

artus[®] HSV-1/2 TM PCR Kit

Manual de uso



24 (Nr. cat. 4500163)



96 (Nr. cat. 4500165)

Diagnóstico cuantitativo in vitro

Para utilizar con el

AB/PR/SM[®] 7000, 7700 y 7900HT Sequence Detection Systems

Versión 1



4500163, 4500165



1046890ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

MAT

1046890ES



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

Inhalt

1. Contenido.....	5
2. Almacenamiento.....	6
3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios	6
4. Medidas generales de seguridad	7
5. Información acerca del agente patógeno	7
6. Principio de la PCR a tiempo real.....	8
7. Descripción del producto	8
8. Protocolo	9
8.1 Purificación del ADN.....	9
8.2 Control interno	12
8.3 Cuantificación	13
8.4 Preparación de la PCR.....	14
8.5 Programación del <i>ABI PRISM SDS</i>	19
8.5.1 Programación del <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>.....	19
8.5.1.1 Ajustes al crear un nuevo ensayo de PCR.....	19
8.5.1.2 Creación/selección de los fluorocromos	20
8.5.1.3 Asignación de la información necesaria de los pocillos dentro de la placa	22
8.5.1.4 Creación del perfil de temperatura.....	23
8.5.1.5 Almacenamiento de la reacción de PCR.....	24
8.5.1.6 Inicio de la reacción de PCR.....	24
8.5.2 Programación del <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>.....	25

8.5.2.1	<i>Ajustes al crear un nuevo ensayo de PCR.....</i>	<i>25</i>
8.5.2.2	<i>Creación/selección de los fluorocromos</i>	<i>26</i>
8.5.2.3	<i>Asignación de la información necesaria de los pocillos dentro de la placa.....</i>	<i>28</i>
8.5.2.4	<i>Creación del perfil de temperatura.....</i>	<i>30</i>
8.5.2.5	<i>Almacenamiento de la reacción de PCR</i>	<i>31</i>
8.5.2.6	<i>Inicio de la reacción de PCR.....</i>	<i>31</i>
9.	Análisis	32
10	Solución de problemas	40
11.	Especificaciones	42
11.1	Sensibilidad analítica	42
11.2	Especificidad	44
11.3	Precisión.....	45
11.4	Robustez	47
11.5	Reproducibilidad	48
11.6	Evaluación diagnóstica	48
12.	Limitaciones en la utilización del producto.....	48
13.	Información de seguridad.....	49
14.	Control de calidad	49
15.	Bibliografía.....	49
16.	Explicación de los símbolos.....	50

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Para utilizar con ABI PRISM 7000 y 7900HT Sequence Detection Systems.

Atención: El artus HSV-1/2 TM PCR Kit no se puede utilizar con el GeneAmp® 5700 SDS ni con el ABI PRISM 7700 SDS, ni con el formato de placa de 384-pocillos del ABI PRISM 7900HT SDS.

1. Contenido

	Rotulado y contenido	Art. No. 4500163 24 reacciones	Art. No. 4500165 96 reacciones
Azul	HSV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Amarillo	HSV TM Mg-Sol [†]	1 x 1.200 µl	1 x 1.200 µl
Rojo	HSV1 LC/RG/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV1 LC/RG/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV1 LC/RG/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV1 LC/RG/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV2 LC/RG/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV2 LC/RG/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV2 LC/RG/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rojo	HSV2 LC/RG/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	HSV TM IC [‡]	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Blanco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

- [‡] QS = Estándar de cuantificación
 IC = Control interno
 Mg-Sol = Solución de magnesio

2. Almacenamiento

Los componentes del *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit deben almacenarse 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 $+4^{\circ}\text{C}$, 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
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación (opcional)
- Placas de reacción de 96-pocillos/tubos de reacción ópticos con tapas apropiadas para lectura óptica (véase **8.4 Preparación de la PCR**)
- Rack de dos piezas para placas de 96-pocillos para uso con tubos de reacción ópticos (*96-Well Tray/Retainer Set*, Art. No. 403 081, Applied Biosystems), véase **8.4 Preparación de la PCR**
- Almohadilla de compresión para apretar las tapas ópticas en combinación con láminas adhesivas ópticas (*Optical Cover Compression Pads*, Art. No. 4 312 639, Applied Biosystems), véase **8.4 Preparación de la PCR**
- Aplicador para el cierre de las placas de reacción en combinación con láminas adhesivas ópticas (*Adhesive Seal Applicator Kit*, Art. No. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000 ó 7900HT SDS*

Atención: Para poner en funcionamiento el aparato, es imprescindible realizar una calibración válida de los fluorocromos (*Pure Spectra Component File*) y de la señal del fondo (*Background Component File*).

4. Medidas generales de seguridad

El usuario siempre debe tener 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, amplificadas) por separado del resto de reactivos.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
- A continuación, deben mezclarse los componentes a conciencia y centrifugar brevemente.
- Inmediatamente, debe trabajarse en hielo o en el bloque de refrigeración.

5. Información acerca del agente patógeno

El virus Herpes simplex (HSV) se encuentra en las lesiones que produce en la piel, saliva y secreciones vaginales de personas infectadas. Se transmite principalmente por el contacto directo con las úlceras activas durante las relaciones sexuales y por infección perinatal. En la mayor parte de infecciones producidas por este virus se produce la formación de ampollas en la piel y en las mucosas (bucal y genitourinaria). La infección por HSV puede presentarse tanto como infección primaria, que transcurre en más del 90 % de los casos de forma asintomática, o recurrente (secundaria). Las infecciones primarias causadas por el virus tipo HSV-1 pueden producir gingivostomatitis, eccema herpético, queratoconjuntivitis y encefalitis, mientras que las causadas por HSV-2 producen vulvovaginitis, meningitis y herpes generalizado en el recién nacido. Los síntomas primarios de la

infección secundaria son la formación de ampollas típicas alrededor de la nariz, la boca y en la región genital. Mucho más peligrosas son las formas recurrentes de queratoconjuntivitis y de meningitis.

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 la 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 HSV-1/2 TM PCR Kit* es un sistema listo para utilizar e indicado para la detección y diferenciación del ADN del virus Herpes simplex 1 y 2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el *ABI PRISM 7000 y 7900HT Sequence Detection System*. La *HSV TM Master* contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de un fragmento de 148 pb del genoma del virus Herpes simplex. La detección del fragmento amplificado se realiza midiendo la fluorescencia FAM (HSV1) y NED (HSV2) en el *ABI PRISM SDS*. Además, el *artus HSV-1/2 TM 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)* al medir la fluorescencia VIC. Con lo cual, el límite de detección de la PCR analítica del HSV (véase **11.1 Sensibilidad analítica**) no se ve afectado. Se suministran controles positivos externos (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* y *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) que permiten determinar la carga patógena. Para más información al respecto, véase el apartado **8.3 Cuantificación**.

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, hisopos	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	incluido
	QIAamp DNA Mini	51 304	QIAGEN	no incluido
LCR	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 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) en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. 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 de 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. 2.400 μl
Carrier de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volumen total	202 μl	2.424 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 esquema.

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis AC	800 μ l	9.600 μ l
Carrier de RNA (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Volumen total	805,6 μl	9.667,2 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, adicione como mínimo 50 % (v/v) de plasma humano negativo a la misma.
 - Si lleva a cabo la purificación con tampones de lavado que contienen **etanol**, asegúrese de que se realiza una centrifugación adicional previa (tres minutos, 13.000 rpm) a la elución para eliminar posibles restos de etanol. De este modo, se evitan posibles inhibiciones de la PCR.
 - El *artus HSV-1/2 TM 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* del *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* puede añadirse directamente durante la purificación (véase **8.2 Control interno**).

8.2 Control interno

Se suministra un *Control interno (HSV TM IC)*, con el que podrá analizar tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR (véase 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** 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 tampón AE. Por lo tanto, se debe añadir 5 μl del *Control interno*. La cantidad de *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 Fig. 2). Para ello, añada por reacción 2 μl del *Control interno* y 10 μl de la *HSV TM Mg-Sol* directamente a 20 μl de la *HSV TM Master*. Utilice para cada reacción de la PCR 30 μl de la Master Mix* preparada y añada a continuación 20 μl de la muestra purificada. Si tiene que preparar una PCR con más muestras, aumente las cantidades necesarias de la *HSV TM Master*, de la *HSV TM Mg-Sol* y del *Control interno* de acuerdo al número de muestras (véase **8.4 Preparación de la PCR**).

8.3 Cuantificación

Los *Estándares de cuantificación* suministrados (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* y *HSV2 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 (20 µl). Para elaborar una curva estándar en el *ABI PRISM Sequence Detection System*, añada los cuatro *Estándares de cuantificación* suministrados para HSV1 y también para HSV2 y defínalos como estándares indicando las concentraciones correspondientes (véase **8.5 Programación del ABI PRISM SDS**). El software de los *ABI PRISM 7000* y *7900HT SDS* no permite importar curvas estándar de experimentos anteriores.

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

$$\text{Resultado (copias/ml)} = \text{resultado (copias/µl)} \times \text{volumen de elución (µl)}$$

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 instrumento *ABI PRISM*[®] 7000 SDS tiene a su disposición una guía (**Technical Note for quantitation on the ABI PRISM**[®] 7000 SDS) en www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

* 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.

8.4 Preparación de la PCR

Prepare el número necesario de tubos de reacción o bien una placa de reacción de 96-pocillos según las reacciones que vaya a realizar. En la tabla siguiente se indican los materiales recomendados:

Artículo	Denominación	Art. No.	Fabricante	Retaining Rack*	Almohadilla de compresión
Placa de reacción óptica de 96-	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	no	-
Láminas adhesivas ópticas	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	sí
Recipientes de reacción ópticos	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	sí	-
Recipientes de reacción ópticos	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	sí	-
Tapas ópticas (planas)	ABI PRISM Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	-	no

Asegúrese de que al preparar la reacción de PCR, por cada ensayo 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 ensayo de la PCR todos los *Estándares de cuantificación* suministrados (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* y *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*). Antes de iniciar la prueba, todos los reactivos deben descongelarse totalmente a temperatura ambiente, mezclarse a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo varias veces o agite brevemente con el vortex). A continuación centrifugue brevemente.

* Si se utiliza el retaining rack de dos piezas, es necesario abrir los tubos de reacción tanto al introducirlos como al extraerlos. Para evitar contaminación durante ésta operación, utilice solamente la parte inferior del retaining rack

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	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	0 μ l	0 μ l
	Volumen total	30 μl	360 μl
2. Preparación de la PCR	Master Mix	30 μ l	cada 30 μ l
	Muestra	20 μ l	cada 20 μ l
	Volumen total	50 μl	cada 50 μl

Si desea emplear el *Control interno* exclusivamente para analizar una posible inhibición de la PCR, debe añadirlo directamente a la HSV TM 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	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	2 μ l	24 μ l
	Volumen total	32 μl*	384 μl*
2. Preparación de la PCR	Master Mix	30 μ l*	cada 30 μ l*
	Muestra	20 μ l	cada 20 μ l
	Volumen total	50 μl	cada 50 μl

Añada 30 μ l de la Master Mix en cada tubo de reacción o respectivamente en cada pocillo de la placa de reacción de 96-pocillos. A continuación, añada 20 μ l de la purificación de ADN. Asegúrese de que ambas soluciones queden bien mezcladas, para ello pipetee la mezcla arriba y abajo varias veces.

* 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.

Cierre los tubos de reacción con las tapas apropiadas o utilice una placa de reacción de 96-pocillos use una lámina adhesiva óptica (*Optical Adhesive Covers*). Para una correcta disposición del volumen en el fondo de los tubos o en el fondo de los pocillos de las placas de reacción, centrifugue los mismos (en un rack para tubos de PCR) o bien centrifugue la placa de reacción de 96-pocillos, en una centrifuga con rotor para placas de microtitulación durante 30 segundos a 1.780 x g (4.000 rpm). Si no dispone de una centrífuga de este tipo, asegúrese de que al preparar las reacciones de la PCR, pipetee tanto la Master Mix como el volumen de la muestra en el fondo de los tubos o de los pocillos, en el caso de las placas. Almacene las reacciones preparadas a +4°C hasta que el instrumento *ABI PRISM SDS* esté programado (véase **8.2 Programación del ABI PRISM SDS**) y, a continuación, transfíralas al aparato.

Atención:

- Al utilizar tubos de reacción ópticos junto con las tapas ópticas apropiadas, introduzca un rack (*96-Well Tray/Retainer Set*) en el instrumento (*ABI PRISM 7000* y *7900HT SDS*). Al utilizar el rack de dos piezas, es necesario abrir los tubos de reacción tanto al introducirlos como al extraerlos. Para evitar que se produzca una contaminación, utilice exclusivamente la parte inferior del rack.
- El uso de placas de reacción ópticas de 96-pocillos junto con láminas adhesivas ópticas requiere el uso de una almohadilla para apretarlas (*Optical Cover Compression Pads*).

Adición del Control interno a la purificación

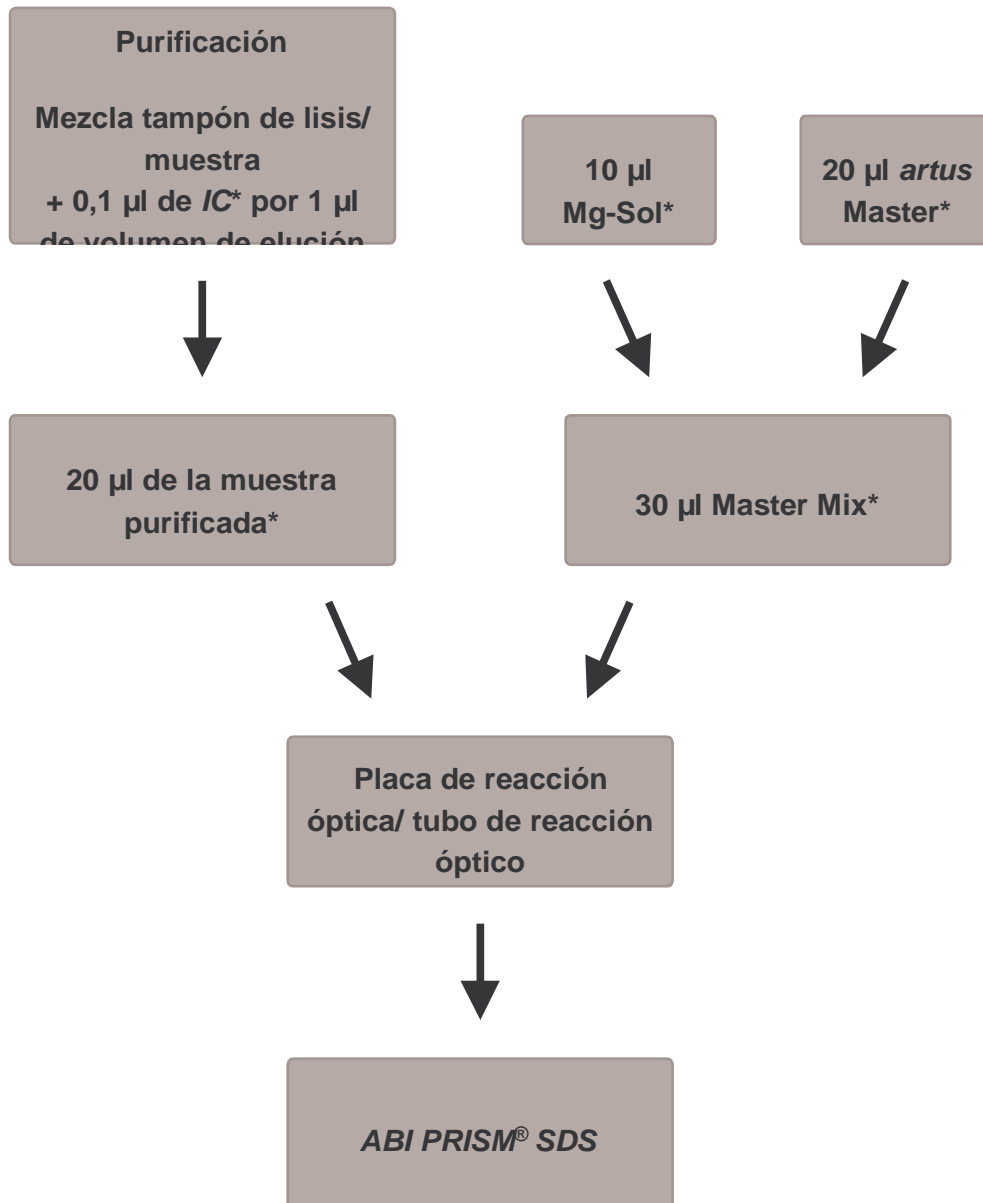


Fig. 1: Esquema de trabajo para el análisis de la purificación y la inhibición de la PCR.

*

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

Adición del Control interno a la artus Master

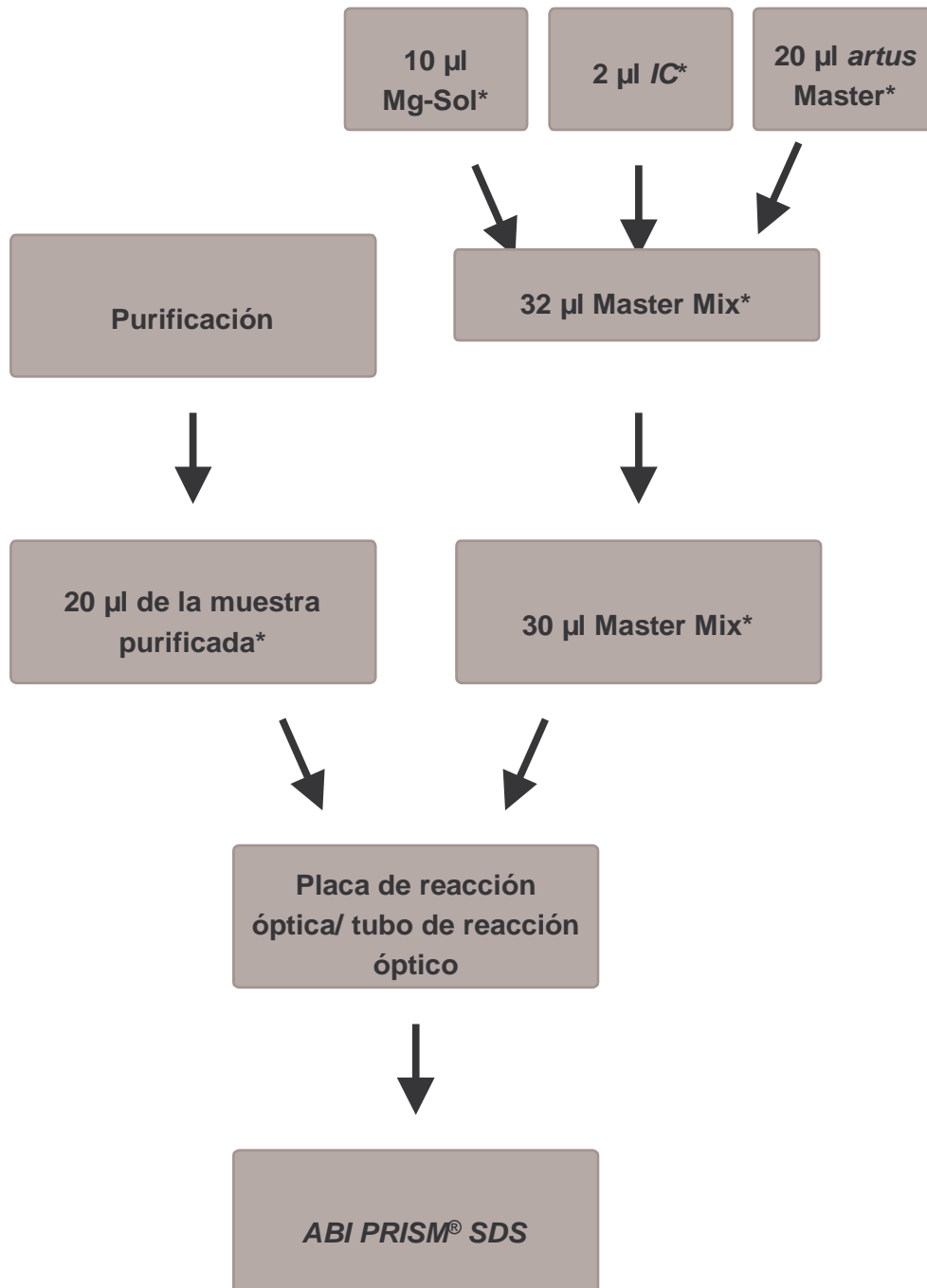


Fig. 2: Esquema de trabajo para el análisis de la inhibición de la PCR.

*

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

8.5 Programación del ABI PRISM SDS

Antes de iniciar la PCR, el software de los ABI PRISM 7000 y 7900HT *Sequence Detection Systems (SDS)* requiere información adicional. Los procedimientos para programar los aparatos difieren considerablemente los unos de los otros, por lo que se tratarán en capítulos separados.

8.5.1 Programación del ABI PRISM 7000 SDS

Para la detección del ADN del HSV cree un perfil en su ABI PRISM 7000 SDS según los seis pasos de trabajo siguientes (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Todas las especificaciones hacen referencia a ABI PRISM 7000 SDS Software Version 1.0.1. Para más información acerca de la programación del ABI PRISM 7000 SDS, remítase al manual *ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. Para una mejor visualización de los ajustes, éstos aparecen resaltados en las ilustraciones mediante un recuadro en negrita.

8.5.1.1 Ajustes al crear un nuevo ensayo de PCR

Seleccione en el ABI PRISM 7000 SDS la opción *New* del menú *File* e introduzca los siguientes ajustes básicos para el nuevo documento (véase la Fig. 3). El ensayo (protocolo) almacenamiento anteriormente (*SDS Template* [*.sdt]) aparece en la lista *Template* o bien puede seleccionarlo mediante la función *Browse* (véase 8.5.1.5 Almacenamiento de la reacción de PCR). Confirme sus datos (OK).

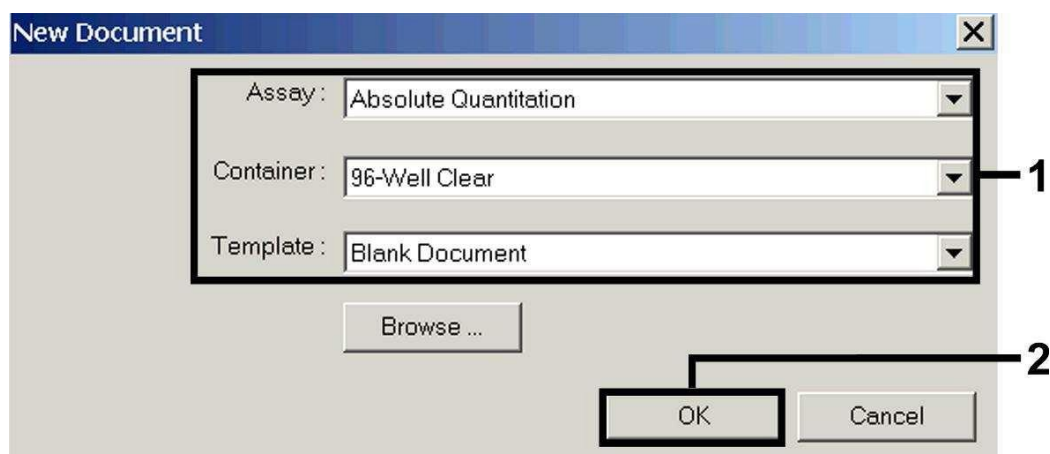


Fig. 3: Ajustes al crear un nuevo ensayo de PCR (*New Document*).

8.5.1.2 Creación/selección de los fluorocromos

La opción *Tools* del submenú *Detector Manager* le permite asignar al ensayo los fluorocromos correspondientes. Para detectar el ADN del HSV así como el *Control interno* con la ayuda del *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*, deben definirse los Reporter/Quencher que aparecen en la siguiente tabla:

Detección	Reporter	Quencher
ADN del HSV1	FAM	none
ADN del HSV2	NED	none
<i>Control interno (HSV TMIC)</i>	VIC	none

Para crear los fluorocromos, seleccione la opción *File* situada en la parte inferior izquierda del *Detector Manager* y a continuación, la opción *New*.

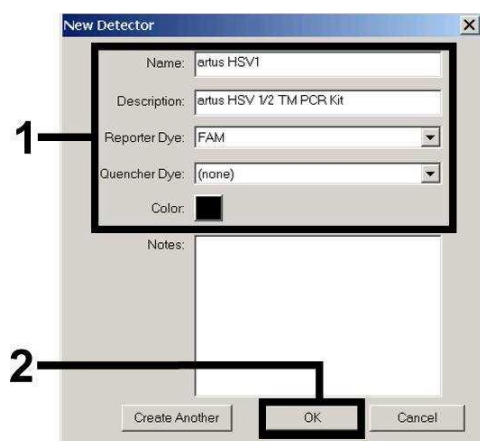


Fig. 4: Creación del fluorocromo específico del HSV1 (*Detector Manager*).

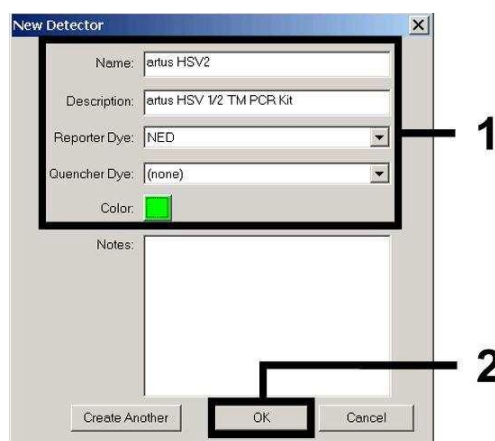


Fig. 5: Creación del fluorocromo específico del HSV2 (*Detector Manager*).

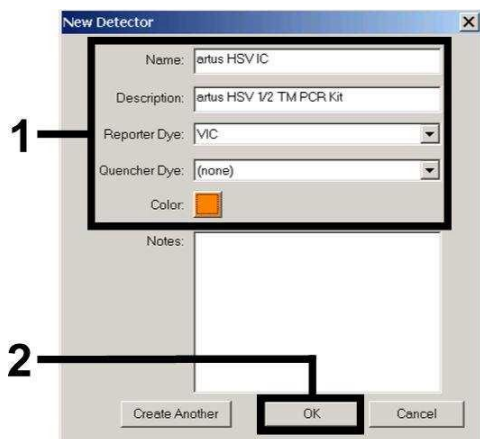


Fig. 6: Creación del fluorocromo específico del Control interno (*Detector Manager*) para el HSV1/HSV2.

Para detectar el ADN del HSV1 y HSV2, defina la combinación Reporter/Quencher **FAM/none** así como **NED/none**, en la ventana que aparece ahora (como se indica en las Fig. 4 - Fig. 6). Para detectar el Control interno seleccione la combinación **VIC/none**. Al confirmar los datos (OK), regresará al *Detector Manager*. Marque los fluorocromos acabados de crear y transfiera cada selección al *Well Inspector* haciendo click sobre la opción *Add to Plate Document* (véase la Fig. 7). Cierre la ventana (*Done*).

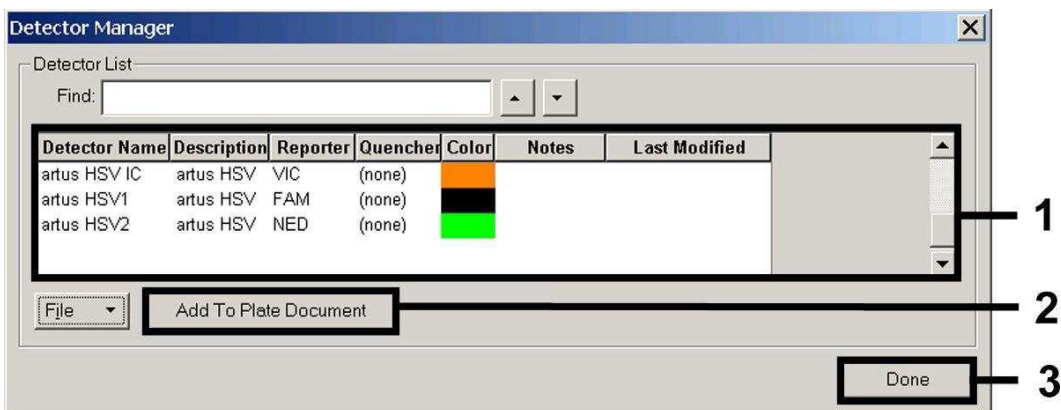


Fig. 7: Selección de los fluorocromos (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Asignación de la información necesaria de los pocillos dentro de la placa

Abra la opción *Well Inspector* del menú *View* para recuperar los fluorocromos seleccionados anteriormente en 8.5.1.2 (véanse las Fig. 8 - Fig. 9).

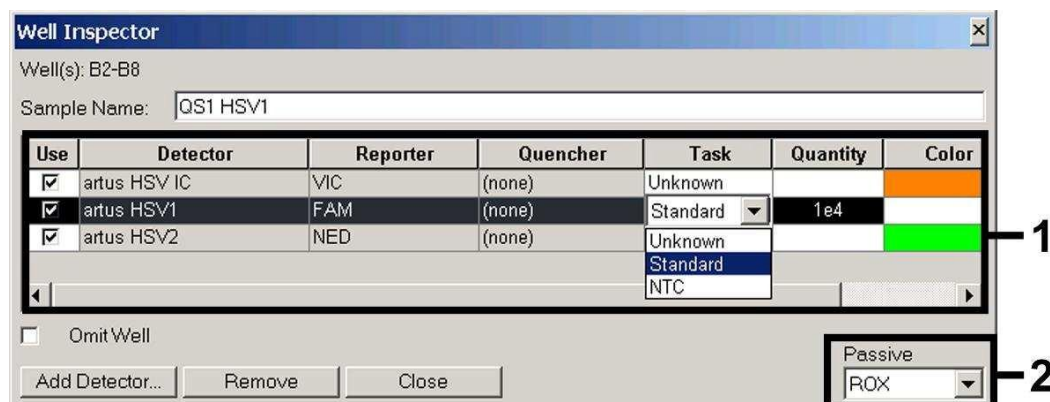


Fig. 8: Asignación de la información necesaria (HSV1) de los pocillos dentro de la placa (*Well Inspector*).

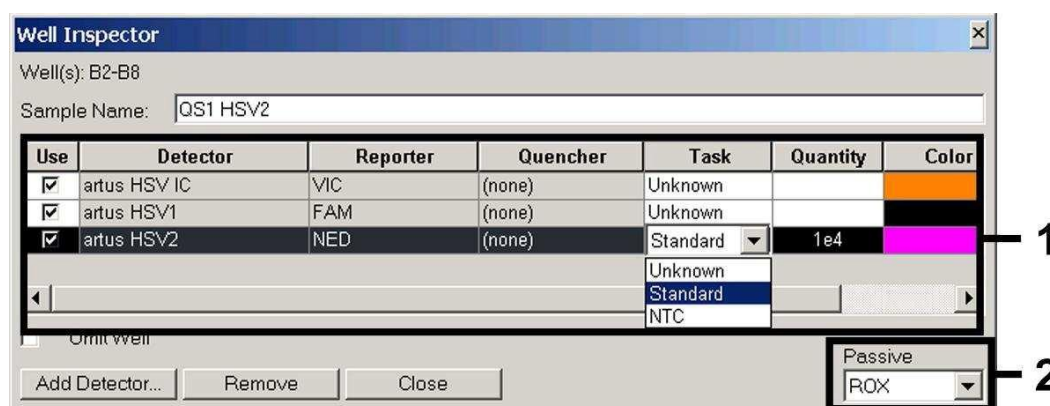


Fig. 9: Asignación de la información necesaria (HSV2) de los pocillos dentro de la placa (*Well Inspector*).

Marque las posiciones ocupadas en la placa para detectar el ADN del HSV. Asigne los fluorocromos seleccionados a estas posiciones haciendo click sobre la opción *Use* de ambos fluorocromos, aparecerá entonces una flechita. Para poner nombre a cada una de las reacciones preparadas, seleccione la posición correspondiente en la placa e introduzca el nombre bajo *Sample Name*. Tenga en cuenta que el software identifica las reacciones ejecutadas

con el mismo nombre (*Sample Name*) y la misma asignación de fluorocromo como réplicas y las promedia según la carga patógena cuantificada. Seleccione para cada tipo de muestra la función correspondiente (*Task*) de acuerdo con la siguiente tabla:

Tipo de muestra	Función (<i>Task</i>)	Concentración (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV1	Reporter HSV2	Quencher
Muestra	Unknown	-	FAM	NED	none
Control negativo	NTC	-	FAM	NED	none
Estándar	Standard	véase 1. Contenido	FAM	NED	none

Para la elaboración de una curva estándar, utilice para cada reacción de PCR todos los *Estándares de cuantificación* suministrados (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* y *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) e introduzca las concentraciones correspondientes (véase **1. Contenido**) para cada uno de los estándares (*Quantity*). Tenga en cuenta que para ejecutar una PCR con el *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* debe introducir **ROX** como referencia pasiva (*Passive Reference*). La distribución uniforme del fluorocromo ROX en todas las preparaciones de la PCR de un lote mezclando la *HSV TM Master*, garantiza el reconocimiento y el cálculo de las variaciones *tube to tube* (diferencias de fluorescencia entre las diferentes reacciones de PCR) mediante el *Sequence Detection Software* (normalización).

8.5.1.4 Creación del perfil de temperatura

Para introducir el perfil de temperatura, cambie el nivel *Setup* del software por el nivel *Instrument*. Introduzca el perfil de temperatura válido para la detección del ADN del HSV de acuerdo con la Fig. 10. Para eliminar el ciclo de temperatura de 50°C almacenado en los ajustes, señálelo pulsando simultáneamente la tecla izquierda del ratón y la tecla *Shift*, y a continuación bórrelo pulsando la tecla *Backspace*. Asegúrese de seleccionar el volumen de reacción a 50 µl. La opción *9600 Emulation* debe estar activada; y los ajustes

del *Auto Increment* deben permanecer inalterados (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

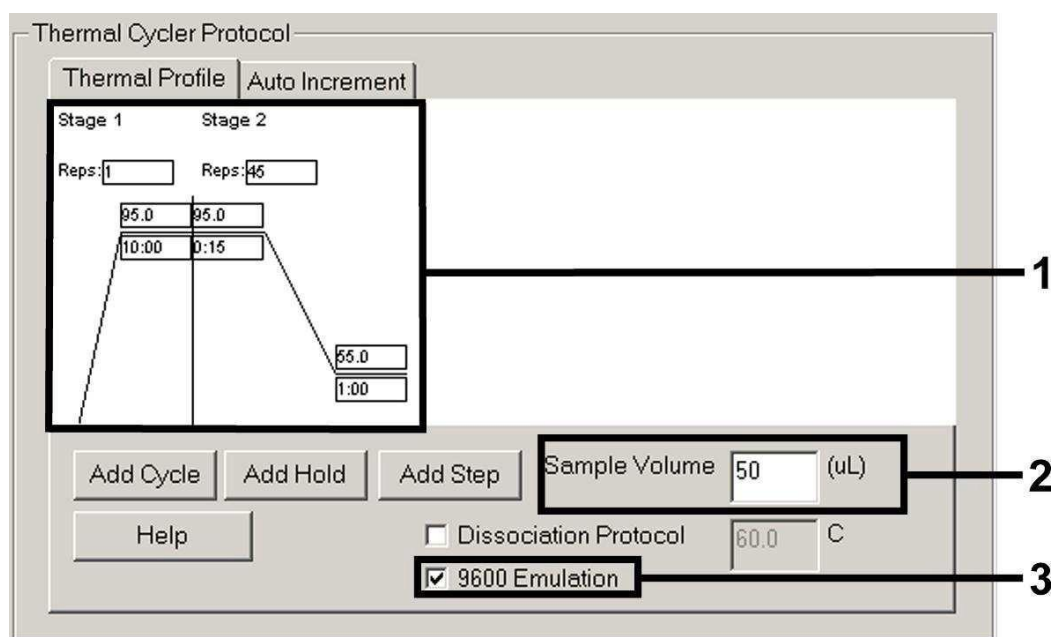


Fig. 10: Creación del perfil de temperatura.

8.5.1.5 Almacenamiento de la reacción de PCR

Llegados a este punto, puede grabar los ajustes introducidos (*Setup*) como moldes (*template*) de PCR y así poder utilizarlos posteriormente, ya sea modificados o sin modificar. Al grabar los ajustes como *SDS Template (*.sdt)* en el *Template Directory* (disco local [C:]\\Program Files\\ABI PRISM 7000\\Templates suministrado por Applied Biosystem), este fichero puede seleccionarse de la lengüeta de opciones de *Template* directamente en la ventana *New Document*. Copias salvadas en otros ficheros deben abrirse con *Browse*. Antes de iniciar la reacción de PCR, recuerde grabarla de nuevo como *SDS Document (*.sds)*. De este modo, se asegura el almacenamiento de los datos que serán recogidos durante el transcurso de la reacción de PCR.

8.5.1.6 Inicio de la reacción de PCR

Para iniciar la PCR, seleccione la opción *Start* del menú *Instrument* o el botón *Start* del nivel *Instrument*.

8.5.2 Programación del ABI PRISM 7900HT SDS

Para detectar el ADN del HSV, cree un perfil en su *ABI PRISM 7900HT SDS* según los seis pasos de trabajo siguientes (8.5.2.1 - 8.5.2.6). Todas las especificaciones hacen referencia a *ABI PRISM 7900HT SDS Software Version 2.1*. Para más información sobre la programación del *ABI PRISM 7900HT SDS*, remítase al manual *ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*. Para una mejor visualización de los ajustes, éstos aparecen resaltados en las ilustraciones mediante un recuadro en negrita.

8.5.2.1 Ajustes al crear un nuevo ensayo de PCR

Seleccione la opción *New* del menú *File* en el *ABI PRISM 7900HT SDS* e introduzca los siguientes ajustes básicos para el nuevo documento (véase la Fig. 11). El ensayo grabado anteriormente (*ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)*) aparece en la lista *Template* o bien puede seleccionarlo mediante la función *Browse* (véase 8.5.2.5 Almacenamiento de la reacción de PCR). Confirme sus datos (OK).

Atención: El *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* no puede utilizarse con el formato de placa de 384-pocillos del *ABI PRISM 7900HT SDS*.

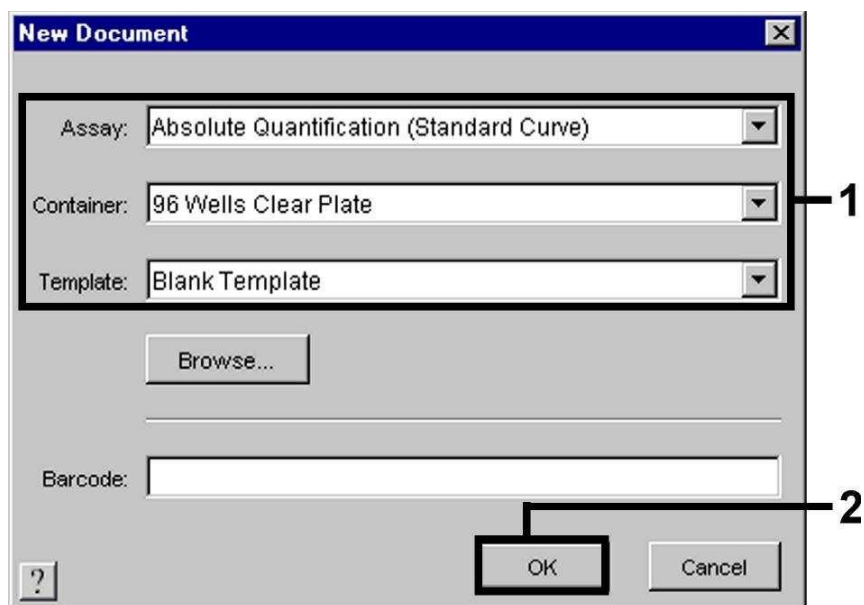


Fig. 11: Preajustes al crear un nuevo ensayo de PCR (*New Document*).

8.5.2.2 Creación/selección de los fluorocromos

Con la ayuda del submenú *Detector Manager* del menú *Tools* (alternativa: función de selección nivel *Setup*/función *Add Detector*) asigne al ensayo los fluorocromos correspondientes. Para detectar el ADN del HSV y el *Control interno* con el *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*, deben definirse los Reporter/Quencher que aparecen en la tabla siguiente:

Detección	Reporter	Quencher
ADN del HSV1	FAM	Non Fluorescent
ADN del HSV2	NED	Non Fluorescent
<i>Control interno (HSV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

Para crear estos fluorocromos, seleccione en la parte inferior izquierda del *Detector Manager*, la opción *New*.

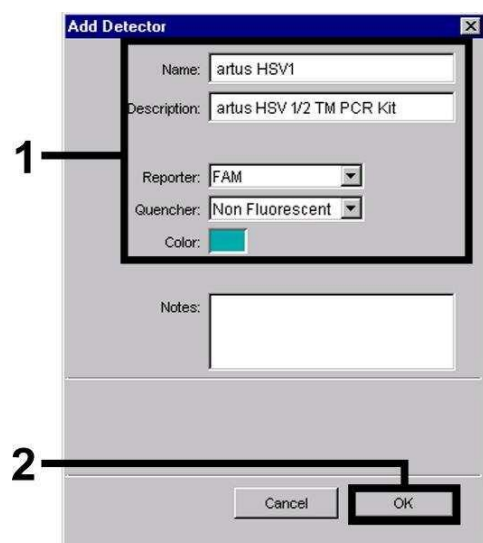


Fig. 12: Creación del fluorocromo específico del HSV1 (*Detector Manager*).

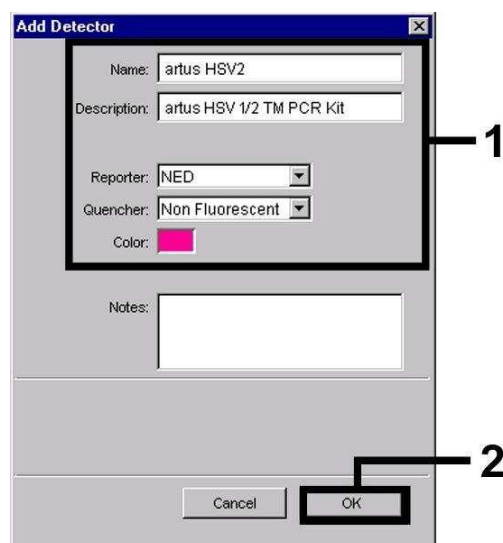


Fig. 13: Creación del fluorocromo específico del HSV2 (*Detector Manager*).

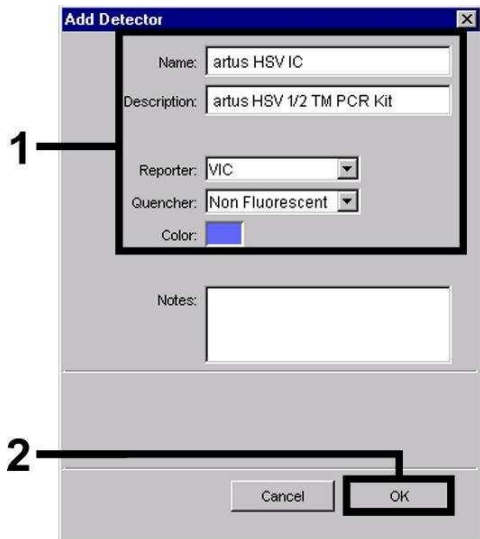


Fig. 14: Creación del fluorocromo específico del *Control interno* (*Detector Manager*) para HSV1/HSV2.

Para detectar el ADN del HSV1 y HSV2, defina la combinación Reporter/Quencher **FAM/Non Fluorescent** así como **NED/Non Fluorescent** en la ventana que aparece ahora (como se indica en las Fig. 12 - Fig. 14). Para detectar el *Control interno* seleccione la combinación **VIC/Non Fluorescent**. Al confirmar los datos (OK), regrese al *Detector Manager*. Marque los fluorocromos recientemente seleccionados y transfiera cada selección al nivel *Setup* haciendo click sobre la opción *Copy to Plate Document* (véase la Fig. 15). Cierre la ventana (*Done*).

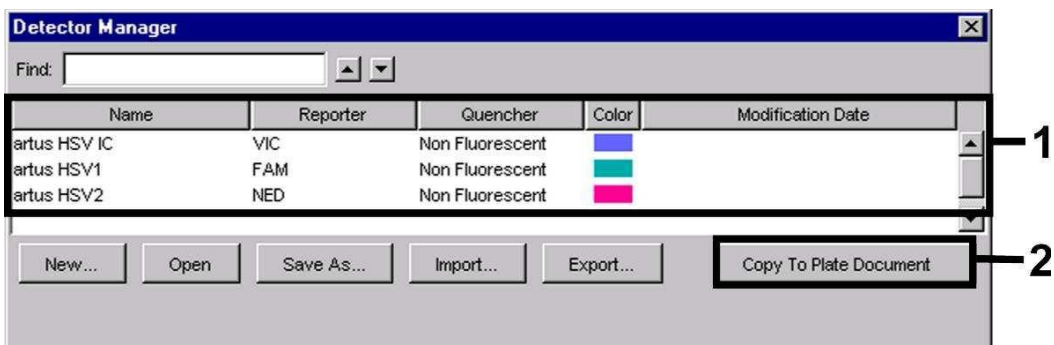


Fig. 15: Selección de los fluorocromos (*Detector Manager*).

8.5.2.3 Asignación de la información necesaria de los pocillos dentro de la placa

Tras cerrar el *Detector Manager (Done)*, podrá visualizar en el nivel *Setup (Well Inspector)* una tabla en la que aparecen listados los fluorocromos previamente seleccionados en 8.5.2.2 (véanse las Fig. 16 - Fig. 17).

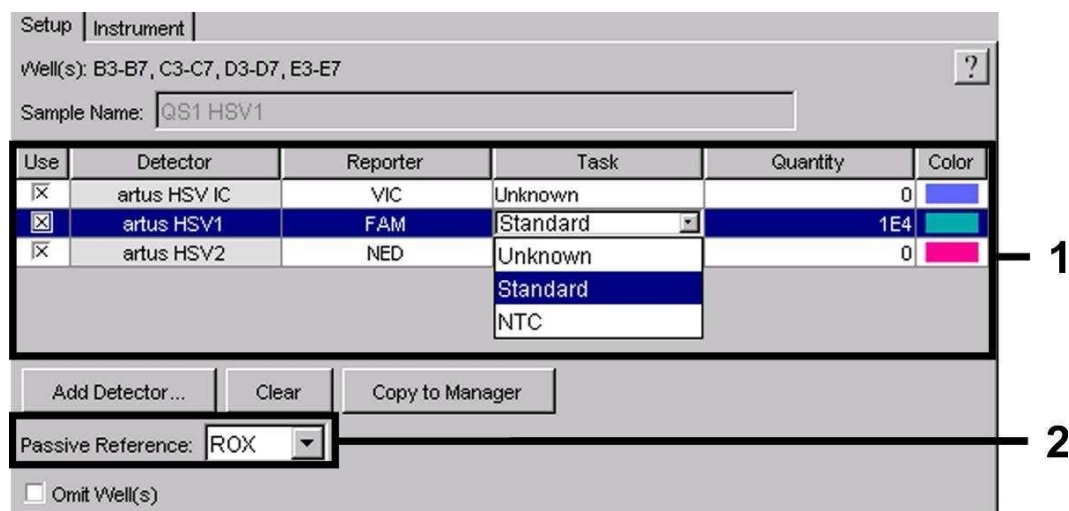


Fig. 16: Asignación de la información necesaria (HSV1) de los pocillos dentro de la placa.

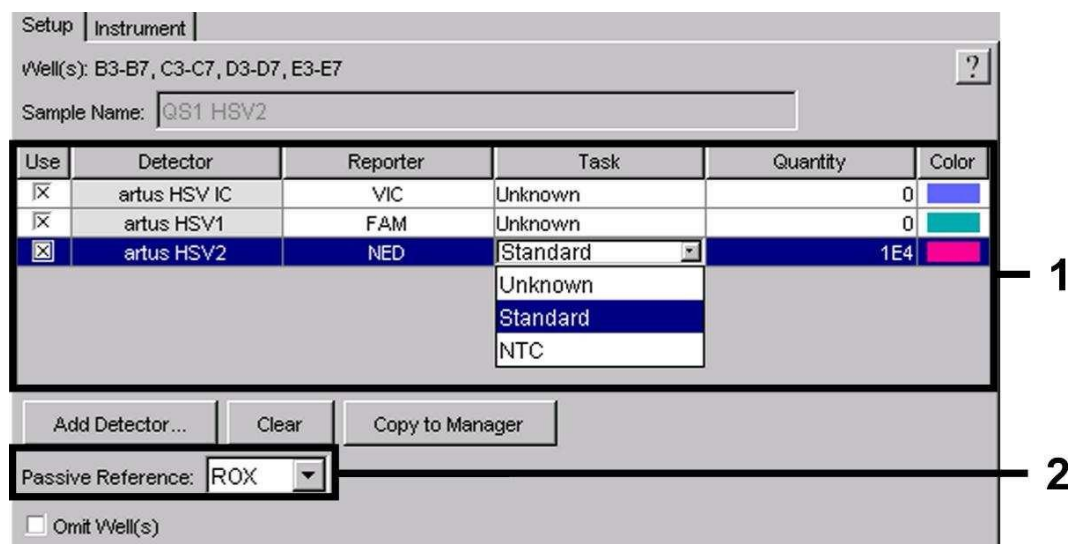


Fig. 17: Asignación de la información necesaria (HSV2) de los pocillos dentro de la placa. Marque las posiciones ocupadas en las placas para detectar el ADN del HSV. Asigne los fluorocromos seleccionados a estas posiciones haciendo click sobre la opción *Use* de ambos fluorocromos, aparecerá entonces una cruz.

Para poner nombre a cada una de las reacciones preparadas, seleccione la posición correspondiente en la placa e introduzca el nombre en *Sample Name*. Tenga en cuenta que el software identifica las reacciones con el mismo nombre (*Sample Name*) y la misma asignación de detector como réplicas y las promedia según la carga patógena cuantificada. Seleccione la función correspondiente (*Task*) para cada tipo de muestra según la tabla siguiente:

Tipo de muestra	Función (<i>Task</i>)	Concentración (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV1	Reporter HSV2	Quencher
Muestra	Unknown	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Control negativo	NTC	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Estándar	Standard	véase 1. Contenido	FAM	NED	Non Fluorescent

Para la elaboración de una curva estándar, utilice para cada reacción de PCR todos los *Estándares de cuantificación* suministrados (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* y *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) e introduzca las concentraciones correspondientes (véase **1. Contenido**) para cada uno de los estándares (*Quantity*). Tenga en cuenta que para ejecutar una reacción de PCR con el *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* debe introducir **ROX** como referencia pasiva (*Passive Reference*). La distribución uniforme del fluorocromo ROX en todas las preparaciones de PCR de un lote mezclando la *HSV TM Master*, garantiza el reconocimiento y el cálculo de las variaciones *tube to tube* (diferencias de fluorescencia entre diferentes reacciones de PCR) mediante el *Sequence Detection Software* (normalización).

8.5.2.4 Creación del perfil de temperatura

Para introducir el perfil de temperatura, cambie el nivel *Setup* del software por el nivel *Instrument*. Introduzca el perfil de temperatura válido para detectar el ADN del HSV de acuerdo con la Fig. 18. Asegúrese de seleccionar el volumen de reacción a 50 μl . La opción *9600 Emulation* debe estar activada; el tiempo *Ramp* y el *Auto Increment* no se modifican (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

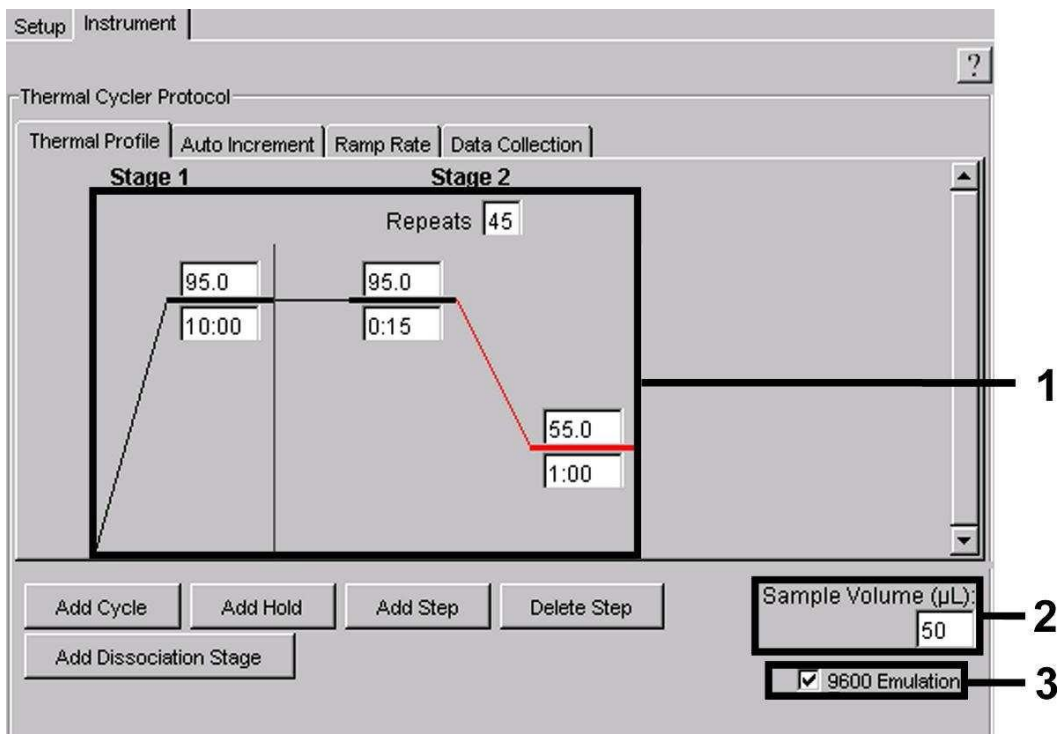


Fig. 18: Creación del perfil de temperatura.

Además, en el nivel *Instrument* se halla la opción *Data Collection*. Al seleccionar esta opción, llegará a la ventana representada en la Fig. 19. Cada temperatura *Ramp* y *Plateau* consta de un símbolo de recogida de datos (*Data Collection Icon*), que permite una mejor visualización de los datos recogidos hasta ese momento. Elimine haciendo click con el ratón todos los símbolos con excepción del símbolo del paso *Annealing-Extension* (*Stage2/Step2*) y así evitar mediciones de fluorescencia innecesarias. De esta manera se reduce al mínimo la duración de las mediciones y la cantidad de datos generados.

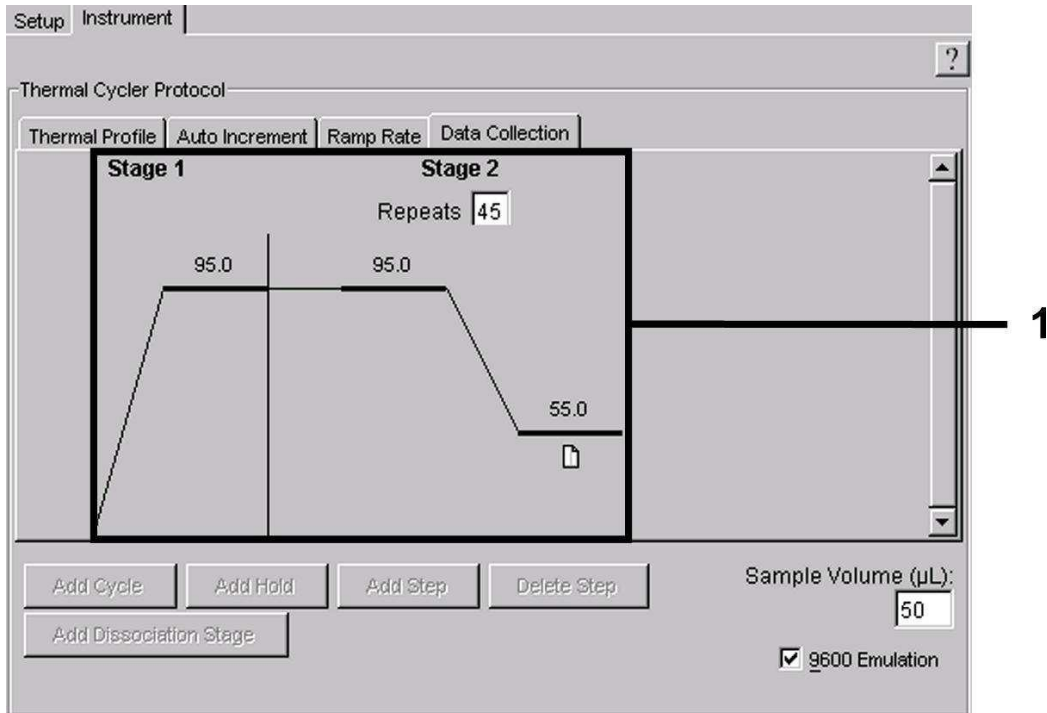


Fig. 19: Recogida de datos (*Data Collection*).

8.5.2.5 Almacenamiento de la reacción de PCR

Llegados a este punto, puede guardar los ajustes introducidos (*Setup*) como molde (template) de PCR y así poder utilizarlos posteriormente, ya sea modificados o sin modificar. Al grabar los ajustes como documento *ABI PRISM® SDS Template Document (*.sdt)* en el *Template Directory* ([D:]*Program Files\ Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates*, suministrado por Applied Biosystem), este fichero puede seleccionarse de la lista *Template* directamente en la ventana *New Document*. Los datos grabados en otras carpetas deben abrirse con *Browse*. Antes de iniciar la reacción de PCR, recuerde grabarla de nuevo como documento *ABI PRISM® SDS Document (*.sds)*. De este modo, se asegura el almacenamiento de los datos que serán recogidos durante el transcurso de la reacción de PCR.

8.5.2.6 Inicio de la reacción de PCR

Para iniciar la reacción de PCR, seleccione la opción *Start* del menú *Instrument*.

9. Análisis

Al poner en funcionamiento el aparato, es imprescindible realizar una calibración válida de los fluorocromos (*Pure Spectra Component File*) y del fondo (*Background Component File*). Estos archivos de calibración son indispensables para que el software realice un cálculo exacto de los resultados del siguiente modo:

Todas las señales de interferencia condicionadas por el aparato que influyen en la medición, son eliminadas por todos los *Sequence Detection Software* del *ABI PRISM Sequence Detection Systems* con ayuda de los archivos *Background Component Files*.

Además, en los análisis con diferentes fluorocromos se producen interferencias entre los espectros de emisión de cada uno de los fluorocromos. El software del *ABI PRISM SDS* compensa estas interferencias mediante el cálculo de los datos espectrales de cada uno de los fluorocromos almacenados en el archivo *Pure Spectra Component File*. La asignación de los datos de fluorescencia, recogidos durante todo el espectro de medición, en el transcurso de la reacción de PCR a los fluorocromos seleccionados, la realiza el software con ayuda de los *Pure Spectra Components*. Los datos de fluorescencia de cada fluorocromo son a continuación divididos para la señal de la referencia pasiva (ROX), para calcular las variaciones *tube to tube* (diferencias en la fluorescencia entre las diferentes muestras de PCR). Las señales normalizadas de este modo, pueden ser analizadas con la ayuda del *Amplification Plot*.

Los ficheros de calibración utilizados para el análisis de una reacción de PCR son grabados automáticamente durante el almacenamiento del transcurso de la reacción. Si no se instala ningún **fichero de calibración**, cree estos ficheros tal y como se indica en las instrucciones del manual *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Si debe integrar más de un sistema *artus*™ PCR al mismo tiempo (**tenga en cuenta el perfil de temperatura**), analice los ensayos, por separado. El *ABI PRISM*® 7000 y 7900HT SDS Software identifica las muestras con el

mismo nombre (*Sample Name*) y la misma asignación de detector como réplicas y las promedia según la carga patógena cuantificada.

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal fluorescente FAM para el HSV1 o una señal fluorescente NED para el HSV2.

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

En este caso, la detección de la señal fluorescente VIC (*Control interno*) es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ADN del HSV (señal fluorescente positiva FAM para el HSV1 o señal fluorescente positiva NED para el HSV2) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del *Control interno* VIC. Esto se debe a fenómenos de competencia.

2. No se detecta ninguna señal fluorescente FAM para el HSV1 ni señal fluorescente NED para el HSV2; sino sólo se detecta una señal fluorescente VIC (señal del *Control interno*).

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

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

3. No se detecta señal fluorescente FAM para el HSV1, ni señal fluorescente NED para el HSV2, ni señal fluorescente VIC.

No es posible realizar el diagnóstico.

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

10. Solución de problemas.

Puede hallar ejemplos de reacciones de PCR negativas y positivas en las figuras 20 / 23 (*ABI PRISM 7000 SDS*) y 24 / 27 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).

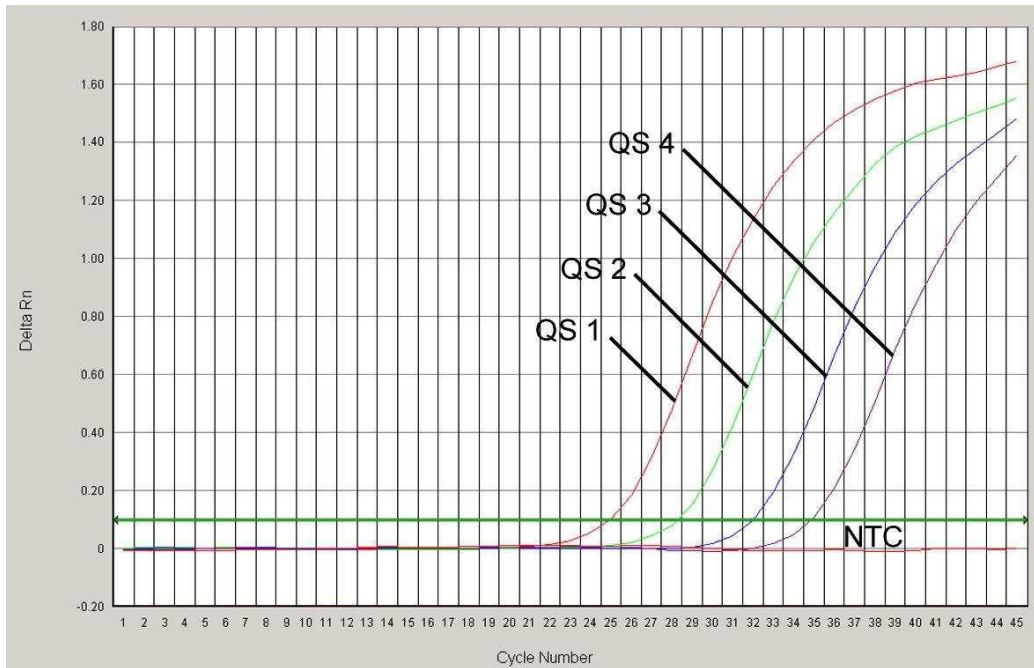


Fig. 20: Detección de los Estándares de cuantificación (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4) mediante la detección de una señal fluorescente FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: non-template control (control negativo).

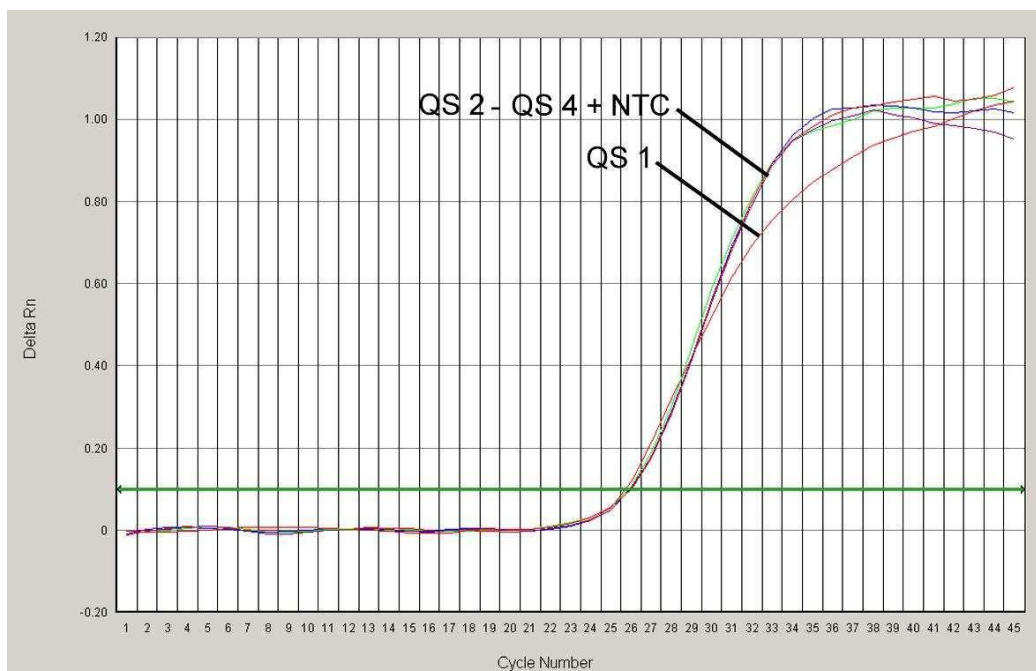


Fig. 21: Detección del Control interno (IC) mediante la detección de una señal fluorescente VIC (ABI PRISM 7000 SDS) con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

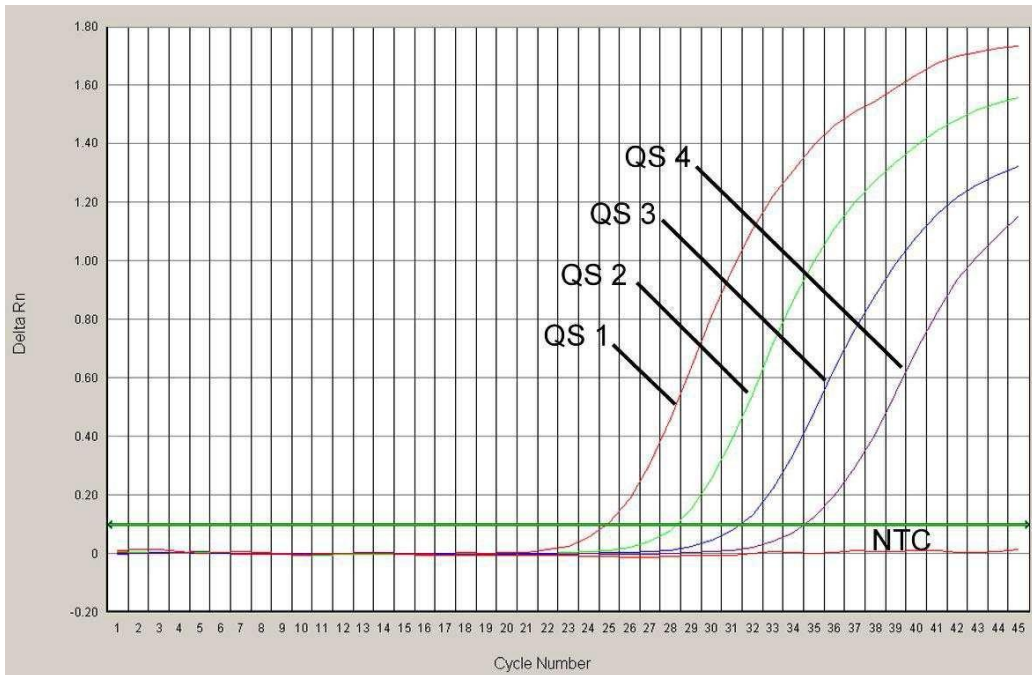


Fig. 22: Detección de los Estándares de cuantificación (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) mediante la detección de una señal fluorescente NED (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (control negativo).



Fig. 23: Detección del Control interno (IC) mediante la detección de una señal fluorescente VIC (*ABI PRISM 7000 SDS*) con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (control negativo).

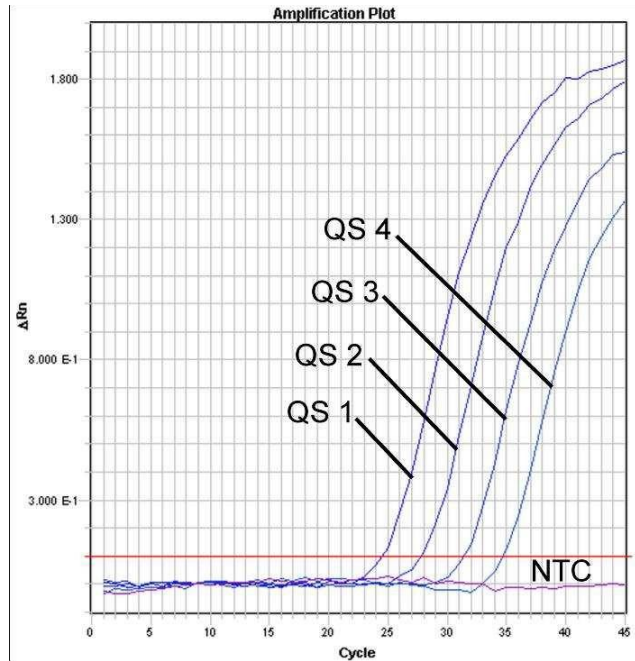


Fig. 24: Detección de los Estándares de cuantificación (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4) mediante la detección de una señal fluorescente FAM (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (control negativo).

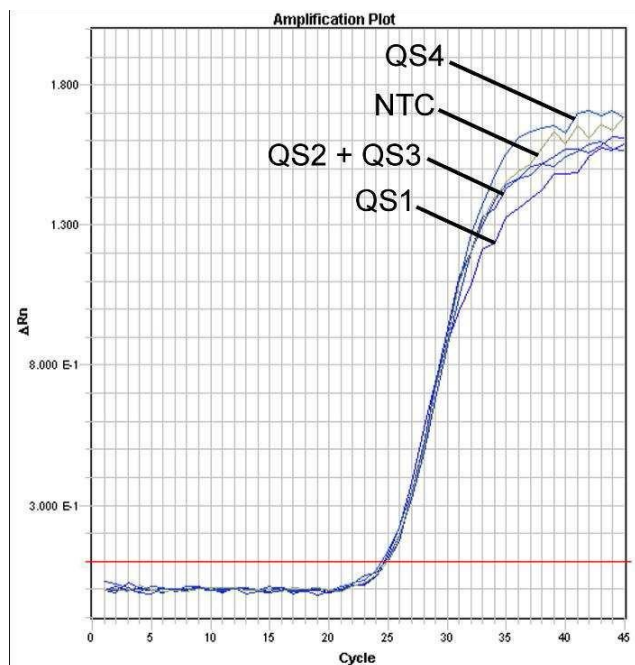


Fig. 25: Detección del Control interno (IC) mediante la detección de una señal fluorescente VIC (*ABI PRISM 7900HT SDS*) con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

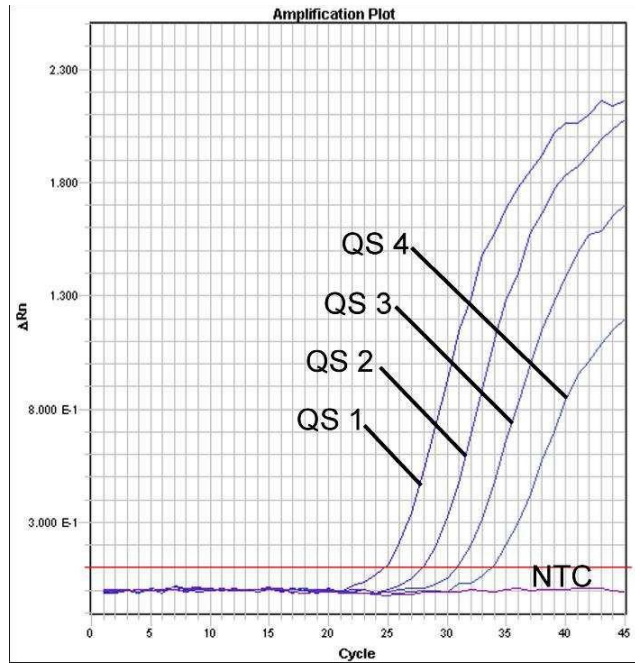


Fig. 26: Detección de los Estándares de cuantificación (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4) mediante la detección de una señal fluorescente NED (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (control negativo).

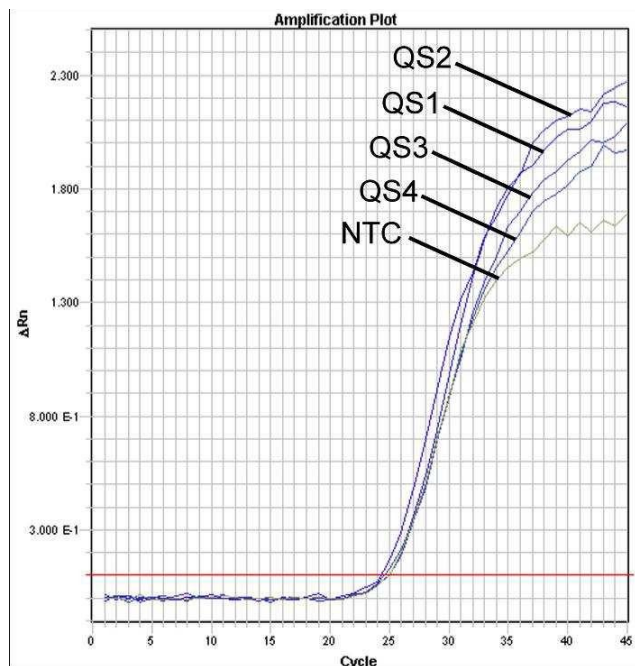


Fig. 27: Detección del Control interno (IC) mediante la detección de una señal fluorescente VIC (*ABI PRISM 7900HT SDS*) con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

10 Solución de problemas

Ausencia de señal fluorescente FAM para HSV1 y NED para HSV2 en los controles positivos (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 y HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4):

- La selección de los canales fluorimétricos para el análisis de la PCR no se corresponde con el protocolo.
 - ◆ Seleccione el canal fluorimétrico FAM para el análisis de la PCR del HSV1 y NED para HSV2 y el canal fluorimétrico VIC para la PCR del *Control interno*.
- Los ajustes utilizados para el análisis de datos en *Options (Extension Phase Data Extraction)* no se corresponden a los ajustes en *Data Collection* (véase **8.5.2.4 Creación del perfil de temperatura** para el *ABI PRISM 7900HT SDS*).
 - ◆ Analice el ensayo de PCR con los ajustes correspondientes y repita el análisis de los datos (*Analysis*).
- La programación del perfil de temperatura en los *ABI PRISM Sequence Detection System* no se llevó a cabo correctamente.
 - ◆ Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.5 Programación del ABI PRISM SDS**).
- 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 HSV-1/2 TM 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* (señal fluorescente VIC) con ausencia simultánea de una señal fluorescente FAM del HSV1 y de una señal fluorescente NED del HSV2 de la PCR específica del HSV:

- 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 de 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 HSV-1/2 TM 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.

Una señal fluorescente FAM para HSV1 y NED para HSV2 de la PCR analítica en los controles negativos:

- Se produjo una contaminación durante la preparación de la PCR.
 - ❖ Repita de nuevo la PCR con componentes nuevos y realice réplicas.
 - ❖ Cierre los pocillos/ tubos lo antes posible después de haber pipeteado las muestras a analizar.

- ◆ Pipetee los controles positivos en último lugar.
- ◆ Asegúrese de 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 de 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 HSV-1/2 TM PCR Kit* se prepararon diluciones seriadas de un estándar de 25,7 a nominal 0,008 de copias equivalentes*/ μl del HSV1 y 35,31 a nominal 0,012 copias equivalentes*/ μl del HSV2. A continuación, se analizó mediante los *ABI PRISM 7000* y *7900HT Sequence Detection Systems* con la ayuda de *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*. Los ensayos para cada aparato se realizaron por octuplicado en tres días diferentes. Los resultados se determinaron mediante un análisis Probit cuyo análisis gráfico (*ABI PRISM 7900HT*) se muestra en la Fig. 28-Fig. 29.

Límite de detección ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM</i> [®] 7000 SDS (HSV1)	0,9 copias/ μl
<i>ABI PRISM</i> [®] 7000 SDS (HSV2)	0,5 copias/ μl
<i>ABI PRISM</i> [®] 7900HT SDS (HSV1)	1,8 copias/ μl
<i>ABI PRISM</i> [®] 7900HT SDS (HSV2)	2,0 copias/ μl

Esto significa que hay un 95 % de posibilidades de detectar 0,9 copias/ μl del HSV1 y 0,5 copias/ μl del HSV2 (*ABI PRISM*[®] 7000 SDS) y 1,8 copias/ μl del HSV1 y 2,0 copias/ μl del HSV2 (*ABI PRISM*[®] 7900HT SDS).

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

Análisis Probit: HSV1 (ABI PRISM 7900HT SDS)

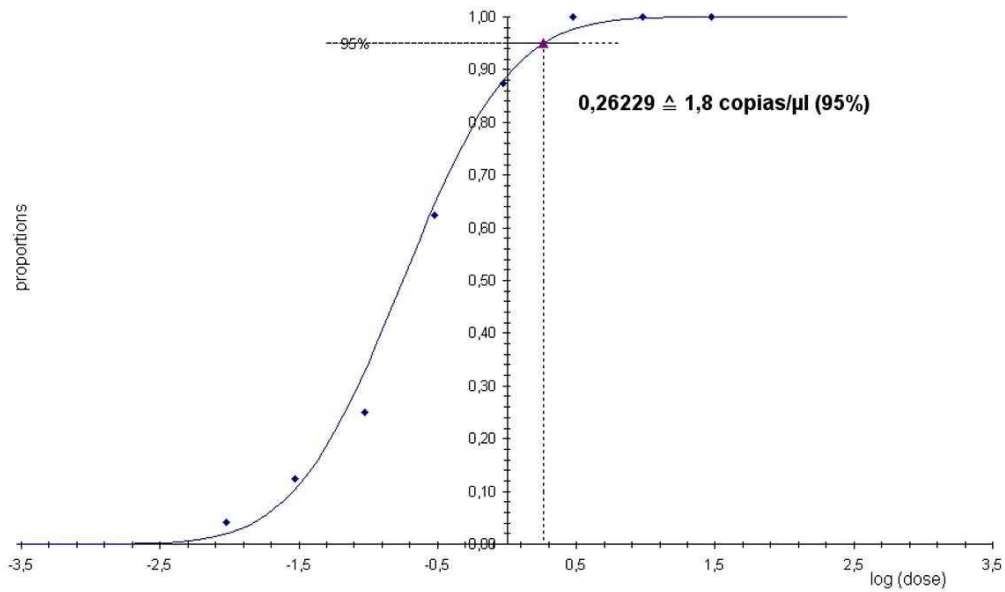


Fig. 28: Sensibilidad analítica para el HSV1 del artus HSV- 1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

Análisis Probit: HSV2 (ABI PRISM 7900HT SDS)

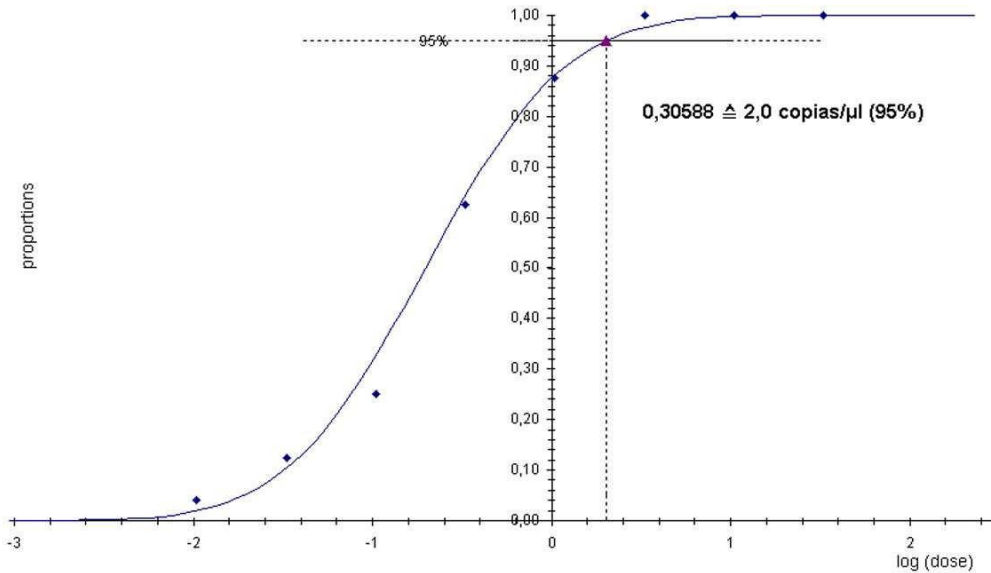


Fig. 29: Sensibilidad analítica para el HSV2 del artus HSV- 1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

11.2 Especificidad

La esmerada selección de los cebadores y sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit. Los cebadores y sondas se controlaron mediante un análisis de comparación de secuencias, en cuanto a posibles homologías con otras secuencias publicadas en diferentes bases de datos. La detectabilidad de todos las cepas relevantes está garantizada.

Para determinar la ausencia de reactividad cruzada del *artus* HSV-1/2 TM 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 reactividad cruzada del kit con diferentes patógenos.

Grupo de control	HSV-1/2 (FAM/NED)	Control interno (VIC)
Herpesvirus humano tipo 3 (Virus varicela-zoster)	-	+
Herpesvirus humano tipo 4 (Virus Epstein-Barr)	-	+
Herpesvirus humano tipo 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Herpesvirus humano tipo 6A	-	+
Herpesvirus humano tipo 6B	-	+
Herpesvirus humano tipo 7	-	+
Herpesvirus humano tipo 8	-	+
Virus de la Hepatitis A	-	+
Virus de la Hepatitis B	-	+
Virus de la Hepatitis C	-	+
Virus de la inmunodeficiencia humana	-	+
Virus humano de la leucemia de células T tipo 1 y 2	-	+
Virus del Nilo Occidental	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

11.3 Precisión

Los datos de precisión para el *artus* HSV-1/2 TM 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 el *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit utilizando el *Estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 4; 10 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*, véase la Tabla 2/Tabla 4). Del mismo modo los datos de precisión de los resultados cuantitativos en copias/ μ l fueron determinados usando los valores de Ct correspondientes (véase la Tabla 3/Tabla 5). Acorde con estos resultados, la dispersión total de una muestra cualquiera de concentración dada es 2,62 % (Ct, HSV1) y 2,07 % (Ct, HSV2) o 14,02 % (concentración, HSV1) y 14,82 % (concentración, HSV2). En el caso de la detección del *Control interno* es 1,84 % (Ct, HSV1) y 1,92 % (Ct, HSV2). Estos valores se basan en el conjunto de todos los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 2: Datos de precisión para el HSV1 basados en los valores de Ct.

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: HSV1 LC/RG/TM	0,18	0,03	0,51
Variabilidad intra-ensayo: Control interno	0,24	0,06	0,87
Variabilidad inter-ensayo: HSV1 LC/RG/TM QS 4	0,25	0,06	0,70
Variabilidad inter-ensayo: Control interno	0,37	0,14	1,36
Variabilidad inter-lotes: HSV1 LC/RG/TM QS 4	0,23	0,05	0,67
Variabilidad inter-lotes: Control interno	0,17	0,03	0,65
Varianza total: HSV1 LC/RG/TM QS 4	0,92	0,84	2,62
Varianza total: Control interno	0,49	0,24	1,84

Tabla 3: Datos de precisión para HSV1 basados en los valores cuantitativos (en copias/ μ l).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: HSV1 LC/RG/TM	1,32	1,75	13,12
Variabilidad inter-ensayo: HSV1 LC/RG/TM QS 4	1,60	2,56	15,81
Variabilidad inter-lotes: HSV1 LC/RG/TM QS 4	1,22	1,50	12,14
Varianza total: HSV1 LC/RG/TM QS 4	1,42	2,00	14,02

Tabla 4: Datos de precisión para HSV2 basados en los valores de Ct.

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: HSV2 LC/RG/TM	0,17	0,03	0,49
Variabilidad intra-ensayo: Control interno	0,10	0,01	0,37
Variabilidad inter-ensayo: HSV2 LC/RG/TM QS 4	0,23	0,05	0,68
Variabilidad inter-ensayo: Control interno	0,30	0,09	1,10
Variabilidad inter-lotes: HSV2 LC/RG/TM QS 4	0,24	0,06	0,74
Variabilidad inter-lotes: Control interno	0,25	0,06	0,93
Varianza total: HSV2 LC/RG/TM QS 4	0,70	0,49	2,07
Varianza total: Control interno	0,52	0,27	1,92

Tabla 5: Datos de precisión para HSV2 basados en los valores cuantitativos (en copias/ μ l).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: HSV2 LC/RG/TM QS 4	1,44	2,06	14,25
Variabilidad inter-ensayo: HSV2 LC/RG/TM QS 4	1,60	2,56	15,80
Variabilidad inter-lotes: HSV2 LC/RG/TM QS 4	1,48	2,18	14,62
Varianza total: HSV2 LC/RG/TM QS 4	1,50	2,25	14,82

11.4 Robustez

El análisis de la robustez permite la determinación de la tasa de error total del *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit. 30 muestras distintas de líquido cefalorraquídeo negativas para el HSV fueron mezcladas con 5,4 copias/ μ l por volumen de elución del ADN control de HSV1 (tres veces la concentración del límite de sensibilidad). Tras la purificación usando QIAamp DNA Mini Kit (ver capítulo

8.1 Purificación del ADN) las muestras fueron analizadas con el *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*. De la misma forma se llevó a cabo un estudio para el HSV2 (30 muestras de líquido cefalorraquídeo; 6 copias/ μ l por volumen de elución del ADN control de HSV2). Para todas las muestras del HSV1 y HSV2 la tasa de error fue del 0 %. La robustez del *Control interno* fue comprobado adicionalmente mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para el HSV. La tasa de error total fue del 0 %. No se detectaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* es de ≥ 99 %.

11.5 Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad sirven para una valorización regular del rendimiento del *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*, así como para su comparación con otros productos. Estos datos se obtienen mediante la participación en ensayos de intercomparación.

11.6 Evaluación diagnóstica

El *artus HSV-1/2 TM 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.
- 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* HSV-1/2 TM 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* HSV-1/2 TM 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>
Mg-Sol	<i>Solución de magnesio</i>

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Marcas comerciales y cláusulas de exclusión

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); AB/ PR/SM®, GeneAmp® (Life Technologies Corporation).

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 HSV-1/2 TM PCR Kit, el BioRobot EZ1 DSP Workstation, y 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

