

artus[®] EBV LC PCR

Kit Manual de uso



24 (Nr. cat. 4501063)



96 (Nr. cat. 4501065)

Diagnóstico cuantitativo in vitro

para utilizar con el sistema LightCycler[®] Junio

Versión 1



4501063, 4501065



1046892ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

MAT

1046892ES



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. Medidas generales de seguridad | 6 |
| 5. Información acerca del agente patógeno | 7 |
| 6. Principio de la PCR a tiempo real | 7 |
| 7. Descripción del producto | 7 |
| 8. Protocolo | 8 |
| 8.1 Purificación del ADN..... | 9 |
| 8.2 Control interno | 12 |
| 8.3 Cuantificación | 13 |
| 8.4 Preparación de la PCR | 15 |
| 8.5 Programación del sistema <i>LightCycler</i> | 19 |
| 9. Análisis..... | 21 |
| 10. Solución de problemas..... | 24 |
| 11. Especificaciones..... | 26 |
| 11.1 Sensibilidad analítica | 26 |
| 10.1 Especificidad..... | 26 |
| 11.2 Precisión..... | 27 |
| 11.4 Reproducibilidad..... | 29 |
| 11.5 Evaluación diagnóstica..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 12. Limitaciones en la utilización del producto | 29 |
| 13. Advertencias y precauciones | 30 |
| 14. Control de calidad..... | 30 |
| 15. Bibliografía | 30 |
| 16. Explicación de los símbolos..... | 31 |

artus EBV LC PCR Kit

Para utilizar con el sistema *LightCycler*.

1. Contenido

| | Rotulado y contenido | Art. No. 4501063 24 reacciones | Art. No. 4501065 96 reacciones |
|---------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Azul | EBV LC Master | 2 x 12 rxns | 8 x 12 rxns |
| Rojo | EBV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 5 x 10 ⁴ cop/μl | 1 x 200 μl | 1 x 200 μl |
| Rojo | EBV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 5 x 10 ³ cop/μl | 1 x 200 μl | 1 x 200 μl |
| Rojo | EBV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 5 x 10 ² cop/μl | 1 x 200 μl | 1 x 200 μl |
| Rojo | EBV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 5 x 10 ¹ cop/μl | 1 x 200 μl | 1 x 200 μl |
| Verde | EBV LC IC ^{xx} | 1 x 1.000 μl | 2 x 1.000 μl |
| Blanco | Water (PCR grade) | 1 x 1.000 μl | 1 x 1.000 μl |

^{xx} QS = Estándar de cuantificación
IC = Control interno

2. Almacenamiento

Los componentes del artus EBV LC PCR Kit deben almacenarse a una temperatura entre -30 °C y -15 °C y pueden ser utilizados hasta la fecha indicada en la etiqueta. Evite congelarlos y descongelarlos repetidamente (más de 2 veces), ya que puede disminuir su sensibilidad. En caso de no usarlos regularmente, es recomendable dividir los reactivos en alícuotas. Si fuera necesario almacenar los componentes a +4°C, el período de tiempo no debe superar las cinco horas.

3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco
- Kit de purificación del ADN (véase 8.1 Purificación del ADN)
- Pipetas (graduables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vortex
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Art. No. 2 158 850) para crear un archivo *Crosstalk Color Compensation*
- Capilares *LightCycler* (20 µl)
- Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*
- Sistema *LightCycler*
- Capping Tool, *LightCycler*

4. Medidas generales de seguridad

El usuario debe tener siempre en cuenta las siguientes indicaciones:

- Se deben utilizar puntas de pipeta estériles con filtro.
- Se deben purificar, almacenar y añadir a la reacción las muestras positivas (muestras, controles, amplificados) por separado del resto de reactivos.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
- A continuación, se deben mezclar los componentes a conciencia y centrifugarlos brevemente.
- Inmediatamente, se debe trabajar en hielo o en el Cooling Block (Bloque de refrigeración), *LightCycler*.

5. Información acerca del agente patógeno

La transmisión del virus de Epstein-Barr (EBV) se produce de forma oral, principalmente por contacto con saliva contaminada. Generalmente la infección por el EBV es asintomática cuando se produce durante la infancia. Los síntomas clínicos de una infección aguda (conocida como mononucleosis infecciosa) se caracterizan por la presencia de fiebre ganglionar (fiebre de Pfeiffer), cansancio, angina e inflamación de los ganglios linfáticos y del bazo. En algunos pacientes estos síntomas pueden volverse de tipo crónico-recidiva. Pueden observarse evoluciones graves de la infección por el EBV especialmente en pacientes inmunodeprimidos y en personas con defectos en linfocitos T.

6. Principio de la PCR a tiempo real

El diagnóstico de un patógeno mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma del patógeno. En la PCR a tiempo real el producto amplificado se detecta con la ayuda de fluorocromos. Éstos están acoplados a sondas de oligonucleótidos que se van ligando específicamente a la secuencia que se amplifica. La detección de las intensidades de fluorescencia en el transcurso de la PCR a tiempo real hace posible la detección y la cuantificación del producto amplificado, sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción tras realizar la PCR (Mackay, 2004).

7. Descripción del producto

El *artus* EBV LC PCR Kit es un sistema listo para utilizar e indicado para la detección del ADN del EBV mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el sistema *LightCycler*. La *EBV LC Master* contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de un fragmento de 97 pb del genoma del EBV, así como para la detección inmediata del fragmento

amplificado en el canal fluorimétrico F2 del sistema *LightCycler*. Además, el *artus EBV LC PCR Kit* contiene un segundo sistema de amplificación

heterólogo para comprobar si se produce una inhibición de la PCR. Esto se detecta como *Control interno (IC)* en el canal fluorimétrico F3. Con lo cual, el límite de detección de la PCR analítica del EBV no se ve afectado (véase **11.1 Sensibilidad analítica**). Se suministran controles positivos externos (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) con cuya ayuda se puede determinar la carga patógena. Para más información al respecto, véase el apartado

8.3 Cuantificación.

Atención: El perfil de la temperatura para la detección del ADN del virus de Epstein Barr con el *artus EBV LC PCR Kit* es igual al del *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, *artus VZV LC PCR Kit*, y *artus CMV LC PCR Kit*. Las reacciones de PCR para este sistema *artus* pueden por lo tanto ser realizadas y analizadas en el mismo ensayo. Observe las indicaciones especiales para el análisis indicadas en **8.3 Cuantificación** y en **9. Análisis**.

8. Protocolo

8.1 Purificación del ADN

Diversos fabricantes ofrecen kits de purificación del ADN. Ajuste la cantidad de muestra indicada para la purificación de acuerdo al protocolo que escoja, y siga las instrucciones del fabricante. Se recomiendan los siguientes kits de purificación:

| Muestra | Kit de purificación | Artículo Número | Fabricante | Carrier de ARN |
|--------------------|---------------------------|-----------------|------------|----------------|
| Suero, plasma, LCR | QIAamp® DNA Mini | 51 304 | QIAGEN | no incluido |
| | QIAamp UltraSens® | 53 704 | QIAGEN | incluido |
| Células sanguíneas | QIAamp DNA Blood Mini Kit | 51 104 | QIAGEN | no incluido |
| Plasma | EZ1® DSP Virus Kit (48)* | 62 724 | QIAGEN | incluido |

*Para utilizar en combinación con BioRobot® EZ1 DSP Workstation (Nr. cat. 9001360) y EZ1 DSP Virus Card (Nr. cat. 9017707).

Nota importante para el uso del QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit y QIAamp DNA Mini Kit:

- La utilización de un **carrier de ARN** mejora la eficiencia de la purificación y por ello el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. En caso de que el kit de purificación utilizado no contenga un **carrier de ARN**, le recomendamos encarecidamente, que durante la purificación de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de muestras humanas pobres en células o con poco contenido de ADN/ARN (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo), añada un carrier de ARN (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, No. Art: 27-4110-01). Por favor lea las instrucciones siguientes:
 - a) Resuspenda el carrier de ARN liofilizado en el tampón de elución (no en el de lisis) del kit de purificación (por ejemplo, el tampón AE del QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit) en una concentración de 1 µg/µl. Prepare el número de alícuotas necesarias

de la solución de carrier de ARN así preparada y almacénelas a -20°C. Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).

- b) Para cada purificación debe añadirse 1 μg del carrier de ARN por 100 μl del tampón de lisis. Si el kit de purificación utiliza 200 μl de tampón de lisis para cada muestra, entonces añada 2 μl del carrier de ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) directamente al tampón de lisis. La mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN (así como el *Control interno*, véase **8.2 Control interno**) debe prepararse inmediatamente antes de empezar cada purificación siguiendo el siguiente esquema.

| Número de muestras | 1 | 12 |
|---|-------------------------------------|--|
| Tampón de lisis | p.ej. 200 μl | p.ej. 2400 μl |
| Carrier de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 2 μl | 24 μl |
| Volumen total | 202 μl | 2424 μl |
| Volumen por purificación | 200 μl | cada 200 μl |

- c) Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.
- La utilización de un **carrier de ARN** mejora la eficiencia de la purificación y por ello el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para incrementar la estabilidad del carrier de ARN suministrado con el QIAamp UltraSens Virus Kit, le recomendamos que siga las instrucciones siguientes:
 - a. Resuspenda el carrier de ARN liofilizado antes de usar por primera vez el kit de purificación, en 310 μl del tampón de elución del kit escogido (concentración final 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no en el tampón de lisis). Prepare el número de alícuotas necesarias de la solución de carrier de ARN así preparada y almacénelas a -20°C. Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).
 - b. Antes de empezar cada purificación, una mezcla de tampón de lisis y carrier de ARN (así como el *Control interno*, véase **8.2 Control**

interno) debe prepararse inmediatamente antes de empezar cada purificación siguiendo el siguiente esquema.

| Número de muestras | 1 | 12 |
|---------------------------------|-----------------|--------------------|
| Tampón de lisis AC | 800 µl | 9600 µl |
| Carrier de RNA (1 µg/µl) | 5,6 µl | 67,2 µl |
| Volumen total | 805,6 µl | 9667,2 µl |
| Volumen por purificación | 800 µl | cada 800 µl |

- c. Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.
- Utilizando el **QIAamp UltraSens Virus Kit** se puede lograr una concentración de la muestra. Si la muestra no fuera suero o plasma, añada como mínimo 50 % (v/v) de plasma humano negativo a la misma.
 - Los **anticoagulantes** contenidos en los tubos con muestras de sangre pueden inhibir la PCR. En todo caso, los kits de purificación recomendados los eliminan eficazmente. Se recomienda no utilizar sangre heparinizada.
 - Si lleva a cabo la purificación con tampones de lavado que contienen **etanol**, asegúrese de que se realiza una centrifugación adicional (tres minutos, 13.000 rpm) previa a la elución para eliminar posibles restos de etanol. De este modo, se evitan posibles inhibiciones de la PCR.
 - El *artus* EBV LC PCR Kit no está indicado para métodos de purificación que utilizan **fenol**.

Nota importante para la utilización del EZ1 DSP Virus Kit:

- La utilización del **carrier de RNA** es importante para la eficiencia en la purificación y en consecuencia para el rendimiento de ADN/ARN. Por favor añada la cantidad de carrier de ARN apropiada para cada purificación siguiendo las instrucciones del *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Importante: El *Control interno* de *artus* EBV LC PCR Kit puede añadirse

directamente durante la purificación (véase **8.2 Control interno**).

8.2 Control interno

Se suministra un *Control interno* (EBV LC IC), con el que podrá analizar **tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR** (véase la Fig. 1). En caso de utilizar el **EZ1 DSP Virus Kit** en la purificación, el *Control interno* debe ser añadido siguiendo las instrucciones del *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Usando el **QIAamp UltraSens Virus Kit**, el **QIAamp DNA Blood Mini Kit**, o el **QIAamp DNA Mini Kit** añada el *Control interno* en una proporción de 0,1 μl por 1 μl de volumen final de elución durante la purificación. Por ejemplo, usando el QIAamp DNA Mini Kit el ADN se eluye en 50 μl del tampón AE. Por lo tanto, se debe añadir 5 μl del *Control interno*. La cantidad del *Control interno* añadida depende **exclusivamente** del volumen de elución. El *Control interno* y el carrier de ARN (véase **8.1 Purificación del ADN**) deben añadirse sólo

- a la mezcla de tampón de lisis y muestra o
- directamente al tampón de lisis.

El *Control interno* no debe añadirse directamente a la muestra. En caso de añadirlo al tampón de lisis, tenga en cuenta que la mezcla del *Control interno* y tampón de lisis/carrier de ARN debe prepararse y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o refrigerada puede llevar después de unas horas, al deterioro del *Control interno* y a una reducción de la eficiencia de la purificación). **No** añada el *Control interno* y el carrier de ARN directamente a la muestra.

El *Control interno* también puede utilizarse **exclusivamente para el análisis de una posible inhibición de la PCR** (véase la Fig. 2). Para ello, añada por reacción 0,5 μl del *Control interno* directamente a 15 μl de la *EBV LC Master*. Utilice para cada reacción de la PCR 15 μl de la *Master Mix** preparada y añada a continuación 5 μl de la muestra purificada. Si tiene que preparar una serie con más muestras, aumente las cantidades necesarias de la *EBV LC*

Master y del *Control interno* de acuerdo al número de muestras (véase **8.4 Preparación de la PCR**).

El *artus EBV LC PCR Kit* contiene el mismo *Control interno (IC)* que el *artus CMV LC PCR Kit*. El *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* contiene el mismo *Control interno* que el *artus VZV LC PCR Kit*.

8.3 Cuantificación

Los *Estándares de cuantificación* suministrados (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) se tratan como muestras ya purificadas y se añaden en el mismo volumen que en el caso de las muestras ($5 \mu\text{l}$). Para elaborar una curva estándar en el sistema *LightCycler*, añada los cuatro *Estándares de cuantificación* suministrados, defínalos en el *Sample Loading Screen* como estándares e introduzca las concentraciones indicadas (véase *LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry*). Podrá utilizar esta curva estándar también para las cuantificaciones posteriores, si incluye como mínimo un estándar de **una** concentración definida durante la serie actual.

* El aumento de volumen condicionado por la adición del *Control interno* es irrelevante en la preparación de la reacción de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve perjudicada.

Para ello, es necesario importar la curva estándar elaborada previamente (véase *LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve*). No obstante, con este modo de cuantificación, debe tenerse siempre en cuenta que se pueden presentar diferencias en los resultados a causa de la variabilidad entre las diferentes series de la PCR.

Si tuviera que integrar más de un sistema Herpes-artus en la serie, no olvide analizarlos por separado de los Estándares de cuantificación correspondientes.

Atención: Los Estándares de cuantificación se definen como copias/ μ l. Para la conversión de los valores determinados mediante la curva estándar en copias/ml de muestra inicial, debe utilizarse la siguiente fórmula:

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

Tenga en cuenta que el volumen inicial de la muestra debe añadirse a la fórmula anterior. Esto debe considerarse cuando el volumen de la muestra ha cambiado antes de realizarse la purificación de los ácidos nucleicos (por ejemplo, cuando se reduce tras la centrifugación o cuando se aumenta para conseguir el volumen requerido para la purificación).

Importante: Para simplificar el análisis cuantitativo de los sistemas *artus* en el sistema *LightCycler* tiene a su disposición una guía en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument).

8.4 Preparación de la PCR

Asegúrese de que el bloque de refrigeración con los adaptadores incluidos (accesorios del sistema *LightCycler*) se enfríe previamente a unos +4°C. Coloque el número necesario de capilares *LightCycler* para las reacciones que vaya a realizar en los adaptadores del bloque de refrigeración. Asegúrese de que, en cada serie de reacciones de PCR, se incluya al menos un *Estándar de cuantificación*, así como un control negativo (*Water, PCR grade*). Para la elaboración de una curva estándar, utilice para cada serie de reacciones de PCR todos los *Estándares de cuantificación* suministrados (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Todos los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo, también deben ser mezclados a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo varias veces o agite brevemente con el vortex). A continuación centrifugue brevemente.

Si desea analizar **tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR** mediante el *Control interno*, éste debe ser añadido durante la purificación (véase **8.2 Control interno**). En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (véase también el cuadro esquemático de la Fig. 1):

| | | Número de muestras | 1 | 12 |
|---------------------------------|----------------------|--------------------|-------|------------|
| 1. Preparación de la Master Mix | <i>EBV LC Master</i> | | 15 µl | 180 µl |
| | <i>EBV LC IC</i> | | 0 µl | 0 µl |
| | Volumen total | | 15 µl | 180 µl |
| 2. Preparación de la PCR | Master Mix | | 15 µl | cada 15 µl |
| | Muestra | | 5 µl | cada 5 µl |
| | Volumen total | | 20 µl | cada 20 µl |

Si desea emplear el *Control interno* **exclusivamente para analizar una inhibición de la PCR**, debe añadirlo directamente a la *EBV LC Master*. En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (véase también el cuadro esquemático de la Fig. 2):

| | | Número de muestras | |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | | 1 | 12 |
| 1. Preparación de la Master Mix | EBV LC Master | 15 μ l | 180 μ l |
| | EBV LC IC | 0,5 μ l | 6 μ l |
| | Volumen total | 15,5 μl* | 186 μl* |
| 2. Preparación de la PCR | Master Mix | 15 μ l* | cada 15 μ l* |
| | Muestra | 5 μ l | cada 5 μ l |
| | Volumen total | 20 μl | cada 20 μl |

Introduzca 15 μ l de la Master Mix en el depósito de plástico de cada capilar. A continuación, añada 5 μ l de la purificación del ADN. Se debe utilizar como control positivo 5 μ l de al menos uno de los *Estándares de cuantificación* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) y como control negativo 5 μ l de agua (*Water, PCR grade*). Cierre los capilares. Para transferir la preparación del depósito de plástico a los capilares, centrifugue el adaptador con los capilares en una centrífuga de mesa durante diez segundos a un máximo de 400 x g (2.000 rpm).

* El aumento de volumen condicionado por la adición del *Control interno* es irrelevante en la preparación de la reacción de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve perjudicada.

Adición del Control interno a la purificación

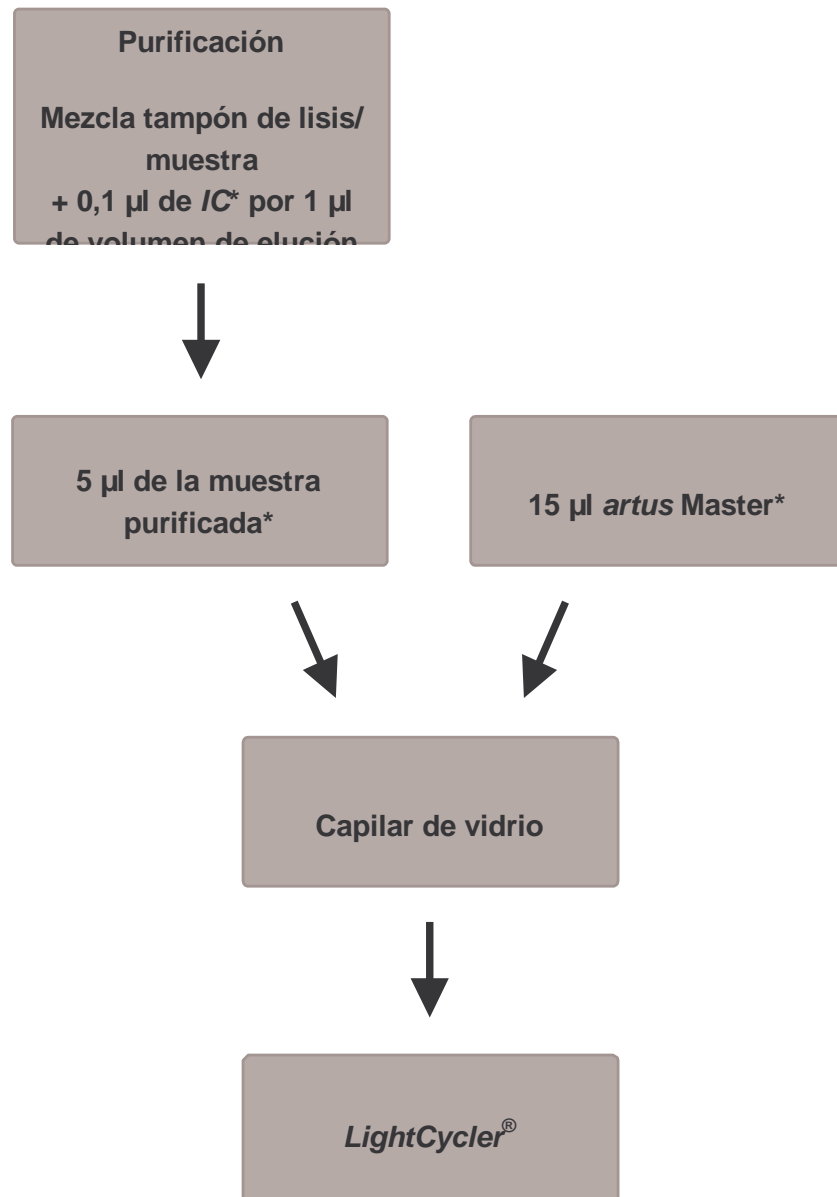


Fig. 1: Esquema de trabajo para el análisis de la purificación y la inhibición de la PCR.

*

Con cada pipeteo, es imprescindible que compruebe que las soluciones utilizadas se encuentren completamente descongeladas, bien mezcladas y que hayan sido centrifugadas brevemente.

Adición del Control interno a la artus Master

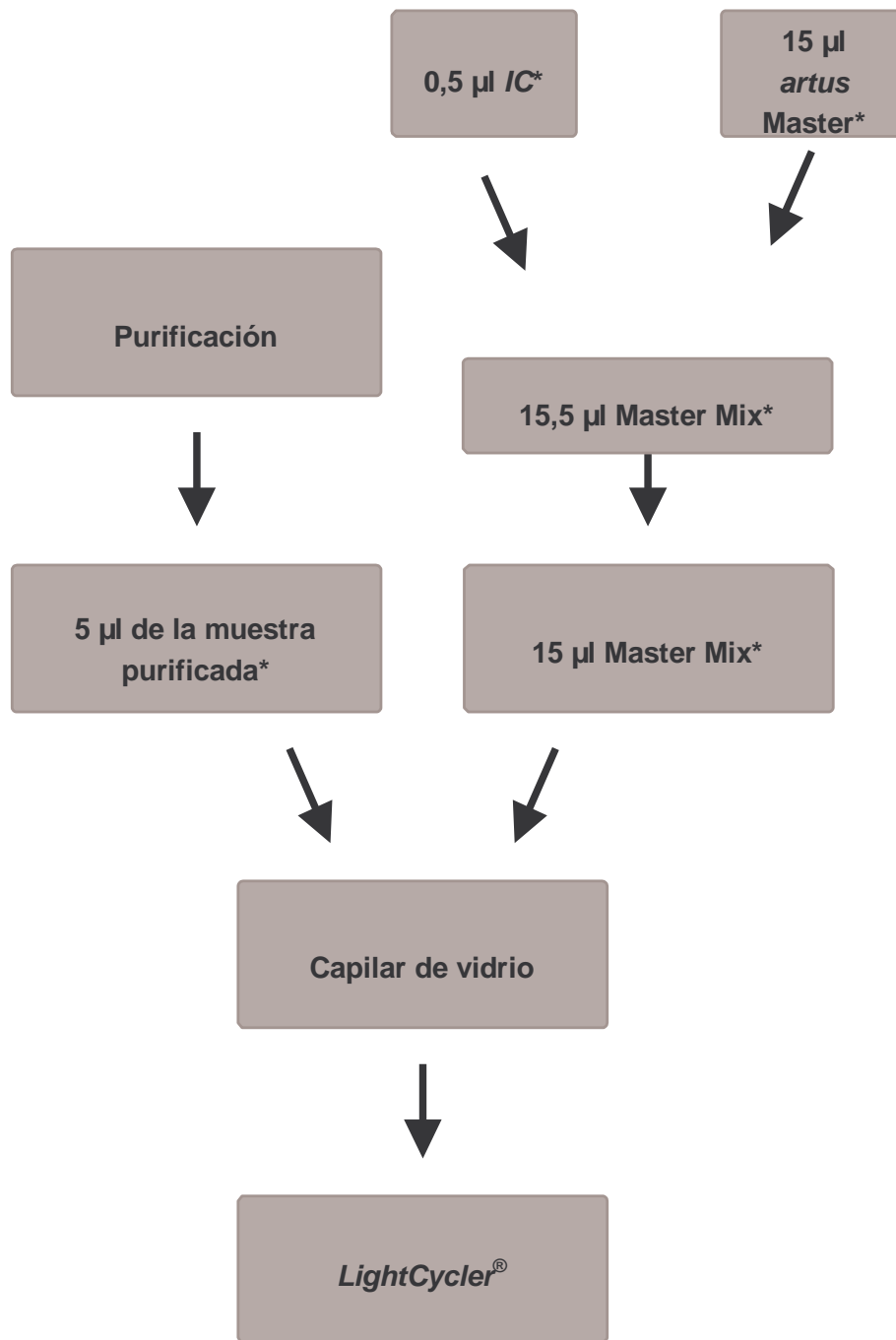


Fig. 2: Esquema de trabajo para el análisis de la inhibición de la PCR.

*

Con cada pipeteo, es imprescindible que compruebe que las soluciones utilizadas se encuentren completamente descongeladas, bien mezcladas y que hayan sido centrifugadas brevemente.

8.5 Programación del sistema *LightCycler*

Para la detección del ADN del EBV cree un perfil de temperatura en el sistema *LightCycler* con estos cinco pasos según las Fig. 3 - 7.

- A. Activación inicial de la enzima Hot Start Fig. 3
- B. Paso Touch Down Fig. 4
- C. Amplificación del ADN Fig. 5
- D. Curva de *melting* (**opcional**) Fig. 6
- E. Refrigeración Fig. 7

Preste especial atención a los ajustes *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* y *Temperature Targets*. En las figuras, estos ajustes aparecen resaltados mediante un recuadro en negrita. Encontrará más información acerca de la programación del sistema *LightCycler* en el *LightCycler Operator's Manual*. La programación del paso D curva de *melting* es **opcional**. Es necesario exclusivamente para diferenciar entre HSV1 y HSV2 en caso de emplear simultáneamente el *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*.

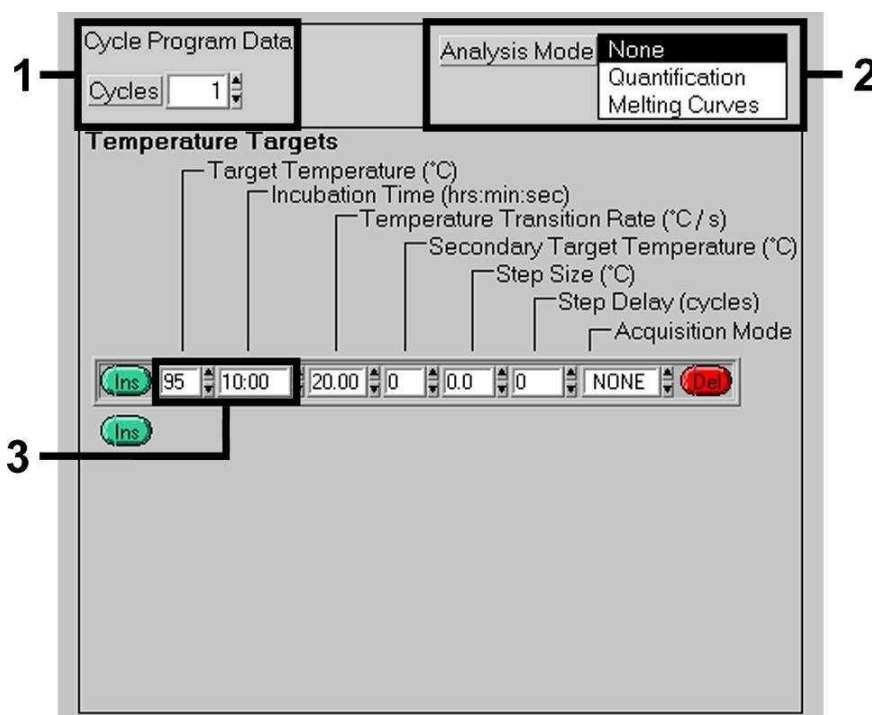


Fig. 3: Activación inicial de la enzima Hot Start.

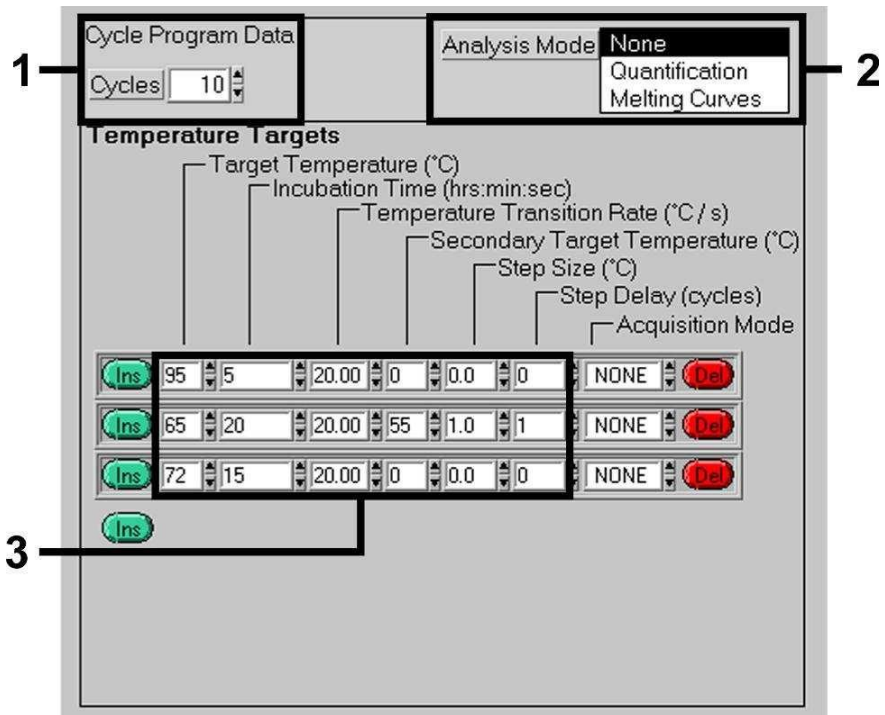


Fig. 4: Paso Touch Down.

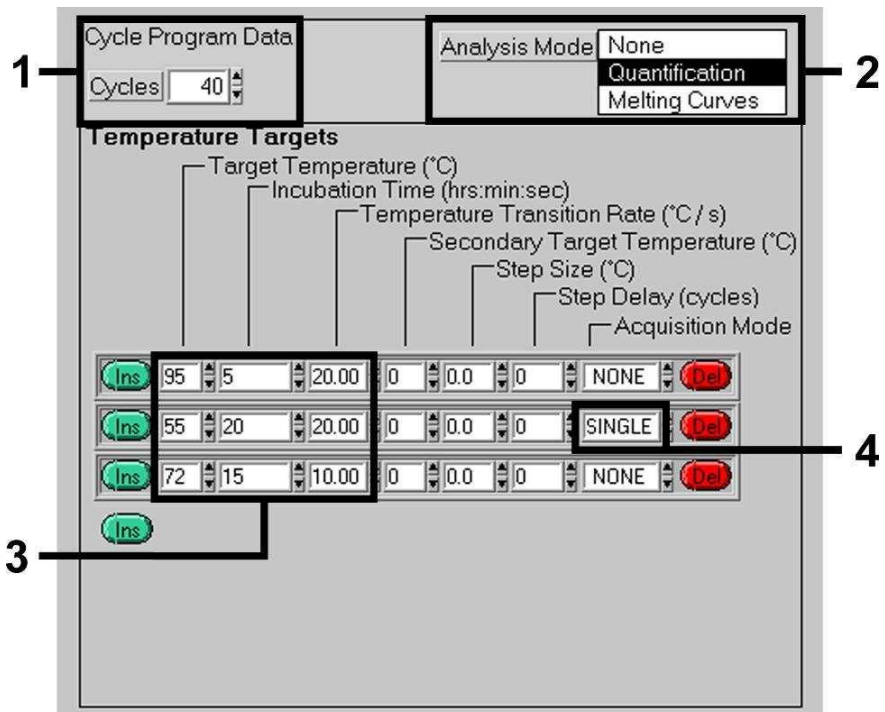


Fig. 5: Amplificación delADN.

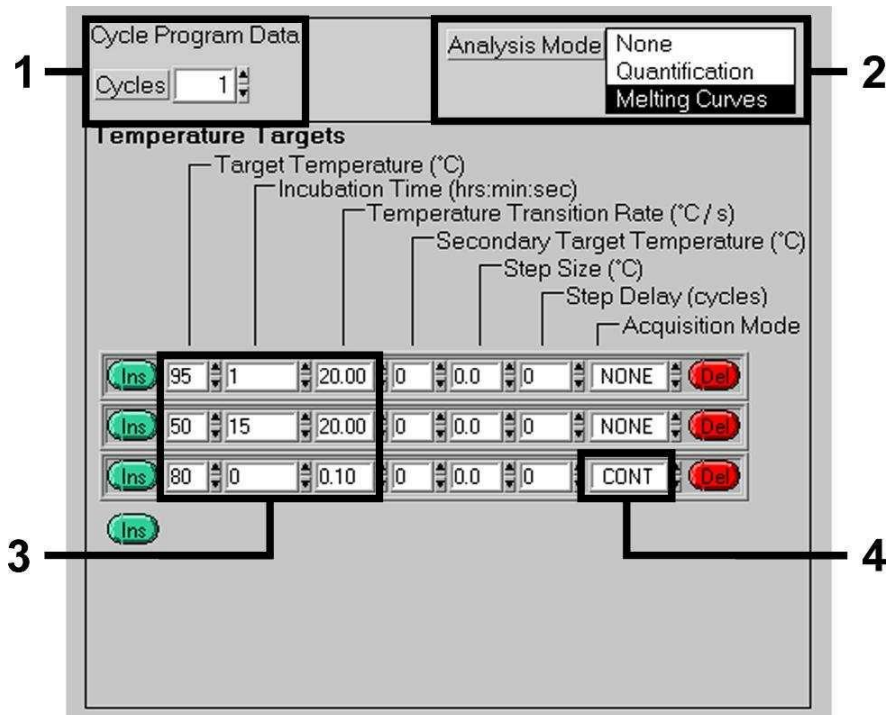


Fig. 6: Curva de melting.

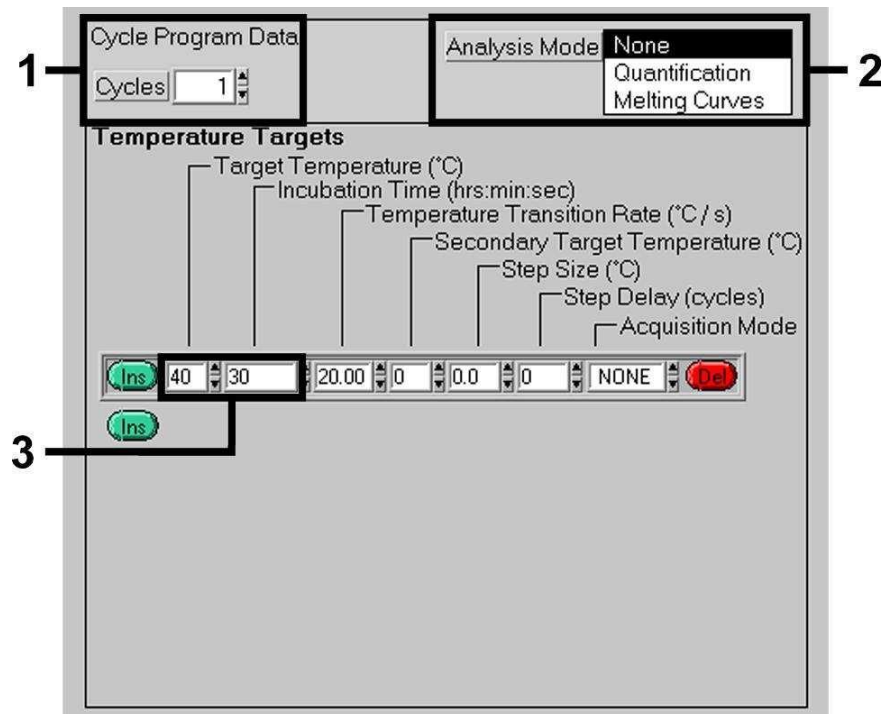


Fig. 7: Refrigeración.

9. Análisis

Durante los análisis con diferentes fluorocromos se producen interferencias entre los canales del fluorímetro. El software del sistema *LightCycler* contiene un archivo llamado *Color Compensation File* para compensar estas interferencias. Abra este archivo en el transcurso o al final de la reacción de PCR activando *Choose CCC File* o pulsando *Select CC Data*. Si no se encuentra instalado ningún *Color Compensation File*, créelo usted mismo, pero por favor siguiendo las instrucciones del *LightCycler Operator's Manual*. Después de la activación del *Color Compensation File* aparecen en los canales fluorimétricos F1, F2 y F3 señales separadas. Para el análisis del resultado de la PCR usando el *artus EBV LC PCR Kit* seleccione por favor F2/Back-F1 para la PCR analítica del EBV y en el caso del análisis de la PCR del *Control interno*, F3/Back-F1. Para el análisis de series cuantitativas preste atención a la sección **8.3 Cuantificación**, así como a la **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Si tuviera que integrar más de un sistema *Herpes-artus* en la serie, preste atención, analice las muestras para el EBV por separado. Seleccione para ello las posiciones correspondientes del rotor para el análisis de los datos.

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal fluorimétrico F2/Back-F1.

El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ADN del EBV.

En este caso, la detección de la señal en el canal F3/Back-F1 es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ADN del EBV (señal positiva en el canal F2/Back-F1) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del *Control interno* (en el canal F3/Back-F1). Esto se debe a fenómenos de competencia.

2. En el canal del fluorímetro F2/Back-F1 no se detecta ninguna señal, sino sólo en el canal F3/Back-F1 (señal del *Control interno*).

En la muestra no se detecta ADN del EBV, por lo que puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa del EBV, la señal del *Control interno* detectada excluye la posibilidad de una inhibición de la PCR.

3. No se detecta señal ni en el canal F2/Back-F1 ni en el canal F3/Back-F1.

No es posible realizar el diagnóstico.

Encontrará más información relativa a las causas y soluciones de los problemas en

10. Solución de problemas.

En las Fig. 8 y 9 se muestran ejemplos de reacciones positivas y negativas de la PCR.

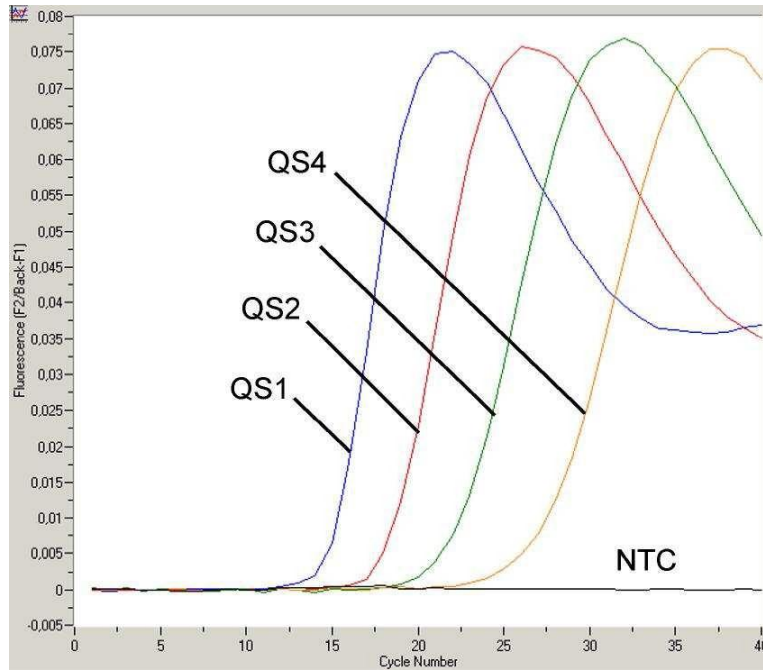


Fig. 8: Detección de los Estándares de cuantificación (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) en el canal fluorimétrico F2/Back F1. NTC: non-template control (control negativo).

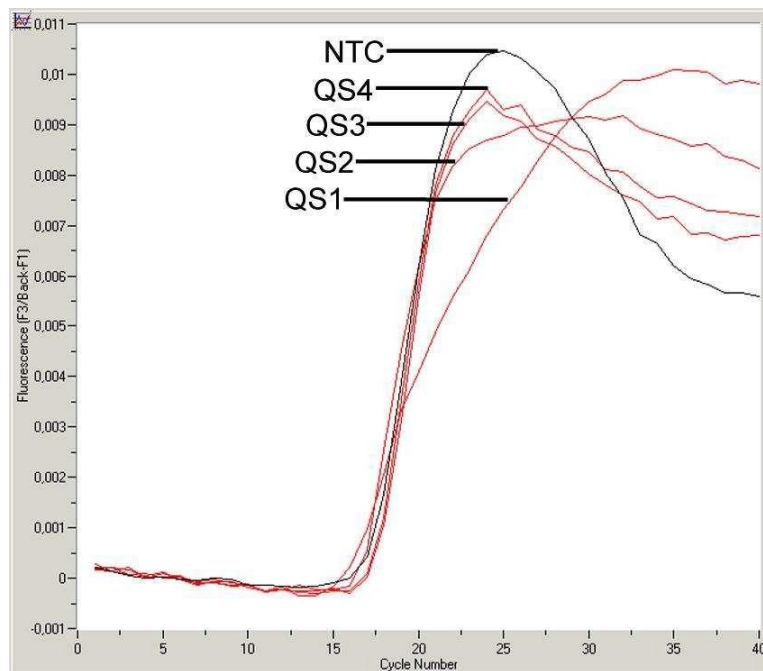


Fig. 9: Detección del Control interno (IC) en el canal fluorimétrico F3/Back-F1 con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

10. Solución de problemas

Ausencia de señal en los controles positivos (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) en el canal fluorimétrico F2/Back-F1:

- La selección de los canales fluorimétricos para el análisis de la PCR no se corresponde con el protocolo.
 - ❖ Seleccione el canal fluorimétrico F2/Back-F1 para el análisis de la PCR del EBV y el canal fluorimétrico F3/Back-F1 para la PCR del *Control interno*.
- La programación del perfil de temperatura en el sistema *LightCycler* no se llevó a cabo correctamente.
 - ❖ Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.5 Programación del sistema *LightCycler***).
- La preparación de la PCR no se llevó a cabo correctamente.
 - ❖ Compruebe el esquema de trabajo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.4 Preparación de la PCR**) y repita de nuevo la PCR si es necesario.
- No se tuvieron en cuenta las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit detalladas en **2. Almacenamiento** o el *artus EBV LC PCR Kit* ha caducado.
 - ❖ Por favor compruebe las condiciones de almacenamiento así como la fecha de caducidad de los componentes (compruebe la etiqueta del kit) y use un nuevo kit si es necesario.

Señal débil o ausente del *Control interno* en el canal fluorimétrico F3/Back-F1 con ausencia simultánea de señal en el canal F2/Back-F1:

- Las condiciones de la PCR no se ajustan al protocolo.
 - ❖ Compruebe las condiciones de la PCR (véase arriba) y repita la PCR si es necesario después de haber corregido los parámetros.
- La PCR experimentó una inhibición.
 - ❖ Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.

- ◆ Asegúrese que durante la purificación del ADN se ha realizado el paso adicional de centrifugación para eliminar los restos de etanol antes de realizar la elución (véase **8.1 Purificación del ADN**).
- Se producen pérdidas de ADN durante la purificación.
 - ◆ Si el *Control interno* se ha añadido durante la purificación, la falta de señal del *Control interno* puede indicar que se producen pérdidas de ADN durante la purificación. Asegúrese de que está utilizando uno de los métodos de purificación recomendados (véase **8.1 Purificación del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- No se tuvieron en cuenta las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit detalladas en **2. Almacenamiento** o el *artus EBV LC PCR Kit* ha caducado.
 - ◆ Por favor compruebe las condiciones de almacenamiento así como la fecha de caducidad (compruebe la etiqueta del kit) de los componentes y use un nuevo kit si es necesario.

Señales en los controles negativos de la PCR analítica en el canal fluorimétrico F2/Back-F1:

- Se produjo una contaminación durante la preparación de la PCR.
 - ◆ Repita de nuevo la PCR con componentes nuevos y realice réplicas.
 - ◆ Cierre los capilares lo antes posible después de haber pipeteado las muestras a analizar.
 - ◆ Pipetee los controles positivos en último lugar.
 - ◆ Asegúrese que tanto la zona como el material de trabajo se descontaminan regularmente.
- Se produjo una contaminación durante la purificación.
 - ◆ Repita de nuevo la purificación y la PCR de las muestras a analizar con componentes nuevos.
 - ◆ Asegúrese que tanto la zona como el material de trabajo se descontaminan regularmente.

Para cualquier duda o consulta, póngase por favor en contacto con nuestro servicio técnico.

11. Especificaciones

11.1 Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del *artus* EBV LC PCR Kit se realizaron diluciones seriadas de un estándar de 50 a 0,005 copias equivalentes*/ μl del EBV y se analizaron con el *artus* EBV LC PCR Kit. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis Probit cuyo gráfico se muestra en la Fig. 10. El límite de detección del *artus* EBV LC PCR Kit es, por lo tanto, de 5,78 copias/ μl ($p = 0,05$). Esto significa, que hay un 95 % de posibilidades de detectar 5,78 copias/ μl .

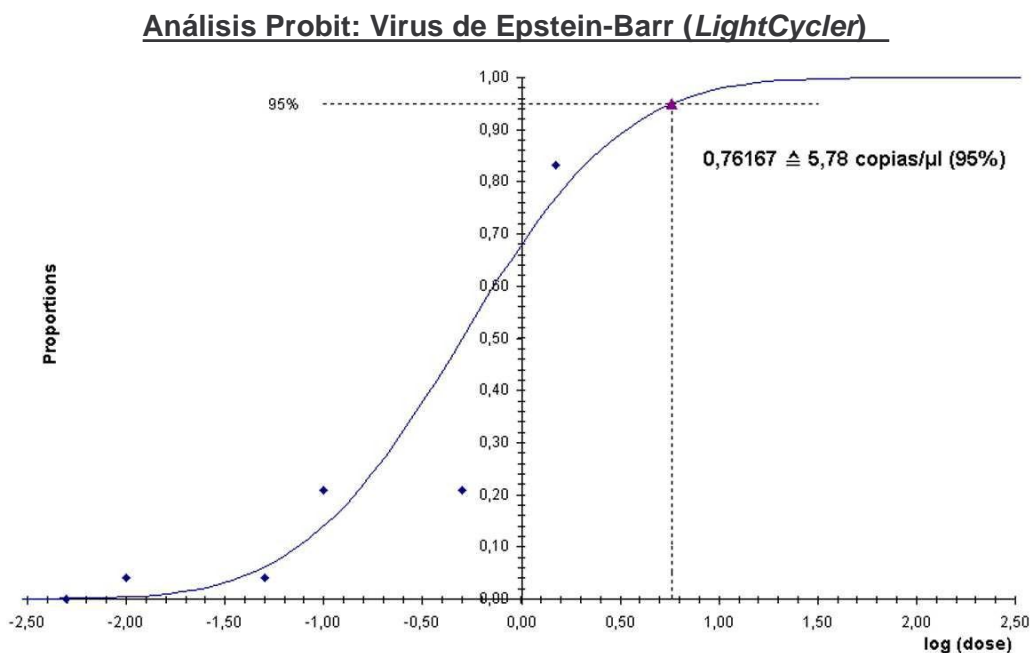


Fig. 10: Sensibilidad analítica del *artus* EBV LC PCRKit.

10.1 Especificidad

La esmerada selección de los cebadores y las sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del *artus* EBV LC PCR Kit. Los cebadores y las sondas se controlaron mediante

* El estándar que se utiliza en este caso es un producto de PCR clonado, cuya concentración se ha determinado por absorción y espectroscopia de fluorescencia.

un análisis de comparación de secuencias, en cuanto a posibles homologías con otras secuencias conocidas. De este modo, se asegura también la detectabilidad de todos los genotipos relevantes.

La especificidad fue evaluada con 6 muestras de suero distintas negativas para el EBV. Éstas no generaron ninguna señal con los cebadores ni con las sondas específicas del EBV incluidos en la *EBV LC Master*.

Para determinar la ausencia de reactividad cruzada del *artus EBV LC PCR Kit* con otras especies íntimamente relacionadas, se llevó a cabo un análisis de un grupo control, como se muestra en la Tabla 1. Ninguno de los agentes patógenos sometidos a la prueba resultó reactivo.

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

| Grupo de control | EBV (F2/Back-F1) | Control interno (F3/Back-F1) |
|---|---------------------|---------------------------------|
| Herpesvirus humano tipo 1 (Virus Herpes simplex tipo 1) | - | + |
| Herpesvirus humano tipo 2 (Virus Herpes simplex tipo 2) | - | + |
| Herpesvirus humano tipo 3 (Virus varicela-zoster) | - | + |
| Herpesvirus humano tipo 5 (Cytomegalovirus) | - | + |
| Virus de la leucemia de células T humano tipo 1 | - | + |
| Virus de la leucemia de células T humano tipo 2 | - | + |

11.2 Precisión

Los datos de precisión para el *artus EBV LC PCR Kit* permiten la determinación de la varianza total del ensayo. Esta varianza total consiste en la determinación de la **variabilidad intra-ensayo** (variabilidad entre muestras de igual concentración dentro de un ensayo), la **variabilidad inter-ensayo** (variabilidad interna del laboratorio debido al empleo por parte de distintas personas de distintos aparatos del mismo tipo) y la **variabilidad inter-lotes** (variabilidad debido a la utilización de distintos lotes). Los datos

obtenidos se utilizan para calcular la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación tanto para la PCR específica del patógeno como para la del *Control interno*.

Estos datos se determinaron para *artus EBV LC PCR Kit* utilizando el *Estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 4; 50 copias/ μ l). Los análisis se realizaron por octuplicado. Los datos de precisión fueron calculados en base a los valores de Ct de las curvas de amplificación (Ct: *threshold cycle*, Tabla 2). Del mismo modo los datos de precisión de los resultados cuantitativos en copias/ μ l fueron determinados usando los valores de Ct correspondientes (Tabla 3). Acorde con estos resultados, la dispersión total de una muestra cualquiera de concentración dada es 1,17 % (Ct) o 14,54 % (concentración). En el caso de la detección del *Control interno* es 1,02 % (Ct). Estos valores se basan en el conjunto de todos los valores individuales de las variabilidades determinadas.

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

| | Desviación estándar | Varianza | Coefficiente de variabilidad [%] |
|--|---------------------|----------|----------------------------------|
| Variabilidad intra-ensayo: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 0,20 | 0,04 | 0,90 |
| Variabilidad intra-ensayo: <i>Control interno</i> | 0,04 | 0,00 | 0,28 |
| Variabilidad inter-ensayo: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 0,27 | 0,07 | 1,24 |
| Variabilidad inter-ensayo: <i>Control interno</i> | 0,11 | 0,01 | 0,72 |
| Variabilidad inter-lotes: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 0,47 | 0,07 | 1,44 |
| Variabilidad inter-lotes: <i>Control interno</i> | 0,19 | 0,03 | 1,23 |
| Varianza total: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 0,26 | 0,07 | 0,71 |
| Varianza total: <i>Control interno</i> | 0,15 | 0,02 | 1,02 |

Tabla 3: Datos de precisión basados en los valores cuantitativos (en copias/ μ l).

| | Desviación estándar | Varianza | Coficiente de variabilidad [%] |
|--|---------------------|----------|--------------------------------|
| Variabilidad intra-ensayo: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 1,36 | 1,85 | 13,48 |
| Variabilidad inter-ensayo: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 1,68 | 2,83 | 16,61 |
| Variabilidad inter-lotes: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 1,33 | 1,77 | 13,19 |
| Varianza total: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> | 1,47 | 2,16 | 14,54 |

11.4 Reproducibilidad

Los datos de la reproducibilidad sirven para una valorización regular del rendimiento del *artus EBV LC PCR Kit*, así como para su comparación con otros productos. Estos datos se obtienen mediante la participación en ensayos de intercomparación.

11.5 Evaluación diagnóstica

El *artus EBV LC PCR Kit* sigue siendo evaluado en diversos estudios.

12. Limitaciones en la utilización del producto

- Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para el diagnóstico in vitro.
- El producto sólo debe ser utilizado por personal cualificado y con la formación necesaria para realizar diagnósticos in vitro (EN375).
- Es imprescindible cumplir con el protocolo para conseguir resultados de la PCR óptimos.
- Preste atención a las fechas de caducidad que aparecen en la caja y en las etiquetas de cada uno de los componentes. No utilice reactivos caducados.

13. Advertencias y precauciones

Información de seguridad respecto al *artus* EBV LC PCR Kit puede encontrarla en la hoja de seguridad (safety data sheets, SDS). Puede descargar dicha hoja en cómodo formato PDF bajo la dirección www.qiagen.com/safety.









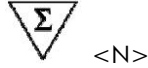

14. Control de calidad

En conformidad con la certificación ISO 9001 e ISO 13485 del sistema de gestión de la calidad de QIAGEN, cada lote del *artus* EBV LC PCR Kit fue testado respecto a especificaciones establecidas para garantizar la calidad constante del producto.

15. Bibliografía

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 |
|  | Número de lote |
|  | Fabricante |
|  | Número de catálogo |
|  | Número del manual de uso |
|  | Manual de uso |
|  | Dispositivo medico de diagnostic in vitro |
|  | Número mundial de artículo comercial |
|  | Contiene suficiente para <N> tests |
|  | Límite de temperatura |
| QS | <i>Estándar de cuantificación</i> |
| IC | <i>Control interno</i> |

artus EBV LC PCR Kit

Marcas comerciales y cláusulas de exclusión

QIAGEN®, QIAamp®, artus® BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group).

Todos los nombres registrados, marcas comerciales, etc, usados en este documento, incluso aquellos que no estén específicamente marcados, están protegidos por la ley.

El artus EBV LC PCR Kit, el BioRobot EZ1 DSP Workstation, el EZ1 DSP Virus Kit y Card son dispositivos de diagnóstico marcados con CE siguiendo la directiva europea de diagnóstico in vitro 98/79/EC. No disponible en todos los países.

Los QIAamp Kits están indicados para el uso general en el laboratorio. No están indicados para proporcionar información acerca del diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades.

La compra de kits de PCR de artus incluye una licencia de limitación de uso al proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada al diagnóstico in vitro en humanos y veterinaria en combinación con un termociclador, cuyo uso en el proceso automatizado de la PCR está protegido por derechos de pre-pago, bien con el pago a Applied Biosystems o como compra, p. ej. de un termociclador autorizado. El proceso de la PCR está protegido por las patentes americanas enumeradas a continuación y sus equivalentes en los países correspondientes Nr. 5,219,727 y 5,322,770 y 5,210,015 y 5,176,995 y 6,040,166 y 6,197,563 y 5,994,056 y 6,171,785 y 5,487,972 y 5,804,375 y 5,407,800 y 5,310,652 y 5,994,056 propiedad de F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, todos los derechos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

