varianza total: <i>Control interno</i>	1,23	1,51	4,28

Tabla 3: Datos de precisión según los resultados cuantitativos (en copias/μl).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Variabilidad interensayo: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Variabilidad interlote: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,53	6,40	6,31
Varianza total: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	4,07	16,56	10,12

11.4 Robustez

La verificación de la robustez permite determinar la tasa de fracaso total del kit *artus* WNV LC RT-PCR. Se añadieron 7,2 copias/μl de volumen de elución de ARN de longitud completa del virus del Nilo Occidental (tres veces la concentración del límite de sensibilidad analítica) a 30 muestras de plasma y de líquido cefalorraquídeo negativas para el VNO. Tras la extracción con el kit QIAamp Viral RNA Mini (consulte el apartado **8.1** Aislamiento del **ARN**), estas muestras se analizaron con el kit *artus* WNV LC RT-PCR. La tasa de fracaso para todas las muestras de VNO fue del 0%. Además, la robustez del *control interno* se evaluó mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de plasma y de líquido cefalorraquídeo negativas para el VNO. La tasa de fracaso total fue del 0%. No se observaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del kit *artus* WNV LC RT-PCR es $\geq 99\%$.

11.5 Reproducibilidad

No se dispone de ensayos entre laboratorios actualizados para la detección del ARN del virus del Nilo Occidental mediante PCR en tiempo real. Se recabarán datos de reproducibilidad en estudios de validación externa y estudios beta y en comparación con otros productos en estudios diagnósticos (consulte el apartado **11.6** Evaluación diagnóstica).

11.6 Evaluación diagnóstica

Actualmente, el kit *artus* WNV LC RT-PCR está siendo objeto de una serie de estudios de evaluación.

12. Limitaciones del uso del producto

- Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Este producto debe ser utilizado exclusivamente por personal que haya recibido formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

- Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto del manual del usuario.
- Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

- Aunque poco frecuentes, las mutaciones en el interior de las regiones altamente conservadas del genoma viral cubiertas por los *primers* y/o por la sonda del kit pueden producir en estos casos una subcuantificación o un fallo de la detección de la presencia del virus. La validez y el rendimiento del diseño del ensayo se revisan a intervalos regulares.

13. Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la ficha de datos de seguridad de cada kit de QIAGEN® y de cada componente del kit.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.

14. Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad total de QIAGEN, cada lote del kit *artus* WNV LC RT-PCR se analiza en relación con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

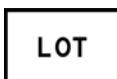
15. Referencias citadas

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Explicación de los símbolos



Fecha de caducidad



Código de lote



Fabricante



Número de referencia



Número de material



Manual de uso



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Componentes



Contiene



Número



Número mundial de artículo comercial (*Global Trade Item Number*)



<N>

Contenido suficiente para <n> ensayos



Limitación de temperatura



Consultar instrucciones de uso

QS

Estándar de cuantificación

IC

Control interno

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Kit *artus* WNV LC RT-PCR

Marcas comerciales y exenciones de responsabilidad
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Group); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo para la realización de servicios de diagnóstico *in vitro* en seres humanos. Por la presente no se otorga ninguna patente general ni otra licencia de ningún tipo, distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO CONCEDE AL COMPRADOR DERECHOS BAJO UNO O MÁS DE LOS NÚMEROS DE PATENTE DE ESTADOS UNIDOS 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 Y 6,245,514 Y SUS EQUIVALENTES EN EL EXTRANJERO PARA USAR ESTE PRODUCTO EXCLUSIVAMENTE PARA SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO EN SERES HUMANOS Y EN ANIMALES. POR LA PRESENTE NO SE OTORGA NINGUNA PATENTE GENERAL NI NINGUNA OTRA LICENCIA DE NINGÚN TIPO DISTINTA DE ESTE DERECHO ESPECÍFICO DE USO DERIVADO DE LA COMPRA.

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *artus* WNV LC RT-PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *artus* WNV LC RT-PCR puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del kit artus WNV LC RT-PCR* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual de uso del kit artus WNV LC RT-PCR* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Kit QIAamp Viral RNA Mini

Para obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

© 2007-2014 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046924ES 148051765



Sample & Assay Technologies