

Octubre 2015

Manual de uso del *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit



Versión 1
Para utilizar con los instrumentos
Rotor.Gene[®] Q

IVD

CE

REF

4515265



altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburgo, ALEMANIA

R1 MAT

1096239-ES

Distribuido por QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

Sample to Insight



Índice

Uso indicado	4
Resumen y explicación	4
Información sobre el patógeno.....	4
Principio del procedimiento	5
Materiales suministrados	6
Contenido del kit.....	6
Materiales necesarios pero no suministrados	6
Advertencias y precauciones.....	7
Advertencias.....	7
Precauciones	8
Conservación y manipulación de los reactivos	9
Componentes del kit	9
Procedimiento	10
Extracción de ADN.....	10
Protocolo: Detección de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2	12
Interpretación de los resultados	23
Validez del test	23
Análisis cualitativo.....	24
Análisis cuantitativo.....	25
Limitaciones	27
Control de calidad.....	28
Características de rendimiento	28

Sensibilidad analítica	28
Especificidad analítica	30
Rango lineal	31
Precisión	32
Repetibilidad	34
Símbolos	36
Guía de resolución de problemas.....	37
Información para pedidos	38

Uso indicado

El *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96) es un sistema de análisis diagnóstico *in vitro*, basado en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real (*real-time*), para la detección y la cuantificación simultáneas de ADN específico del virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y del virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2).

Resumen y explicación

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit es un sistema listo para usar para la detección de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2 mediante PCR en tiempo real en los instrumentos Rotor-Gene Q. El producto incluye un sistema de amplificación heterólogo (control interno) para identificar una posible inhibición de la PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

Información sobre el patógeno

El virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y el virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2) son miembros de la familia *Herpesviridae* y, junto con el virus de la varicela-zóster (VZV), se clasifican como *Alphaherpesvirinae*. El VHS-1 y el VHS-2 tienen un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 150 kpb. El VHS-1 y el VHS-2 comparten más del 80% de la identidad de nucleótidos en su región codificante de proteínas.

Las infecciones por los virus del herpes simple se producen en todo el mundo sin una distribución estacional. El virus se propaga por contacto directo con el virus presente en las secreciones. La prevalencia de la infección por el VHS-1 aumenta gradualmente a partir de la infancia, alcanzando valores o iguales al 80% en años posteriores, mientras que la seroprevalencia del VHS-2 se mantiene baja hasta la adolescencia. La mayoría de las

infecciones primarias por el VHS-1 se contraen como infecciones subclínicas o no identificadas. Las infecciones primarias por el VHS-2 se presentan clásicamente como herpes genital. La infección primaria por el VHS-1 o por el VHS-2 se sigue de un estado de latencia en los ganglios de las raíces posteriores. Periódicamente, el virus se reactiva y viaja por el axón nervioso hasta zonas bucales o genitales, lo cual da lugar a la liberación del virus infeccioso y, en algunos casos, a la formación de lesiones. Aunque suelen ser asintomáticas, las infecciones por los VHS pueden causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, tales como herpes bucal, herpes genital, herpes neonatal, encefalitis y herpes ocular.

Principio del procedimiento

Las HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 RG Master B contienen reactivos y enzimas para la amplificación específica de regiones diana de los genomas del VHS-1 y del VHS-2 y para la detección directa del amplicón específico en los canales de fluorescencia Cycling Green y Cycling Red de los instrumentos Rotor-Gene Q.

Además, el *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit contiene un sistema de amplificación heterólogo para identificar posibles fallos durante el proceso. Este se detecta como control interno (IC, *Internal Control*) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow de los instrumentos Rotor-Gene Q.

Las sondas específicas para el ADN del VHS-1 están marcadas con el fluoróforo FAM™, mientras que las sondas específicas para el ADN del VHS-2 están marcadas con un fluoróforo que muestra las mismas características que Cy[®]5. La sonda específica para el control interno (IC) está marcada con el fluoróforo JOE™. El uso de sondas marcadas con fluoróforos distinguibles a nivel espectral permite la detección y la cuantificación simultáneas de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2, así como la detección del control interno en los canales correspondientes del instrumento Rotor-Gene Q.

Materiales suministrados

Contenido del kit

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Número de catálogo		4515265
Número de reacciones		96
Azul	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Morado	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Verde	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Rojos	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Naranja	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Blanco	H ₂ O	1 x 500 µl
Manual de uso		1

* El *artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit* contiene 4 estándares de cuantificación para el VHS-1 (QS1-QS4) y 4 estándares de cuantificación para el VHS-2 (QS1-QS4).

Materiales necesarios pero no suministrados

Antes de usar el producto, asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Reactivos

- QIAamp DNA Mini Kit (n.º de catálogo de QIAGEN 51304 o 51306; consulte «Extracción de ADN», en la página 10)

Consumibles

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (tubos en tira de 0,1 ml y tapas), para uso con un rotor de 72 pocillos (QIAGEN, n.º de catálogo 981103 o 981106)
- Tubos de microcentrifugadora libres de nucleasas y de baja unión al ADN para la preparación de la master mix
- Puntas de pipeta libres de nucleasas con filtros para aerosoles

Equipo

- Instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex o Rotor-Gene Q 6plex
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3.1 o superior
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (bloque para 72 tubos de 0,1 ml), bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones (QIAGEN, n.º de catálogo 9018901)
- Pipetas ajustables adecuadas para la preparación de las muestras
- Pipetas ajustables adecuadas para la preparación de la master mix para la PCR
- Pipetas ajustables adecuadas para la dispensación del ADN
- Agitador vorticial
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar el producto.

Advertencias

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras.

Precauciones

- El uso de este producto está limitado a personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como infecciosas y/o de riesgo biológico conforme a los procedimientos de seguridad del laboratorio.
- Use guantes protectores desechables sin talco, una bata de laboratorio y protección para los ojos cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNasa/ARNasa) de la muestra y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con filtros para aerosoles.
- Use siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Use áreas de trabajo separadas y apartadas entre sí para la preparación de las muestras, la preparación de las reacciones y las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe tener lugar de manera unidireccional. Use siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de entrar en un área diferente.
- Deposite suministros y equipos en las áreas de trabajo separadas y no los lleve de un área a otra.
- Almacene el material positivo o potencialmente positivo separado de los demás componentes del kit.
- No abra los tubos de reacción/placas después de la amplificación con objeto de evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden analizarse controles adicionales conforme a las directrices o requisitos de las normativas locales o nacionales o de los organismos de acreditación.
- No use componentes del kit que hayan superado la fecha de caducidad.
- Elimine los desechos de las muestras y del producto conforme con la normativa local en materia de seguridad.

Conservación y manipulación de los reactivos

Componentes del kit

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se envía en nieve carbónica. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no están congelados en el momento de su recepción, o si los tubos han sido dañados durante el envío, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN. Una vez recibidos, conserve todos los componentes del kit a una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Evite descongelar y congelar los reactivos Master (más de dos veces), ya que esto podría reducir el rendimiento del producto. Congele los reactivos en alícuotas si se van a usar de forma intermitente. No conserve los reactivos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante más de 2 horas. Proteja de la luz los reactivos HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 RG Master B.

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit incluye:

- Dos reactivos Master (HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 RG Master B).
- Control interno (HSV-1/2 RG IC).
- Cuatro estándares de cuantificación para el VHS-1 (HSV-1 QS1-QS4).
- Cuatro estándares de cuantificación para el VHS-2 (HSV-2 QS1-QS4).
- Agua (H_2O) apta para PCR.

Los reactivos HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 RG Master B contienen todos los componentes (tampón, enzimas, *primers* [cebadores] y sondas) para la amplificación, la detección y la diferenciación de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2 y del control interno en una sola reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones normalizadas de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2. Pueden utilizarse individualmente como controles positivos o juntos para generar una curva estándar que puede usarse para determinar la

concentración de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2 en la muestra. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de los estándares de cuantificación.

Tabla 1. Concentración de los estándares de cuantificación.

Estándar de cuantificación	Concentración (copias/ μ l)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10.000	10.000
QS2	1.000	1.000
QS3	100	100
QS4	10	10

Procedimiento

Extracción de ADN

Se amplifican a partir del ADN secuencias diana específicas del VHS-1 y del VHS-2. Debido a que el rendimiento del producto depende de la calidad del ADN, asegúrese de usar un kit de preparación de muestras que genere ADN apto para su uso en la PCR posterior.

Se recomienda el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 51304 o 51306) para la purificación del ADN para su utilización con el *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit. Realice la purificación del ADN conforme a las instrucciones descritas en el manual de uso de QIAamp DNA Mini Kit (*QIAamp DNA Mini Handbook*).

Debido a que los tampones de lavado incluidos en el QIAamp DNA Mini Kit contienen etanol, realice un paso de centrifugación adicional antes de la elución. Coloque la columna de centrifugación QIAamp Mini en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y deseche el tubo de

recogida antiguo con el filtrado. Centrifugue durante 10 minutos a aproximadamente 17.000 x g (~ 13.000 rpm) en una centrifugadora de mesa.

Importante: La utilización de ARN carrier es esencial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Importante: El etanol es un potente inhibidor en la PCR en tiempo real. Si su kit de preparación de muestras utiliza tampones de lavado que contienen alcohol, asegúrese de eliminar todo resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico.

Control interno

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit contiene un control interno heterólogo que puede usarse como control de inhibición de la PCR o como control del procedimiento de preparación de las muestras (extracción de ácidos nucleicos) y como control de la inhibición de la PCR.

Si el control interno se utiliza como control de inhibición de la PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, añada el control interno directamente a la mezcla de los reactivos HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 RG Master B, tal como se describe en el paso 2b del protocolo (página 13).

Con independencia del método/sistema empleado para la extracción de ácidos nucleicos, el control interno no debe añadirse directamente a la muestra. El control interno debe añadirse siempre a la mezcla muestra/tampón de lisis. El volumen del control interno que debe añadirse a la mezcla muestra/tampón de lisis depende únicamente del volumen de elución y representa el 10% del volumen de elución. Por ejemplo, cuando se utiliza el QIAamp DNA Mini Kit, el ADN se eluye en 60 µl de tampón AE. Por consiguiente, añada 6 µl de control interno a la mezcla muestra/tampón de lisis de cada muestra.

Importante: No añada el control interno ni el ARN carrier directamente a la muestra.

Protocolo: Detección de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado «Precauciones», en la página 8.
- Dedique tiempo suficiente a familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar el protocolo. Lea el manual del usuario del instrumento.
- Asegúrese de que se incluya al menos un control positivo y un control negativo (agua apta para PCR) para cada test de PCR.

Cosas que hacer antes de comenzar

- Asegúrese de que se ha preenfriado el bloque de refrigeración (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) a 2-8 °C.
- Antes de cada uso, todos los reactivos deben ser descongelados completamente, mezclados (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o mediante agitación vorticial rápida) y centrifugados brevemente.

Procedimiento

1. Coloque el número deseado de tubos de PCR en los adaptadores del bloque de refrigeración.
2. Si va a utilizar el control interno para controlar el procedimiento de purificación del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2a. Si va a utilizar el control interno exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2b.

Utilice el control interno según se describe en el paso 2b para todas las muestras, controles y estándares de cuantificación que vaya a analizar.

- 2a. El control interno ya se ha añadido al procedimiento de purificación (consulte el apartado «Control interno», en la página 11). En este caso, prepare una master mix según se indica en la tabla 2.

La mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la PCR, excepto la muestra.

Tabla 2. Preparación de la master mix (control interno utilizado para controlar la purificación del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR).

Componente	1 reacción	12 reacciones
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Volumen total	20 µl	240 µl

2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla de los reactivos HSV-1/2 RG Master A y HSV-1/2 Master B. En este caso, prepare una master mix tal como se indica en la tabla 3.

La mezcla de reacción contiene todos los componentes necesarios para la PCR, excepto la muestra.

Tabla 3. Preparación de la master mix (control interno utilizado exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR).

Componente	1 reacción	12 reacciones
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
HSV-1/2 RG IC	1 µl	12 µl
Volumen total	21 µl	252 µl

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

3. Pipetee 20 µl de la master mix en cada tubo de PCR. A continuación, añada 10 µl del ADN eluido de la muestra y mezcle bien mediante pipeteo repetido ascendente y descendente. Del mismo modo, añada 10 µl de un control positivo o de un estándar de cuantificación o 10 µl de H₂O (agua apta para PCR) como control negativo.

Asegúrese de tener al menos un control positivo y un control negativo para cada test. Para la cuantificación, utilice los 8 estándares de cuantificación (HSV1 QS1-QS4 y HSV2 QS1-QS4).

4. Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del instrumento Rotor-Gene) está colocado en la parte superior del rotor.
5. Para la detección de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se indican a continuación.

Configuración de los parámetros generales del test	Figuras 1, 2, 3, 4
Activación inicial de la enzima <i>hot-start</i>	Figura 5
Amplificación del ADN	Figura 6
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Figura 7
Inicio del test	Figura 8

Todas las especificaciones hacen referencia a la versión 2.3.1 y versiones superiores del software Rotor-Gene Q. Puede encontrar más información acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene en el manual del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negrita.

6. En primer lugar, abra el cuadro de diálogo **New Run Wizard** (Asistente para un nuevo test) con la versión **Advanced** (Avanzada) y seleccione **Two Step** (Dos pasos) (figura 1). Haga clic en **Next** (Siguiente) para continuar.

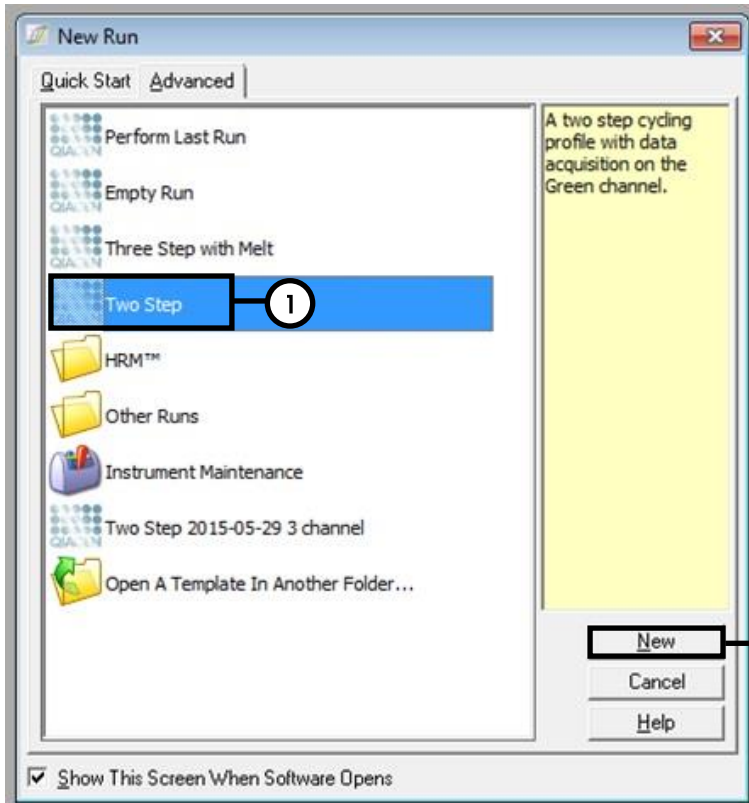


Figura 1. Cuadro de diálogo New Run (Nuevo test).

7. En el siguiente cuadro de diálogo **New Run Wizard** (figura 2), marque la casilla **Locking Ring Attached** (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en **Next**.

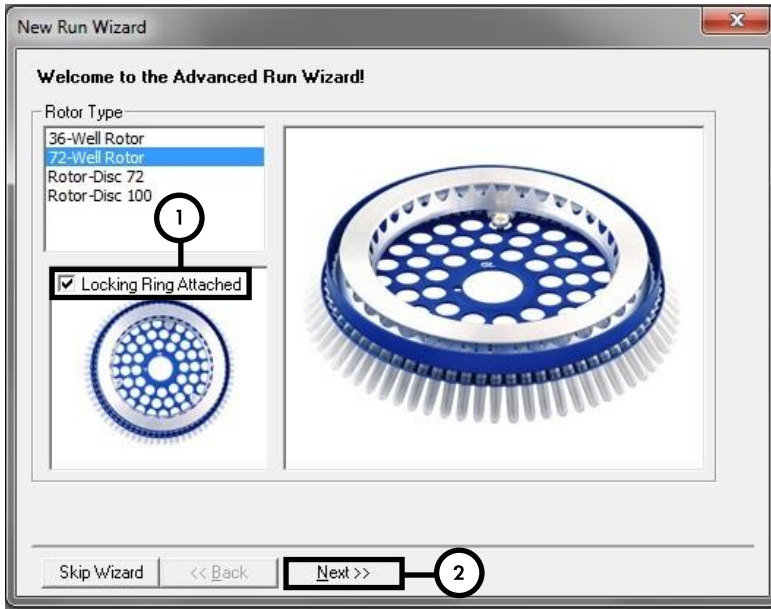


Figura 2. Cuadro de diálogo New Run Wizard.

8. Seleccione **30** para el volumen de reacción de PCR y haga clic en **Next** (figura 3).

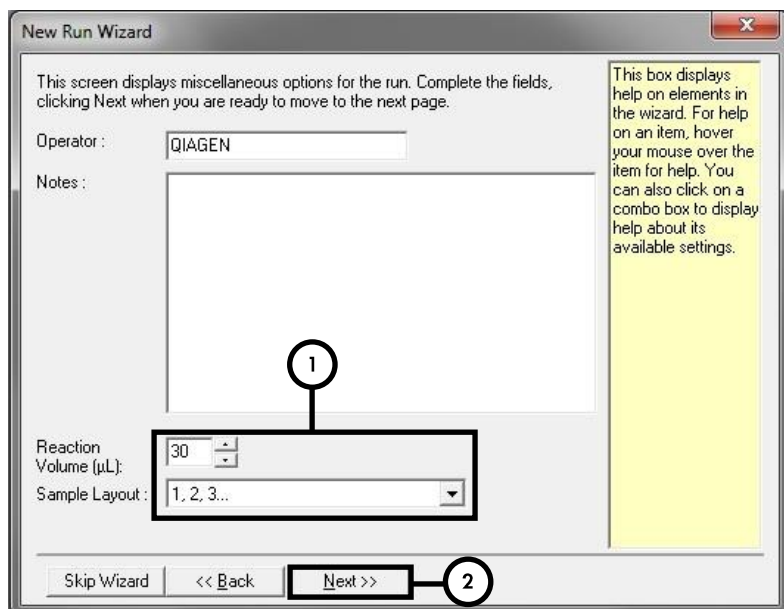


Figura 3. Configuración de los parámetros generales del test.

9. Haga clic en el botón **Edit Profile** (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo **New Run Wizard** (figura 4) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 5-6.

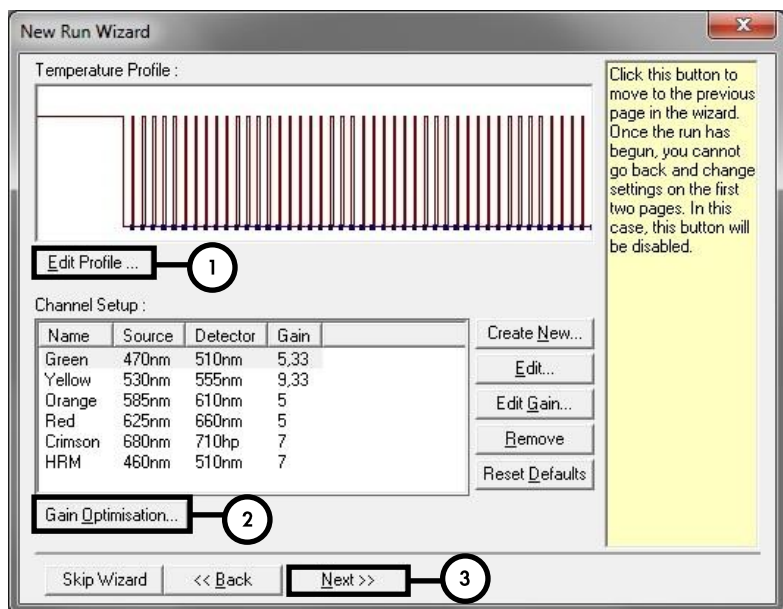


Figura 4. Edición del perfil.

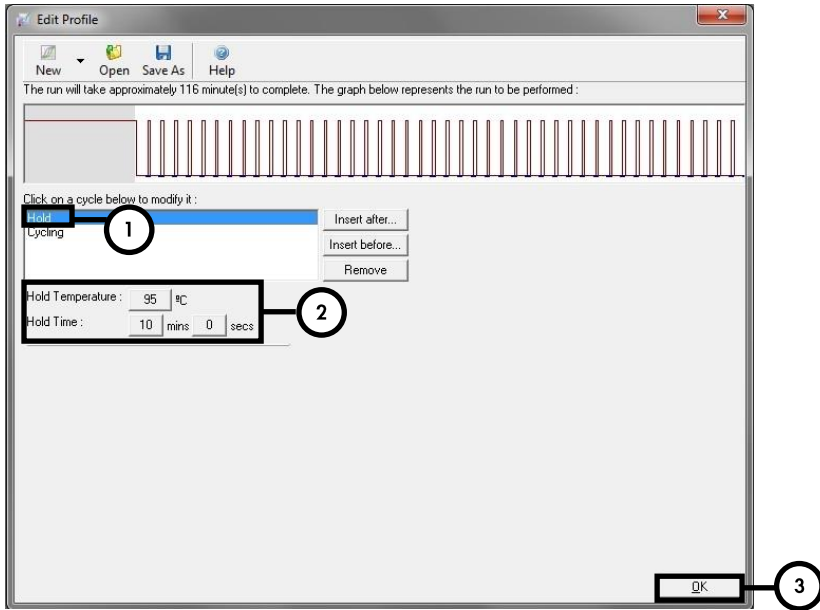


Figura 5. Activación inicial de la enzima *hot-start*.

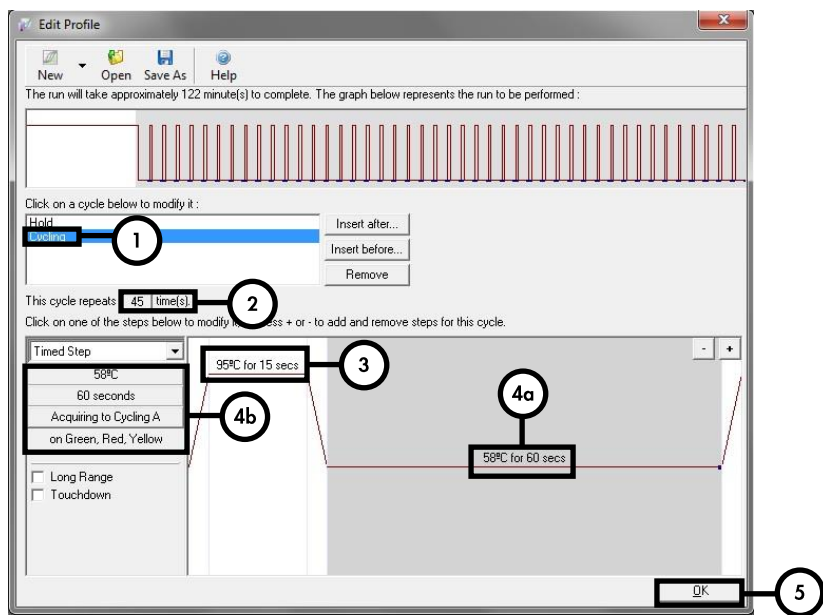


Figura 6. Amplificación del ADN.

10. El rango 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 del aumento de señal) en el cuadro de diálogo **New Run Wizard** (consulte la figura 4, paso 2) para abrir el cuadro de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuración automática de la optimización del aumento de señal) (figura 7). Marque la casilla **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Realizar optimización antes de la primera detección) (figura 7). Asegúrese de que estén seleccionados los tres canales (Green, Red y Yellow) para **Auto-Gain Optimisation** (Optimización automática del aumento de señal) (figura 7). (Busque los canales en el menú desplegable debajo de **Channel Settings** [Configuración de canales] y haga clic en **Add** [Añadir]). Haga clic en **Close** (Cerrar) en el cuadro de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** una vez finalizada la calibración del aumento de señal.

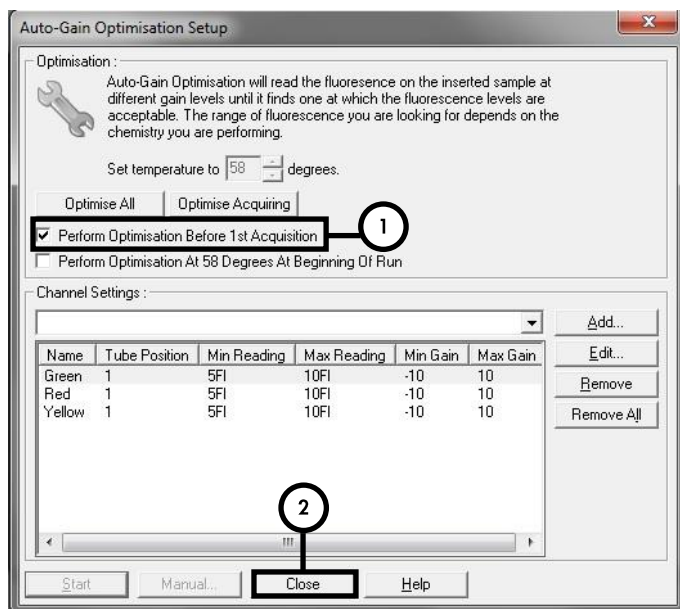


Figura 7. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

11. Los valores de aumento de señal determinados por la calibración de los canales se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación (figura 8). Haga clic en **Start Run** (Iniciar test).

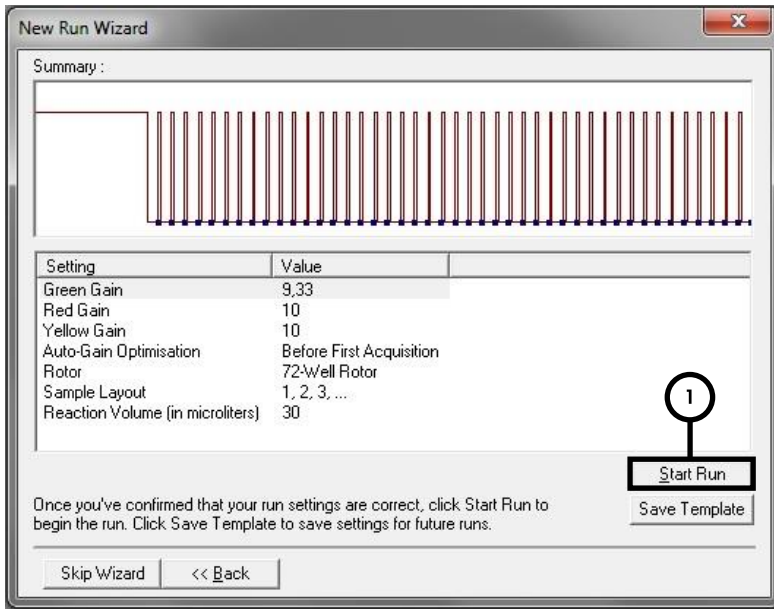


Figura 8. Inicio del test.

12. Una vez finalizado el test, analice los datos (consulte el apartado «Interpretación de los resultados», en la página 23).

Interpretación de los resultados

Validez del test

Test cualitativo válido

Para que un test cualitativo sea considerado válido deben cumplirse las siguientes condiciones (tabla 4).

Tabla 4. Condiciones necesarias para considerar un test cualitativo como válido.

Nombre del control	Canal de detección		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Control positivo para el VHS-1 (QS)	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
Control positivo para el VHS-2 (QS)	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
Control negativo	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

Test cualitativo no válido

Un test cualitativo no puede considerarse válido si no se ha completado o si no cumple alguna de las condiciones especificadas.

En caso de obtener un test cualitativo no válido, repita la PCR o extraiga de nuevo el ADN de las muestras originales en caso de no disponer de más ADN.

Test cuantitativo válido

Un test cuantitativo es considerado como válido si se cumplen todas las condiciones especificadas (consulte la tabla 4, arriba). Además, para obtener resultados cuantitativos exactos debe generarse una curva estándar válida. Para considerar un test cuantitativo

válido, los parámetros de control de la curva estándar deben cumplir los siguientes valores (tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de control para considerar como válida una curva estándar.

Parámetro de control	Valor válido
Pendiente	-3,743/-2,765
Eficiencia de la PCR	85%/130%
R al cuadrado (R ²)	> 0,98

Test cuantitativo no válido

Un test cuantitativo no es considerado como válido si no se ha completado o si no se cumple alguna de las condiciones especificadas.

En caso de obtener un test cuantitativo no válido, repita la PCR o extraiga de nuevo el ADN de las muestras originales en caso de no disponer de más ADN.

Análisis cualitativo

En la tabla 6 se muestra un resumen de la interpretación de los resultados.

Tabla 6. Resumen de la interpretación de los resultados.

Nombre de la muestra	Canal de detección			Interpretación de los resultados
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO*	Se ha detectado ADN específico del VHS-1.
B	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO*	Se ha detectado ADN específico del VHS-2.
C	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	No se ha detectado ADN específico del VHS-1 ni del VHS-2. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico del VHS-1 ni del VHS-2.
D	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	Inhibición de la PCR o fallo de los reactivos. Repita el procedimiento utilizando la muestra original o recoja y analice una nueva muestra.

* La detección del control interno en el canal Cycling Yellow no es necesaria para obtener resultados positivos en los canales de detección Cycling Green o Cycling Red. Una carga alta del VHS-1 o del VHS-2 en la muestra puede dar lugar a una disminución o a la ausencia de señales del control interno.

Análisis cuantitativo

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit contiene 4 estándares de cuantificación (QS) para el VHS-1 y 4 estándares de cuantificación (QS) para el VHS-2. Para generar una curva estándar para el análisis cuantitativo, estos deben definirse como estándares con las

concentraciones adecuadas (consulte la tabla 1, en la página 10). Puede generarse una curva estándar para el análisis cuantitativo utilizando estándares de concentraciones conocidas.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = ciclo umbral (*threshold cycle*)
- m = pendiente
- N_0 = concentración inicial
- b = intersección

Las concentraciones de muestras positivas de concentración desconocida pueden derivarse a partir de la curva estándar (figura 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$

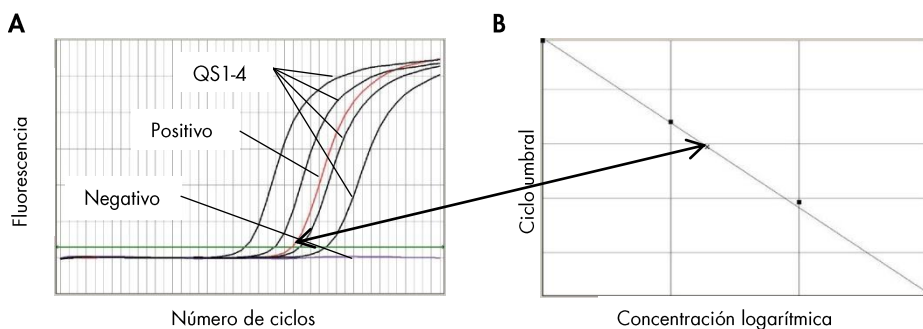


Figura 9. Estándares de cuantificación, una muestra negativa y una muestra positiva mostrados en (A) un gráfico de amplificación y (B) un análisis de una curva estándar.

Nota: La concentración de la muestra se representa en copias/ μ l y hace referencia a la concentración de ADN viral en el eluido.

Utilice la siguiente fórmula para determinar la carga viral de la muestra original.

$$\text{Carga viral (muestra)} \quad = \quad \frac{\text{Volumen (eluido) } [\mu\text{l}] \times \text{carga viral (eluido)} \quad \text{[copias}/\mu\text{l}]}{\text{Volumen de la muestra [ml]}}$$

Limitaciones

- El uso de este producto está limitado a personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Es esencial usar buenas prácticas de laboratorio para obtener un rendimiento adecuado de este producto.
- Extreme las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y la preparación de las reacciones. Vigile estrechamente la posible presencia de impurezas y contaminación en todos los reactivos. Deseche los reactivos de los que se sospeche que puedan estar contaminados.
- Para obtener el rendimiento óptimo de este producto se requieren procedimientos adecuados de recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras.
- No utilice este producto directamente en combinación con la muestra. Realice los procedimientos pertinentes de extracción de ácidos nucleicos antes de usar este producto.
- La presencia de inhibidores de la PCR puede causar resultados negativos falsos o no válidos.
- La presencia de posibles mutaciones en las regiones diana del genoma del VHS-1 o del VHS-2 cubiertas por los *primers* o por las sondas empleados en el kit puede resultar en la incapacidad de detección de los mismos.
- Como en el caso de cualquier test diagnóstico, interprete los resultados obtenidos con el *artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit* teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

Control de calidad

Cada lote del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se analiza frente a especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad homogénea del producto.

Características de rendimiento

Las características específicas de rendimiento del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se determinaron utilizando concentraciones conocidas de ADN específico del VHS-1 (número ATCC®: VR-1493) y de ADN específico del VHS-2 (número ATCC: VR-540).

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se define como la concentración (copias por μl del eluido) de ADN específico del VHS-1 o del VHS-2 que puede detectarse con una tasa de positividad $\geq 95\%$. La sensibilidad analítica se determinó por medio de un análisis de una serie de diluciones de ADN del VHS-1 y de ADN del VHS-2 de concentración conocida (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Resultados de PCR utilizados para calcular la sensibilidad analítica de la amplificación específica del VHS-1.

Concentración (copias/ μl)	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de positivos (%)
3,16	12	12	100
1,0	12	12	100
0,32	12	11	91,6
0,1	12	9	75
0,03	12	6	50
0,01	12	2	16,7

Concentración (copias/μl)	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de positivos (%)
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0
NTC	12	0	0

Tabla 8. Resultados de PCR utilizados para calcular la sensibilidad analítica de la amplificación específica del VHS-2.

Concentración (copias/μl)	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de positivos (%)
3,16	18	18	100
1,0	18	18	100
0,32	18	11	61,1
0,1	18	7	38,9
0,03	18	3	16,7
0,01	18	1	5,6
0,003	18	0	0
0,001	18	0	0
NTC	18	0	0

La sensibilidad analítica del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit, determinada por medio de un análisis probit, para la detección de ADN específico del VHS-1 es de 0,33 copias/μl de eluido (intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,16-1,3 copias/μl), mientras que la sensibilidad analítica para la detección de ADN específico del VHS-2 es de 1,2 copias/μl de eluido (IC del 95%: 0,7-3,5 copias/μl).

Especificidad analítica

La especificidad analítica del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se garantiza mediante una selección meticulosa de los oligonucleótidos (*primers* y sondas). Los oligonucleótidos se comprueban mediante un análisis comparativo de secuencias frente a secuencias disponibles descritas públicamente para garantizar la detección de todos los genotipos relevantes del VHS. Además, la especificidad del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se evaluó mediante el análisis de un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros virus del herpes o de otros patógenos que pueden ser relevantes en pacientes inmunodeprimidos (tabla 9).

Tabla 9. Microorganismos analizados para determinar la reactividad cruzada.

Microorganismo	Canal de detección		
	Cycling Green (VHS-1)	Cycling Red (VHS-2)	Cycling Yellow (IC)
Virus de la varicela-zóster	Negativo	Negativo	Válido
Virus de Epstein-Barr	Negativo	Negativo	Válido
Citomegalovirus	Negativo	Negativo	Válido
Virus del herpes humano 6 (A, B)	Negativo	Negativo	Válido
Virus del herpes humano 7	Negativo	Negativo	Válido
Virus del herpes humano 8	Negativo	Negativo	Válido
Virus BK	Negativo	Negativo	Válido
Virus JC	Negativo	Negativo	Válido
Parvovirus B19	Negativo	Negativo	Válido
Virus de la hepatitis A	Negativo	Negativo	Válido
Virus de la hepatitis B	Negativo	Negativo	Válido
Virus de la hepatitis C	Negativo	Negativo	Válido

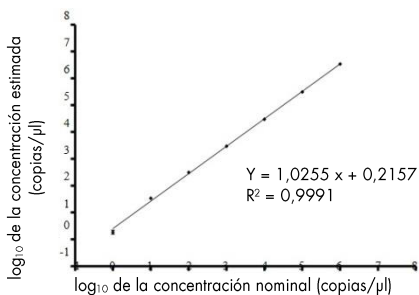
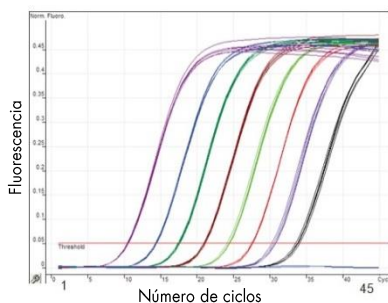
Microorganismo	Canal de detección		
	Cycling Green (VHS-1)	Cycling Red (VHS-2)	Cycling Yellow (IC)
Virus de la inmunodeficiencia humana 1	Negativo	Negativo	Válido

El *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit no presentó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos especificados.

Rango lineal

El rango lineal del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2 utilizando concentraciones de 10^8 copias/ μ l a 10 copias/ μ l (VHS-1) (figura 10) y de 10^7 a 10 copias/ μ l (VHS-2). Se analizaron al menos 6 replicados por dilución.

A



B

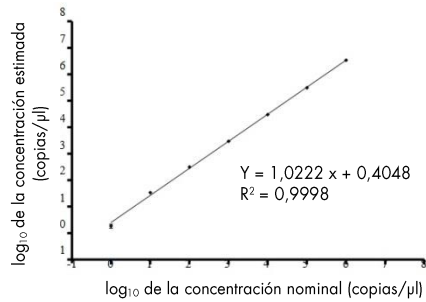
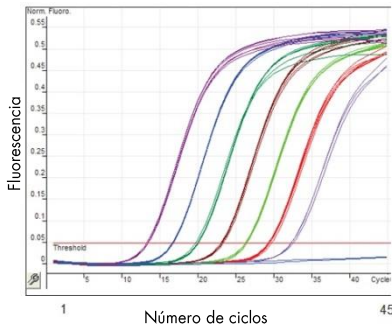


Figura 10. Curvas de amplificación y análisis de regresión lineal de una serie de diluciones de ADN específico (A) del VHS-1 y (B) del VHS-2.

El rango lineal del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se extiende sobre un rango de al menos 7 órdenes de magnitud para el ADN específico del VHS-1 y sobre un rango de al menos 6 órdenes de magnitud para el ADN específico del VHS-2.

Precisión

La precisión del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad en un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre experimentos diferentes) y variabilidad interlote (variabilidad entre lotes de producción diferentes).

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar, varianza y coeficiente de variación. Los datos se basan en resultados cuantitativos de concentraciones definidas de ADN específico del VHS-1 y del VHS-2 y en los valores de ciclo umbral (C_T) en el caso del control interno (tablas 10-13). Se analizaron al menos 6 replicados por muestra para determinar la variabilidad intraensayo, interensayo e interlote. La varianza total se calculó combinando los tres análisis.

Tabla 10. Precisión de la amplificación del ADN específico del VHS-1.

Sistema específico del VHS-1	Concentración media (copias/ μ l)	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Variabilidad interensayo	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Variabilidad interlote	90,3	5,1	25,5	5,6
	8,7	1,2	1,5	14,2
Varianza total	92,7	5,5	30,7	6,0
	8,8	1,1	1,2	12,7

Tabla 11. Precisión de la amplificación del control interno para el VHS-1.

Control interno	Ciclo umbral (C _T) medio	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	23,0	0,05	0,003	0,23
Variabilidad interensayo	22,9	0,12	0,01	0,51
Variabilidad interlote	23,5	0,61	0,37	2,6
Varianza total	23,3	0,61	0,37	2,6

Tabla 12. Precisión de la amplificación del ADN específico del VHS-2.

Sistema específico del VHS-2	Concentración media (copias/ μ l)	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Variabilidad interensayo	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Variabilidad interlote	102,5	9,5	90,8	9,3
	9,0	2,0	4,0	22,2
Varianza total	99,6	9,0	81,7	9,1
	9,5	2,1	4,5	22,3

Tabla 13. Precisión de la amplificación del control interno para el VHS-2.

Control interno	Ciclo umbral (C_T) medio	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	24,0	0,1	0,004	0,43
Variabilidad interensayo	23,8	0,3	0,13	1,27
Variabilidad interlote	24,0	0,14	0,02	0,59
Varianza total	23,9	0,25	0,06	1,03

Repetibilidad

La especificidad, la sensibilidad y la exactitud de la cuantificación del *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit se evaluaron analizando muestras de un programa de evaluación externa de la calidad (Proficiency Panel) establecido para el VHS. Para garantizar la repetibilidad del

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit, la especificidad y la sensibilidad se evalúan periódicamente mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad establecidos para el VHS-1 y para el VHS-2 así como muestras diagnósticas caracterizadas (se muestra un ejemplo en la tabla 15).

Tabla 15. Resultados del análisis de un programa de evaluación externa de la calidad (Proficiency Panel) para el VHS (QCMD).

Proficiency Panel			<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
Identificación de la muestra	Contenido de la muestra	Concentración esperada (copias/ml)	Concentración detectada de VHS-1 (copias/ml)	Concentración detectada de VHS-2 (copias/ml)	Control interno
HSVDNA14-01	HSV-1	5.408	2.460	–	Válido
HSVDNA14-02	Negativo para el VHS	–	–	–	Válido
HSVDNA14-03	HSV-1	1.135	855	–	Válido
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Válido
HSVDNA14-05	HSV-1	12.794	8490	–	Válido
HSVDNA14-06	HSV-2	1.982	–	1.881	Válido
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Válido
HSVDNA14-08	HSV-2	5.023	–	11.370	Válido
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Válido
HSVDNA14-10	VVZ	–	–	–	Válido

Símbolos

En estas instrucciones de uso se utilizan los símbolos mostrados en la tabla siguiente.

Símbolo	Definición del símbolo
 96	Contenido suficiente para 96 tests
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Número de lote
	Limitación de temperatura
	Fabricante

Símbolo

Definición del símbolo



Fecha de caducidad



Número de material



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



Consultar instrucciones de uso

Guía de resolución de problemas

Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y tests de biología molecular (para ver la información de contacto, visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º cat.
<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: Master A, Master B, 4 estándares de cuantificación para el VHS-1, 4 estándares de cuantificación para el VHS-2, control interno, H ₂ O (agua apta para PCR)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Para 250 preparaciones de ADN: 250 columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación	9002022

Producto	Contenido	N.º cat.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package (paquete prioritario) con software, instalación, formación, una garantía de 3 años para piezas y mano de obra y 3 visitas de mantenimiento preventivo	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package (paquete prioritario) con software, instalación, formación, una garantía de 2 años para piezas y mano de obra y 2 visitas de mantenimiento preventivo	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación	9001570

Producto	Contenido	N.º cat.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package con software, instalación, formación, una garantía de 3 años para piezas y mano de obra y 3 visitas de mantenimiento preventivo	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package con software, instalación, formación, una garantía de 2 años para piezas y mano de obra y 2 visitas de mantenimiento preventivo	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación	9001590

Producto	Contenido	N.º cat.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones con una pipeta monocanal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapas para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapas para 10.000 reacciones	981106

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Acuerdo de licencia limitada para el *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido suministrados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. Estos protocolos no han sido rigurosamente comprobados ni optimizados por QIAGEN. QIAGEN no los garantiza ni ofrece garantías de que no infrinjan los derechos de terceros.
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 niega específicamente 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.

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 ninguna otra licencia de ningún tipo distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); FAM™, JOE™ (Life Technologies Corporation); Cy® (GE Healthcare).

HB-2016-001

© 2015 Altona Diagnostics GmbH, todos los derechos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/contact | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com