

# artus<sup>®</sup> SARS RG RT-PCR Kit

## Manual de uso



24 (Nr. cat. 4511263)

Diagnóstico cuantitativo in vitro

para utilizar con el artus<sup>™</sup> 3000 y el Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000

Versión 1



4511263



1046936ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

**MAT**

1046936ES



## **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](http://www.qiagen.com).

## Índice

<b>1. Contenido .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Almacenamiento .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Medidas generales de seguridad .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Información acerca del agente patógeno .....</b>	<b>10</b>
<b>6. Principio de la PCR a tiempo real .....</b>	<b>11</b>
<b>7. Descripción del producto .....</b>	<b>11</b>
<b>8. Protocolo .....</b>	<b>12</b>
8.1 Preanálisis: Toma, almacenamiento y transporte de las muestras.....	12
8.2 Purificación del ARN .....	13
8.3 Control interno .....	15
8.4 Cuantificación .....	16
8.5 Preparación de la PCR .....	18
8.6 Programación del <i>artus 3000</i> y del <i>Rotor-Gene 3000</i> .....	22
<b>9. Análisis.....</b>	<b>23</b>
<b>10. Solución de problemas.....</b>	<b>25</b>
<b>11. Especificaciones.....</b>	<b>27</b>
11.1 Sensibilidad analítica .....	27
11.2 Especificidad .....	28
11.3 Precisión.....	29
11.4 Robustez.....	30

11.5 Reproducibilidad.....	30
11.6 Evaluación diagnóstica.....	30
<b>12. Limitaciones en la utilización del producto .....</b>	<b>31</b>
<b>13. Información de seguridad.....</b>	<b>31</b>
<b>14. Control de calidad.....</b>	<b>31</b>
<b>15. Bibliografía .....</b>	<b>31</b>
<b>16. Explicación de los símbolos.....</b>	<b>32</b>

## artus SARS RG RT-PCR Kit

Para utilizar con el artus 3000 así como con el Rotor-Gene 3000\*.

### 1. Contenido

	Rotulado y contenido	Art. No. 4511263 24 reacciones
Azul	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Rojo	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 <sup>ix</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rojo	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 <sup>ix</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rojo	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 <sup>ix</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Rojo	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 <sup>ix</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Verde	SARS-CoV LC/RG/TM IC <sup>ix</sup>	1 x 1.000 μl
Blanco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

<sup>ix</sup> QS = Estándar de cuantificación

IC = Control interno

### 2. Almacenamiento

Los componentes del artus SARS RG RT-PCR Kit deben almacenarse a una temperatura entre -30 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.

---

\* El artus SARS RG RT-PCR Kit puede utilizarse también con el Rotor-Gene™ 2000.

### 3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco
- Kit de purificación del ARN (véase 8.2 Purificación del ARN)
- Pipetas (graduables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vortex
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *artus 3000* o *Rotor-Gene 3000*
- Tubos de PCR de 0,1 ml para usar con el rotor de 72-pocillos (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, nr. cat.: 4699982; 0.1 ml tubes, Corbett Research, nr. cat.: ST-1001)
- Alternativa: tubos de PCR de 0,2 ml para usar con el rotor de 36-pocillos (por ejemplo, 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, nr. cat.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, nr. cat.: SE-1003F)
- Bloque de refrigeración (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, nr. cat.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, nr. cat.: 3001-008/3001-009)

### 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, deben mezclarse los componentes a conciencia y centrifugarlos brevemente.
- Inmediatamente, se debe trabajar en hielo o en el bloque de refrigeración (72/96 well loading block).



## 5. Información acerca del agente patógeno

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae* y son virus grandes con envoltura y ARN de cadena positiva que causan enfermedades altamente virulentas en el hombre y en los animales domésticos. Dos coronavirus humanos hasta ahora conocidos son los responsables de un tercio de los resfriados comunes así como de infecciones nosocomiales de las vías respiratorias altas en bebés prematuros.

Un nuevo miembro de la familia de los coronavirus es el causante del síndrome agudo respiratorio severo ("Severe Acute Respiratory Syndrome", SARS). En el Bernhard-Nocht-Institut para medicina tropical de Hamburgo se identificó mediante PCR un fragmento del gen de la polimerasa del virus SARS-Coronavirus (SARS-CoV) en un paciente, gracias a la colaboración de algunos laboratorios. En base a este ensayo, se desarrolló un sistema comercial Real-Time RT-PCR para la detección directa del SARS-Coronavirus (SARS-CoV). La PCR puede detectar material genético del SARS-CoV en diferentes muestras (sangre, secreciones de las vías respiratorias o tejidos).

### **Análisis de los resultados de la prueba**

**Importante:** Tenga en cuenta las advertencias oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), consulte en internet la siguiente dirección: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

**Resultados positivos de la prueba:** Un resultado positivo de la prueba SARS-CoV indica que existe una infección con el SARS-CoV, aún cuando el paciente no presente síntomas típicos del SARS.

**Resultados negativos de la prueba:** Un resultado negativo en la prueba SARS-CoV no significa que el paciente no esté infectado con el virus SARS. Las causas de que los resultados de la prueba sean negativos en un paciente con sintomatología de SARS, pueden ser:

- En el momento de la toma de la muestra el virus no se encontraba en la misma (no está claro aún, en qué momento de la patogénesis del SARS-CoV, éste puede ser detectable en una determinada muestra).
- El paciente puede mostrar síntomas semejantes a los del SARS, que son causados por otro agente patógeno.

## 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 SARS RG RT-PCR Kit* es un sistema listo para utilizar e indicado para la detección del ADN del SARS-CoV mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000*. La *SARS-CoV RG/TM Master* contiene reactivos y enzimas para la amplificación reversa específica de un fragmento de 92 pb del genoma del SARS-CoV, así como para la detección inmediata del amplificado en el canal de fluorescencia Cycling A.FAM del *artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*. Además, el *artus SARS RG RT-PCR Kit* contiene un segundo sistema de amplificación heterólogo para comprobar si se produce inhibición de la PCR. Esto se detecta como *Control interno (IC)* en el canal de fluorescencia Cycling A.JOE. Con lo cual, el

límite de detección de la RT-PCR analítica del SARS-CoV no queda afectado (véase 11.1 **Sensibilidad analítica**). Se suministran controles positivos externos (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) que permiten determinar la carga patógena. Para más información al respecto, véase al apartado

8.4 Cuantificación.

## 8. Protocolo

### 8.1 Preanálisis: Toma, almacenamiento y transporte de las muestras

**Atención:** Todas las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas.

**Importante:** Los datos existentes hasta el momento indican que el esputo es el tipo de muestra más adecuada para la detección del SARS-CoV. Por lo tanto, le recomendamos la utilización de este tipo de muestra con el *artus* SARS RG RT-PCR Kit

La validación interna del *artus* SARS RG RT-PCR Kit se realizó con muestras de suero. Otras muestras como esputo, lavado bronquioalveolar, lavado nasofaríngeo, hisopado y tejido pulmonar no se han validado aún por completo. Utilice tan sólo los kits de purificación de ARN recomendados (véase 8.2 **Purificación del ARN**).

Para determinadas muestras deben tenerse en cuenta las indicaciones especiales para la toma, el almacenamiento y el transporte de las mismas.

**Atención:** Preste atención también a las advertencias oficiales de la OMS en la siguiente página de Internet: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

#### 8.1.1 Toma de las muestras

Para la toma de hisopos utilice los siguientes materiales:

Utilice sólo hisopos con puntas de Dacrón® o rayón con mangos de plástico.

No utilice hisopos con mangos de madera o de aluminio.

### **8.1.2 Almacenamiento de las muestras**

*La eficacia del ensayo puede disminuir por la congelación rutinaria o por un almacenamiento prolongado de las muestras.*

Las muestras deben ser almacenadas a temperaturas entre los 2 - 8°C. (Si los hisopados deben enviarse a un laboratorio de diagnóstico, éstos deben enviarse lo antes posible tras la toma y de acuerdo con las indicaciones del laboratorio para el transporte de muestras de SARS-CoV).

Los hisopos que no pueden ser analizados inmediatamente tras el ingreso al laboratorio, deben almacenarse a una temperatura de entre los 2 - 8°C y procesarse el mismo día. Los hisopos que no puedan procesarse ese día ni al día siguiente de la toma, deben almacenarse a temperaturas de -20°C o a temperaturas inferiores y deben ser analizados dentro de los 30 días después de la fecha de la toma de la muestra.

### **8.1.3 Transporte de las muestras**

Los hisopos deben transportarse refrigerados.

Si los hisopos deben enviarse a un laboratorio de análisis, éstos deben enviarse lo antes posible tras la toma de acuerdo con las indicaciones del laboratorio para el transporte de muestras bajo refrigeración. Las muestras deben enviarse según las disposiciones locales y estatales para el transporte de sustancias infecciosas.\*

## **8.2 Purificación del ARN**

Diversos fabricantes ofrecen kits de purificación del ARN. 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
Espudo, suero, LBA, lavado nasofaríngeo,	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	incluido
	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	no incluido

En caso de que la muestra sea esputo, tenga en cuenta por favor, la siguiente recomendación: Para preparar la muestra, mézclela en un tubo de reacción a igual proporción con una solución de NaCl al 0,9 % que contenga 1 % de N-Acetilcisteína (Sigma Art. No. A8199); por ejemplo, 300  $\mu$ l de esputo + 300  $\mu$ l de la mezcla de NaCl. Después de incubar la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente, añada 140  $\mu$ l del lisado al siguiente pasode purificación del ARN con el QIAamp Viral RNA Mini Kit y siga lasinstrucciones del fabricante.

- 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 Viral RNA Mini 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  $\mu$ l del tampón de elución del kit escogido (concentración final 1  $\mu$ g/ $\mu$ 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).

---

\* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

- b. Antes de empezar cada purificación, una mezcla de tampón de lisis y carrier de ARN (así como el *Control interno*, véase **8.3 Control interno**) debe prepararse inmediatamente antes de empezar cada purificación siguiendo el siguiente esquema.

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis AVL	560 $\mu$ l	6.720 $\mu$ l
Carrier de RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5,6 $\mu$ l	67,2 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>565,6 <math>\mu</math>l</b>	<b>6.787,2 <math>\mu</math>l</b>
<b>Volumen por purificación</b>	<b>560 <math>\mu</math>l</b>	<b>cada 560 <math>\mu</math>l</b>

- c. Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.
- Si lleva a cabo la purificación con tampones de lavado que contienen **etanol**, asegúrese de que se realice 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* SARS RG RT-PCR Kit no está indicado para métodos de purificación que utilizan **fenol**.

**Importante:** El *Control interno* del *artus* SARS RG RT-PCR Kit se puede utilizar directamente en la purificación (véase **8.3 Control interno**).

## 8.3 Control interno

Se suministra un *Control interno* (SARS-CoV LC/RG/TM IC), con el que podrá analizar **tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR** (véase la Fig. 1). Para ello, añada el *Control interno* en una proporción de 0,1  $\mu$ l por 1  $\mu$ l de volumen final de elución durante la purificación. Por ejemplo, usando el QIAamp Viral Mini Kit, el ADN se eluye en 60  $\mu$ l de tampón AVE. Por lo tanto, añada 6  $\mu$ l del *Control interno*. Si, por ejemplo, eluye 50  $\mu$ l, deberá añadir por consiguiente 5  $\mu$ l. La cantidad añadida del *Control interno* depende

**exclusivamente** del volumen de elución. El *Control interno* y carrier de ARN (véase **8.2 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 1  $\mu\text{l}$  del *Control interno* directamente en 15  $\mu\text{l}$  de la SARS-CoV RG/TM Master. Utilice para cada reacción de PCR 15  $\mu\text{l}$  de la Master Mix\* preparada y añada a continuación 10  $\mu\text{l}$  de la muestra purificada. Si tiene que preparar una PCR con más muestras, aumente las cantidades necesarias de la SARS-CoV RG/TM Master y del *Control interno* de acuerdo al número de muestras (véase **8.5 Preparación de la PCR**).

## 8.4 Cuantificación

Estándares de cuantificación suministrados (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) se fueron calibrados de acuerdo a los estándares del Instituto Robert-Koch, Berlin. Se tratan como muestras ya purificadas y se añaden en el mismo volumen que en el caso de las muestras (10  $\mu\text{l}$ ). Para elaborar una curva estándar en el *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000*, añada los cuatro Estándares de cuantificación suministrados, defínalos en *Edit Samples* como estándares e introduzca las concentraciones indicadas (véase *artus 3000 Software Manual* o *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*).

Podrá utilizar esta curva estándar también para las cuantificaciones posteriores, si incluye como mínimo un estándar de **una** concentración definida durante la serie actual. Para ello, es necesario importar la curva estándar elaborada previamente (véase *artus 3000™ Software Manual* o *Rotor-Gene™ Manual, Version 4.6*). 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 PCR.

**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:

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

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 *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000* tiene a su disposición una guía (**Technical Note for quantitation on the *artus 3000* and *Rotor-Gene 3000***) en [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://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.

## 8.5 Preparación de la PCR

Asegúrese de que el bloque de refrigeración (accesorios del *artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*) haya sido previamente enfriado a +4°C aproximadamente. Coloque el número necesario de tubos de reacción de PCR de acuerdo a las reacciones que vaya a realizar. Asegúrese de que en cada serie de reacciones de PCR, se incluya al menos un Estándar de cuantificación y 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 (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Todos los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo, deben ser mezclados a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo o mezcle por inversión varias veces). 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 **8.1 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	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	0 µl	0 µl
	<b>Volumen total</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
2. Preparación de la PCR	Master Mix	15 µl	cada 15 µl
	Muestra	10 µl	cada 10 µl
	<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>	<b>cada 25 µl</b>

Si desea emplear el *Control interno* exclusivamente para analizar una posible inhibición de la PCR, debe ser añadido directamente a la SARS-CoV RG/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	SARS-CoV RG/TM Master	15 $\mu$ l	180 $\mu$ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	1 $\mu$ l	12 $\mu$ l
	<b>Volumen total</b>	<b>16 <math>\mu</math>l*</b>	<b>192 <math>\mu</math>l*</b>
2. Preparación de la PCR	Master Mix	15 $\mu$ l*	cada 15 $\mu$ l*
	Muestra	10 $\mu$ l	cada 10 $\mu$ l
	<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>cada 25 <math>\mu</math>l</b>

Introduzca 15  $\mu$ l de la Master Mix en cada tubo de reacción de la PCR. A continuación, añada 10  $\mu$ l de la purificación del ARN y pipetee arriba y abajo varias veces para homogenizar la mezcla. Se debe utilizar como control positivo 10  $\mu$ l de al menos uno de los Estándares de cuantificación (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) y como control negativo 10  $\mu$ l de agua (Water, PCR grade). Cierre los tubos de reacción de PCR. Tenga en cuenta que debe instalarse un *Locking Ring* (accesorios del *artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*) en el rotor, para evitar la apertura accidental de los tubos de reacción durante el ensayo.

---

\* 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

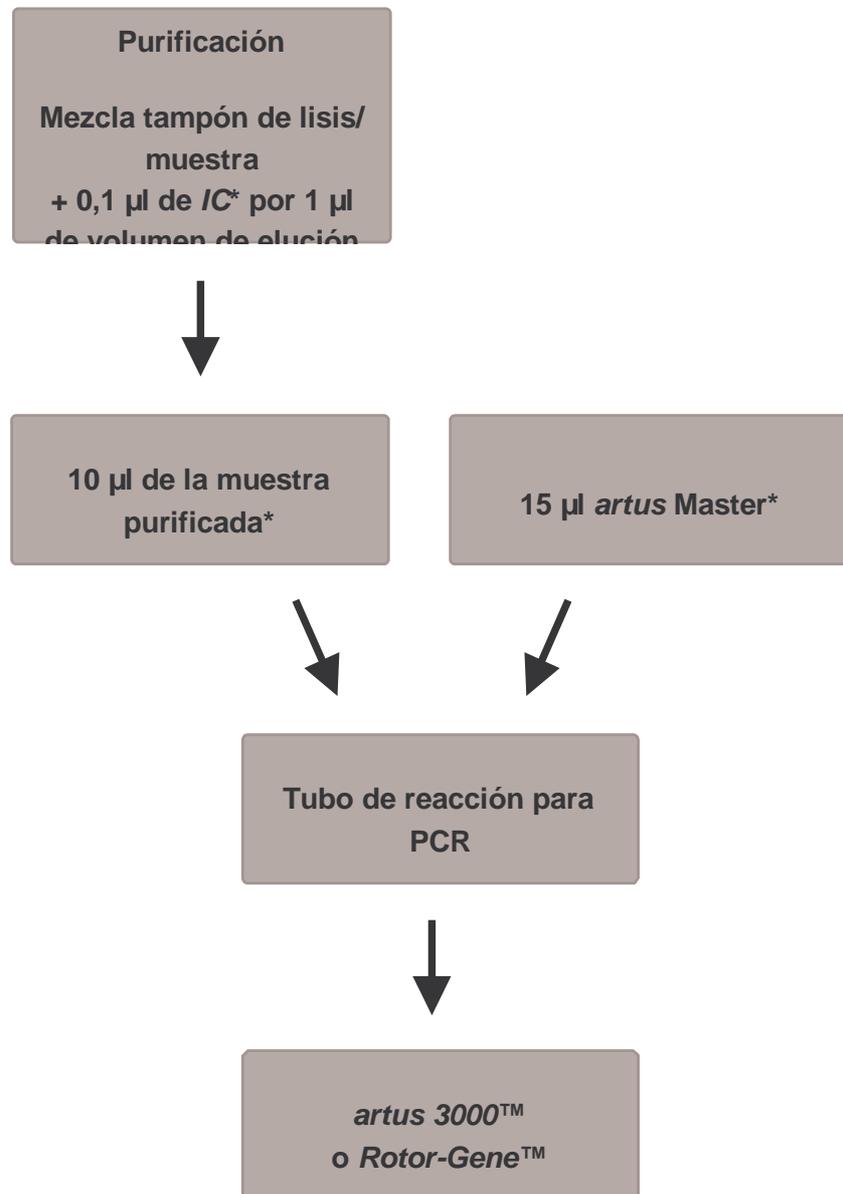


Fig. 1: Esquema de trabajo para el análisis de la purificación y la inhibición de la PCR.

\*

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

## Adición del Control interno a la artus Master

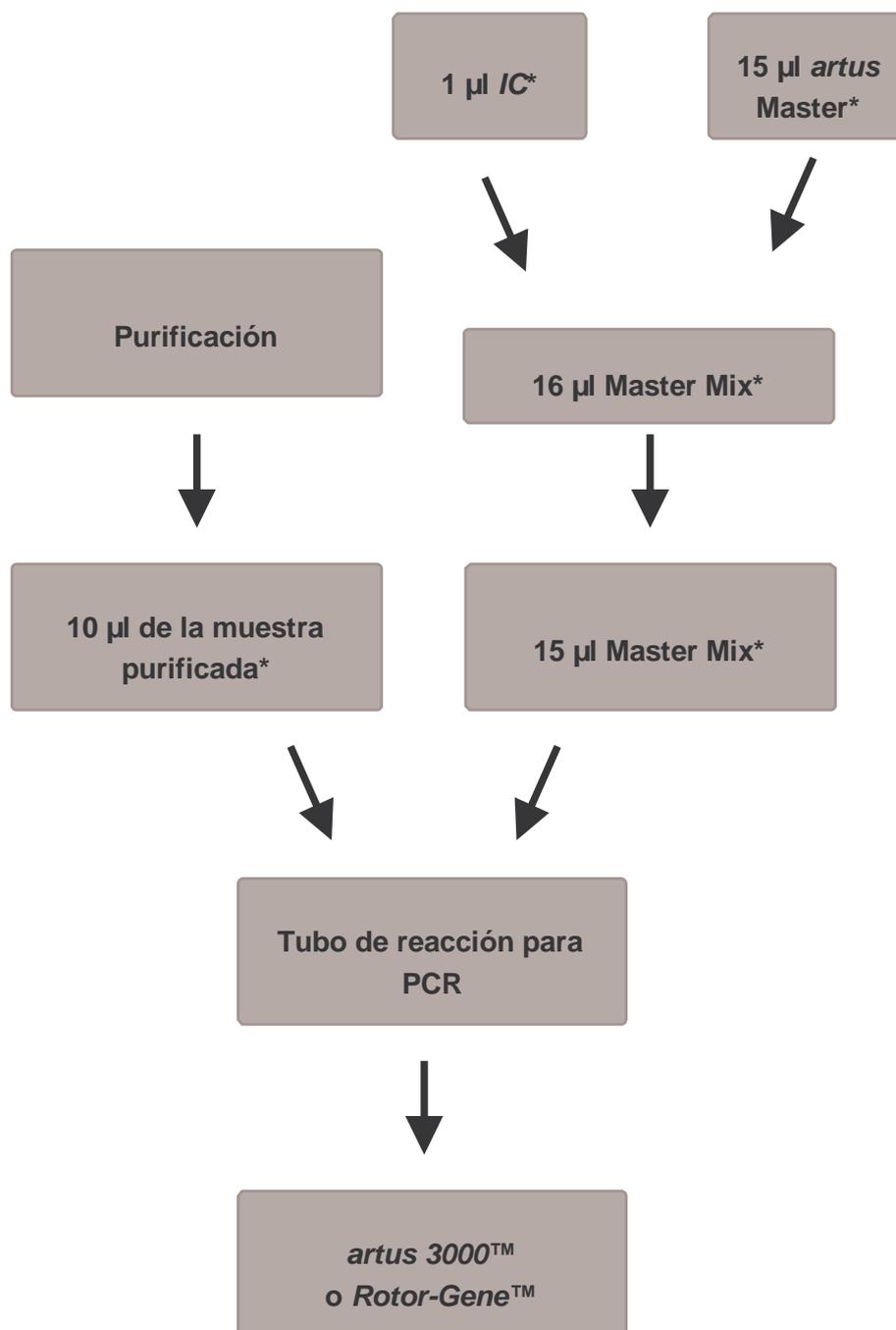


Fig. 2: Esquema de trabajo para el análisis de la inhibición de la PCR.

\*

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

## 8.6 Programación del *artus 3000* y del *Rotor-Gene 3000*

Para la detección del ADN del EBV cree un perfil de temperatura en el *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000* con estos cinco pasos según las Fig. 3 - 8.

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Establecimiento de los parámetros generales de la PCR  | Fig. 3 |
| B. | Transcripción reversa del ARN  | Fig. 4 |
| B. | Activación inicial de la enzima Hot Start  | Fig. 5 |
| C. | Amplificación del ADNc   | Fig. 6 |
| D. | Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia                                    | Fig. 7 |
| E. | Inicio del ensayo en el <i>artus 3000</i> <sup>™</sup> o <i>Rotor-Gene</i> <sup>™</sup> 3000 | Fig. 8 |

Todas las especificaciones hacen referencia a la versión del software 5.0.69 del *artus 3000* o la versión 4.6.94 del *Rotor-Gene*. Para más información acerca de la programación del *artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*, remítase al *artus 3000 Software Manual* o al *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*. En las figuras, estos ajustes aparecen resaltados mediante un recuadro en negrita.

En primer lugar, introduzca en la ventana del menú *New Experiment Wizard* el volumen de la reacción de la PCR (véase la Fig. 3).

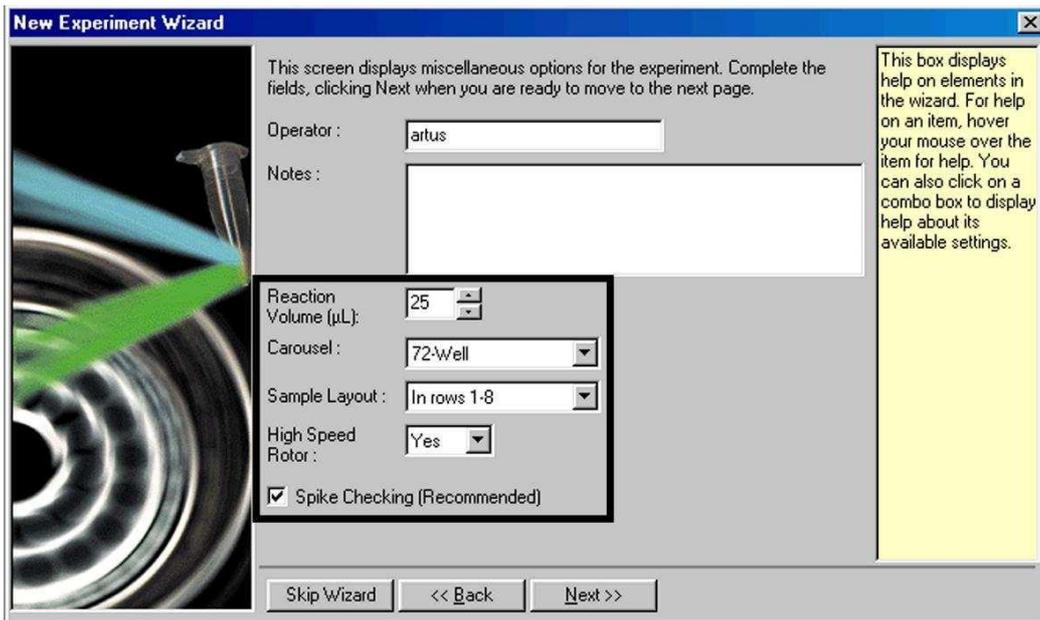


Fig. 3: Establecimiento de los parámetros generales de la PCR.

El perfil de temperatura se programa activando la función *Edit* en la próxima ventana del menú *New Experiment Wizard* (véanse las Fig. 4, 5 y 6).

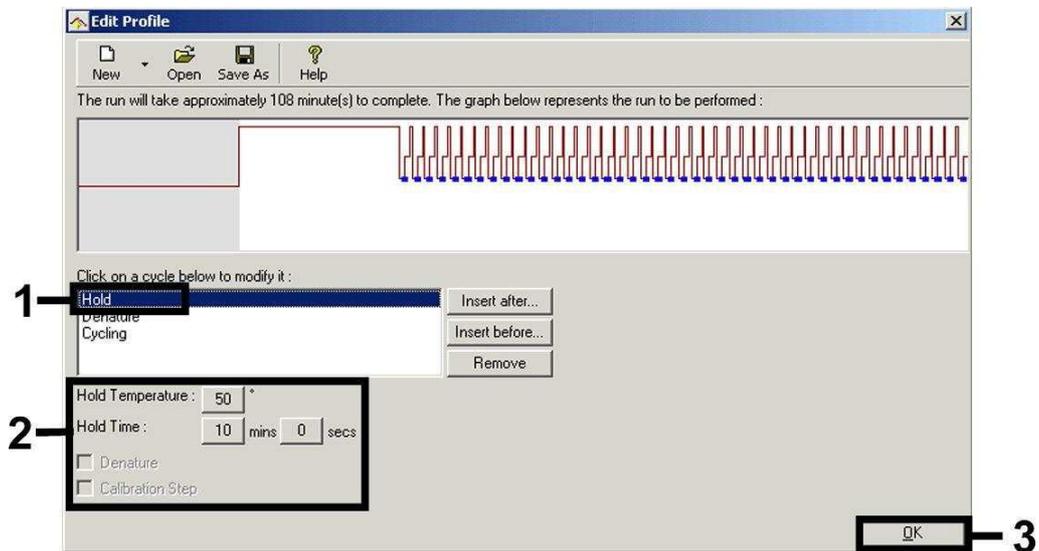


Fig. 4: Transcripción reversa del ARN.

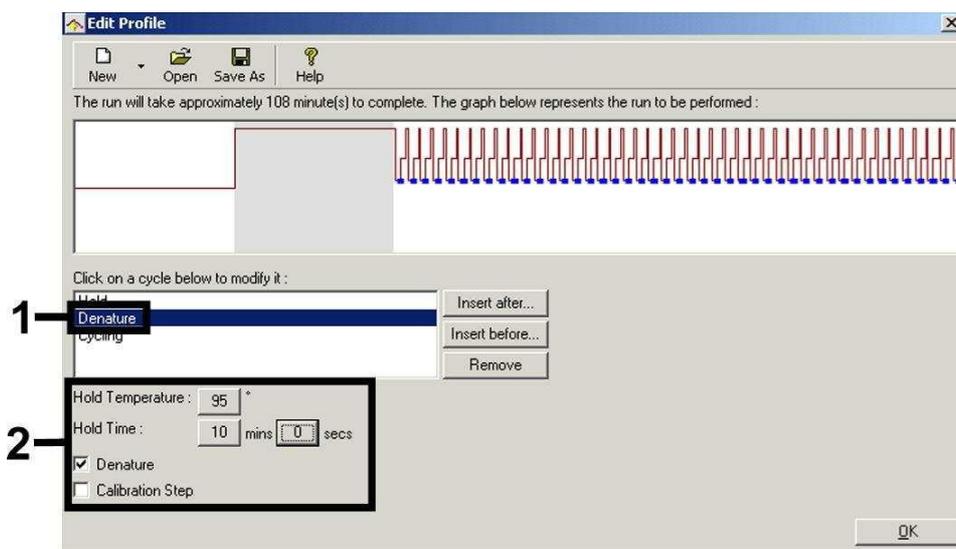


Fig. 5: Activación inicial de la enzima Hot Start.

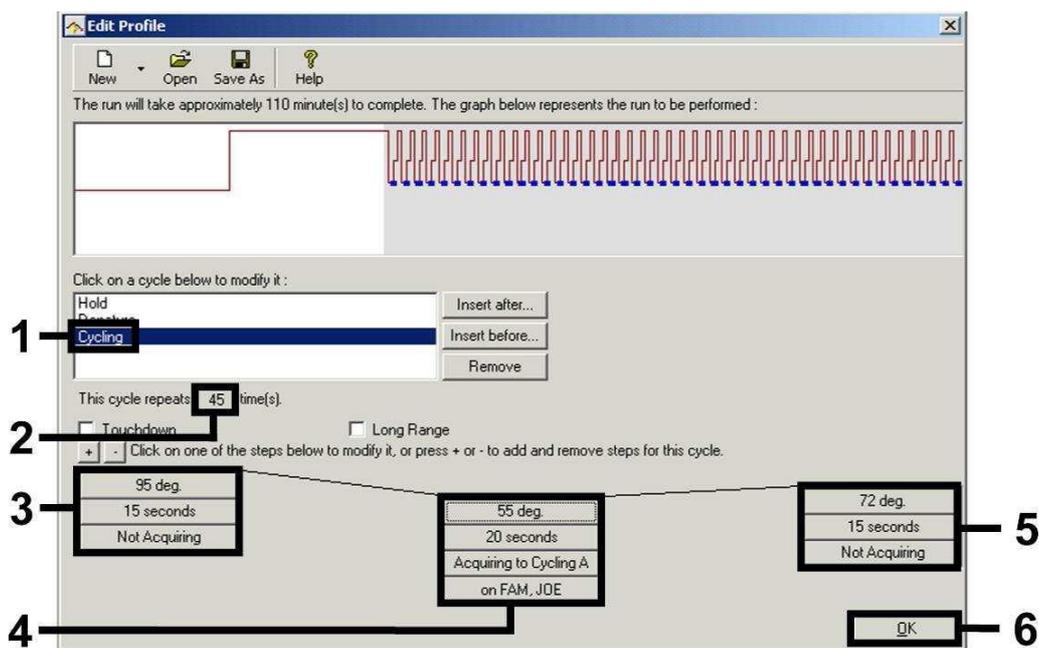


Fig. 6: Amplificación delADNc.

El límite de detección de los canales de fluorescencia se determina según las intensidades de fluorescencia de las reacciones de PCR. Este ajuste se lleva a cabo en la ventana del menú *Auto Gain Calibration Setup* (activación en la ventana del menú *New Experiment Wizard* bajo la opción *Calibrate*). Ajuste la temperatura de calibración de acuerdo a la temperatura de hibridación del programa de amplificación (véase la Fig. 7).

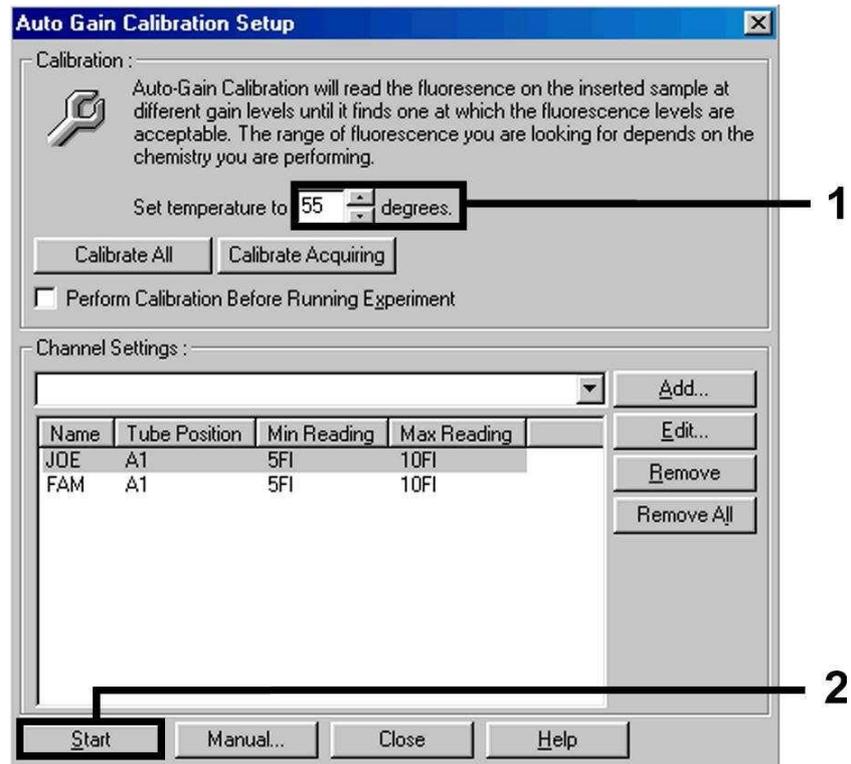


Fig. 7: Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

Los valores *Gain* determinados mediante la calibración del canal se salvan automáticamente y aparecen en la última ventana del menú del proceso de programación (véase la Fig. 8).

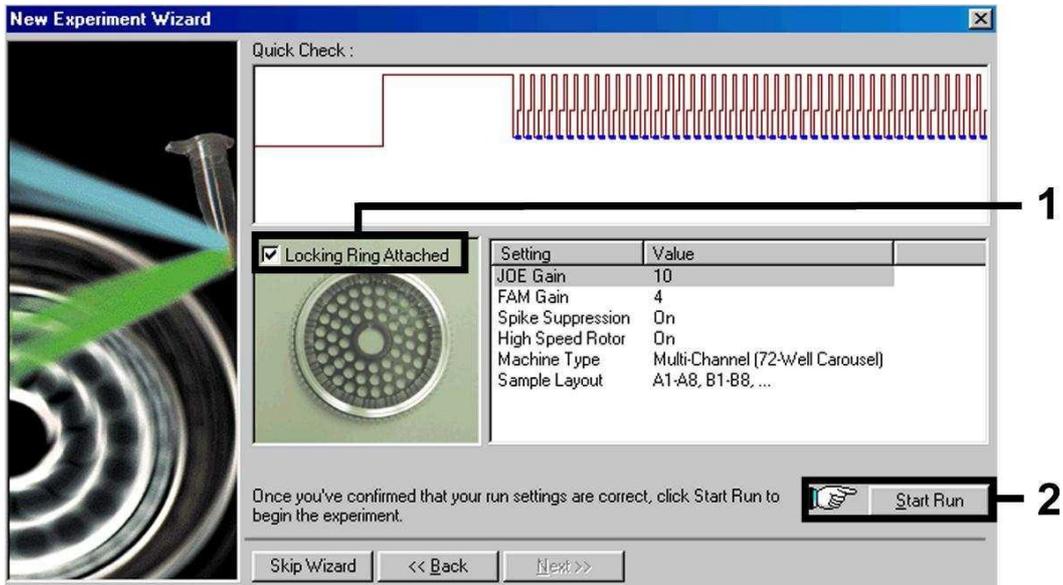


Fig. 8: Inicio del ensayo en el *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000*.

## 9. Análisis

El análisis se lleva a cabo con el software del *artus 3000* o del *Rotor-Gene* según las instrucciones del fabricante (*artus 3000 Software Manual* o *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*).

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling A.FAM.

**El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ARN del SARS-CoV.**

En este caso, la detección de la señal en el canal Cycling A.JOE es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ARN del SARS-CoV (señal positiva en el canal Cycling A.FAM) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del *Control interno* (en el canal Cycling A.JOE). Esto se debe a fenómenos de competencia.

2. En el canal de fluorescencia Cycling A.FAM no se detecta ninguna señal, sino sólo en el canal de fluorescencia Cycling A.JOE (señal del *Control interno*).

**En la muestra no se detecta ARN del SARS-CoV, por lo que puede considerarse negativa.**

En el caso de una RT-PCR negativa del SARS-CoV, la señal del *Control interno* detectada excluye la posibilidad de una inhibición de la PCR.

3. No se detecta señal ni en el canal Cycling A.FAM, ni en el canal Cycling A.JOE.

**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. 9 y 10 se muestran ejemplos de reacciones positivas y negativas de la PCR.

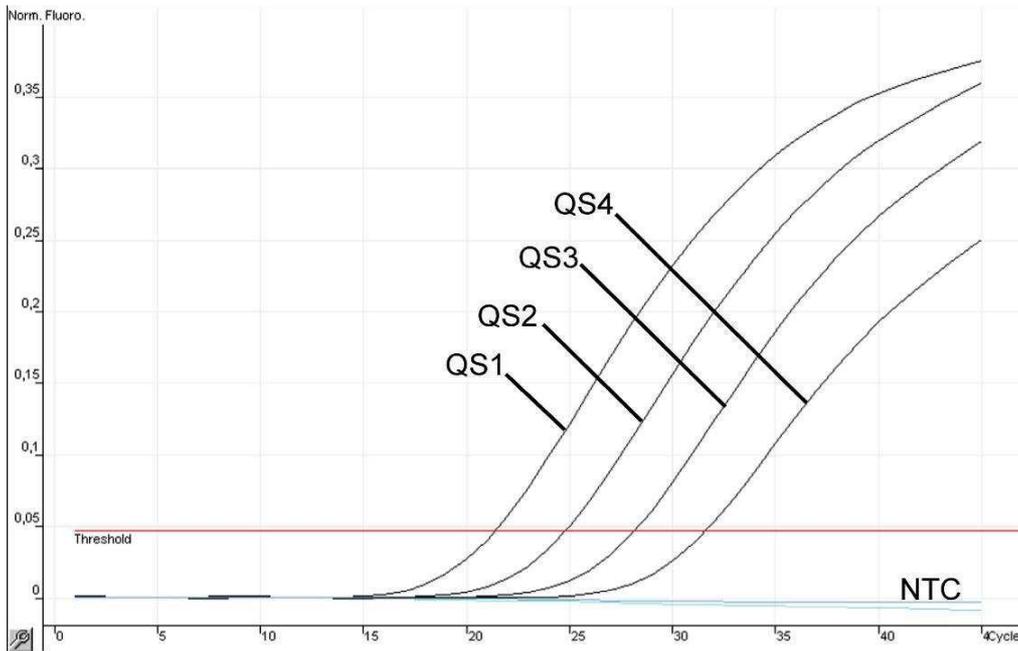


Fig. 9: Detección de los Estándares de cuantificación (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) en el canal de fluorescencia Cycling A.FAM. NTC: non-template control (control negativo).

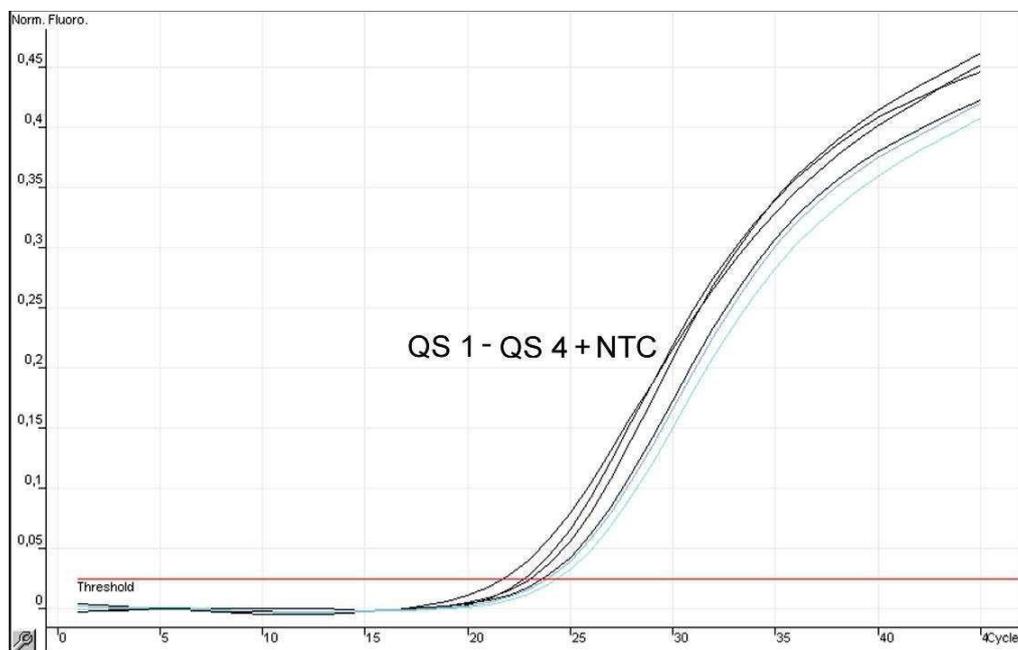


Fig. 10: Detección del Control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling A.JOE con amplificación simultánea de los Estándares de cuantificación (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (control negativo).

## 10. Solución de problemas

Ausencia de señal en los controles positivos (SARS-CoVLC/RG/TM QS 1 - 4) en el canal de fluorescencia Cycling A.FAM:

- La selección de los canales de fluorescencia para el análisis de la PCR no se corresponde con el protocolo.
  - ❖ Seleccione el canal de fluorescencia Cycling A.FAM para el análisis de la RT-PCR del SARS-CoV y el canal de fluorescencia Cycling A.JOE para la RT-PCR del *Control interno*.
- La programación del perfil de temperatura en el *artus 3000* o en el *Rotor-Gene 3000* no se llevó a cabo correctamente.
  - ❖ Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.6 Programación del artus 3000 y del Rotor-Gene 3000**).
- La preparación de la PCR no se llevó a cabo correctamente.
  - ❖ Compruebe el esquema de pipeteo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase **8.5 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 SARS RG RT-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 de fluorescencia Cycling A.JOE con ausencia simultánea de señal en el canal Cycling A.FAM:

- 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 **8.2 Purificación del ARN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
  - ❖ Asegúrese de que durante la purificación del ARN se ha realizado el paso adicional de centrifugación para eliminar los restos de etanol antes de realizar la elución (véase **8.2 Purificación del ARN**).
- Se producen pérdidas de ARN 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 **8.2 Purificación del ARN**) 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 SARS RG RT-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 RT-PCR analítica en el canal de fluorescencia Cycling A.FAM:

- Se produjo una contaminación durante la preparación de la PCR.
  - ❖ Repita de nuevo la PCR con componentes nuevos y realice réplicas.
  - ❖ Cierre los 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* SARS RG RT-PCR Kit se realizaron diluciones seriadas de un estándar de 10 a nominal 0,003 copias equivalentes\*/ $\mu\text{l}$  del SARS-CoV y se analizaron con el *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron con un análisis Probit cuyo análisis gráfico se muestra en la Fig. 11. El límite de detección del *artus* SARS RG RT-PCR Kit es de 0,5 copias/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ). Esto significa que hay un 95 % de posibilidades de detectar 0,5 copias/ $\mu\text{l}$ .

#### Análisis Probit: SARS-Coronavirus (*artus* 3000™ / *Rotor-Gene*™ 3000)

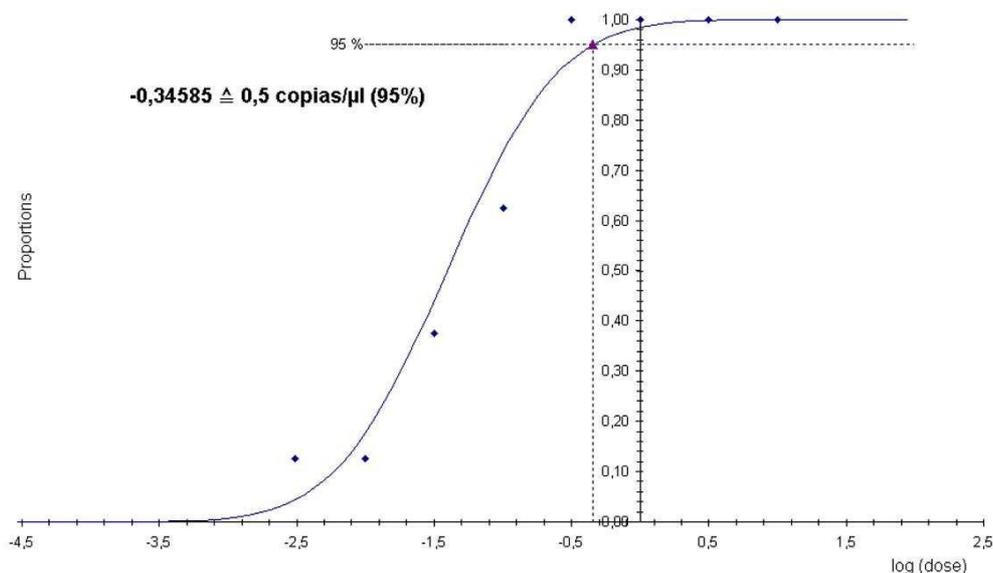


Fig. 11: Sensibilidad analítica del *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

\* 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.

## 11.2 Especificidad

La esmerada selección de los cebadores y sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del *artus* SARS RG RT-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 bancos de datos. La detectabilidad de todos los genotipos relevantes está garantizada.

La especificidad fue evaluada con 30 muestras de suero distintas negativas para SARS-CoV. Éstas no generaron ninguna señal con los cebadores ni con las sondas específicas de SARS-CoV incluidos en la *SARS-CoV RG/TMMaster*.

Para determinar la ausencia de reactividad cruzada del *artus* SARS RG RT-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	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Control interno (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

## 11.3 Precisión

Los datos de precisión para el *artus SARS RG RT-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 SARS RG RT-PCR Kit* utilizando el *Estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 4; 10 copias/ $\mu$ l). 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). Acorde con estos resultados, la dispersión total de una muestra cualquiera de concentración dada es 1,66 %, en el caso de la detección del *Control interno* es 1,28 %. 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	Coficiente de variabilidad [%]
Variabilidad intra-ensayo: SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,15	0,02	0,48
Variabilidad intra-ensayo: <i>Control interno</i>	0,40	0,15	1,67
Variabilidad inter-ensayo: SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,23	0,05	0,75
Variabilidad inter-ensayo: <i>Control interno</i>	1,13	1,28	4,53
Variabilidad inter-lotes: SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,52	0,25	1,69

Variabilidad inter-lotes: <i>Control interno</i>	0,94	0,63	3,62
Varianza total: SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,51	0,26	1,66
Varianza total: <i>Control interno</i>	1,13	1,28	1,28

## 11.4 Robustez

La comprobación de la robustez sirve para el análisis de la tasa de error total del *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Para ello se mezclaron 30 muestras de suero (negativas para SARS-CoV) cada una con 1,5 copias/ $\mu$ l de volumen de elución del ARN control del SARS-Coronavirus (concentración triple del límite de sensibilidad analítico). Se purificaron con el QIAamp Viral RNA Mini Kit (véase 8.2 Purificación del ARN) y se analizaron con el *artus* SARS RG RT-PCR Kit. La tasa de error para el SARS-CoV fue de un 0 % en la totalidad de las muestras. La robustez del *Control interno* fue determinada de forma adicional mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de suero negativas para el SARS-CoV. La tasa de error total fue de 0 %. No se detectaron inhibiciones. De este modo, la robustez del *artus* SARS RG RT-PCR Kit es de  $\geq 99$  %.

## 11.5 Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad sirven para una valorización regular del rendimiento del *artus* SARS RG RT-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* SARS RG RT-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. Información de seguridad

Información de seguridad respecto al *artus* SARS RG RT-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](http://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* SARS RG RT-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
	Etanol
	Número mundial de artículo comercial
	Contiene suficiente para <N> tests
	Límite de temperatura
<b>QS</b>	<i>Estándar de cuantificación</i>
<b>IC</b>	<i>Control interno</i>

artus SARS RG RT PCR Kit

Marcas comerciales y cláusulas de exclusión

QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, artus<sup>®</sup> Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); Dacron<sup>®</sup> (Invista, Inc.).

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 SARS RG RT-PCR Kit es un kit de diagnóstico marcado 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

© 2007-2015 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

