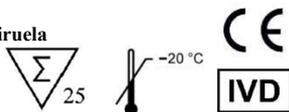


# Liferiver

Número de revisión:  
ZJ0007 Fecha de emisión:  
13 de marzo<sup>o</sup>, 2017

**Kit de PCR en tiempo real para el virus de la viruela del mono Manual del usuario Sólo para uso diagnóstico in vitro**



**REF** ZD-0076-02

**Para uso con ABI Prism®7000/7300/7500/7900/Step One Plus; iCycler iQ™4/iQ™5; Smart Cycler II; Bio-Rad CFX 96; Rotor Gene™6000; Mx3000P/3005P; MJ-Option2/Chromo4; LightCycler®480 y otros similares.**

**EC REF** Obelis S.A.  
Boulevard Général Wahis 53  
1030 Bruselas, BÉLGICA  
Tel: +(32) 2.732.59.54  
Fax: +(32) 2.732.60.03  
Correo electrónico :  
mail@obelis.net

**Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd.**  
www.liferiver.com.cn Tel: +86-21-34680596  
trade@liferiver.com.cn Fax: +86-21-34680595  
2<sup>nd</sup> floor, No.15 Building, No.188 Xinjunhuan Road,  
PuJiang Hi-tech Park, Shanghai, China

## 1. Uso previsto

El kit de PCR en tiempo real para el virus de la viruela del mono se utiliza para la detección del virus de la viruela del mono en muestras de suero o exudado de lesiones mediante sistemas de PCR en tiempo real.

## 2. Principio de la PCR en tiempo real

El principio de la detección en tiempo real se basa en el ensayo fluorogénico de la 5' nucleasa. Durante la reacción de PCR, la ADN polimerasa escinde la sonda en el extremo 5' y separa el colorante reportero del colorante quencher sólo cuando la sonda se hibrida con el ADN diana. Esta ruptura da lugar a la señal fluorescente generada por el colorante reportero escindiendo, que se monitoriza en tiempo real por el sistema de detección de la PCR. El ciclo de PCR en el que se detecta inicialmente un aumento de la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad del producto específico de la PCR. La monitorización de las intensidades de fluorescencia en tiempo real permite la detección del producto acumulado sin tener que volver a abrir el tubo de reacción después de la amplificación.

## 3. Descripción del producto

El virus de la viruela del mono es el virus que causa la enfermedad de la viruela del mono tanto en humanos como en animales. El virus de la viruela del mono es un Orthopoxvirus, un género de la familia Poxviridae que contiene otras especies virales dirigidas a los mamíferos. El virus se encuentra principalmente en las regiones de selva tropical de África central y occidental. Se cree que la principal vía de infección es el contacto con los animales infectados o sus fluidos corporales. El genoma no está segmentado y contiene una única molécula de ADN lineal de doble cadena, de 185000 nucleótidos de longitud. El kit de PCR en tiempo real del virus de la viruela del mono contiene un sistema específico listo para usar para la detección del virus de la viruela del mono mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el sistema de PCR en tiempo real. El master contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica del ADN del Virus Monkeypox. La unidad óptica del sistema en tiempo real emite y mide la fluorescencia durante la PCR. La detección del fragmento de ADN amplificado del Virus Monkeypox se realiza en el canal del fluorímetro FAM con el quencher fluorescente BHQ1. El kit incluye un tampón de extracción de ADN y se utilizan muestras de suero o exudado de la lesión para la extracción del ADN. Además, el kit contiene un sistema para identificar la posible inhibición de la PCR midiendo la fluorescencia HEX/VIC/JOE del control interno (IC). Se suministra un control positivo externo definido como 1×10<sup>7</sup> copias/ml que permite determinar la carga génica. Para más información, consulte la sección 9.3 Cuantificación.

## 4. Contenido del kit

Ref.	Tipo de reactivo	Presentación 25rxns
1	Tampón de extracción de ADN	1 vial, 1,8ml
2	Mezcla de reacción MPV	1 vial, 950µl
3	Mezcla de enzimas PCR	1 vial, 12µl
4	Agua de grado molecular	1 vial, 400µl
5	Control interno (CI)	1 vial, 30µl
6	Control positivo de MPV (1×10 <sup>7</sup> )	1 vial, 30µl

**Sensibilidad del análisis: 5×10<sup>3</sup> copias/ml**

**LOQ: 1×10<sup>4</sup> ~ 1×10<sup>8</sup> copias/ml**

**Nota:** La sensibilidad del análisis depende del volumen de la muestra, del volumen de elución, de los métodos de extracción de ácidos nucleicos y de otros factores. Si se utiliza el tampón de extracción de ADN del kit, la sensibilidad del análisis es la misma que declara. Sin embargo, cuando el volumen de la muestra es decenas o incluso cientos de veces mayor que el volumen de elución por algún método de concentración, puede ser mucho mayor.

## 5. Almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse a -20°C. No se recomienda el almacenamiento a +4°C.
- Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Debe evitarse la descongelación y congelación repetida (> 3 veces), ya que puede reducir la sensibilidad del ensayo.
- Enfriar todos los reactivos durante los pasos de trabajo.
- La mezcla de reacción debe almacenarse en la oscuridad.

## 6. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Gabinete biológico
- Sistema de PCR en tiempo real
- Microcentrífuga de sobremesa para tubos tipo "eppendorf" (FCR máx. 16.000 x g)
- Mezclador de vórtice
- Tubos/placas de reacción PCR en tiempo real
- Criocontenedor
- Pipetas (0,5 µl - 1000 µl)
- Puntas filtrantes estériles para micropipetas
- Microtubos estériles
- Guantes desechables, sin polvo
- Contenedor de residuos de riesgo biológico
- Frigorífico y congelador
- Estanterías de tubos

## 7. Advertencias y precauciones

- Lea atentamente estas instrucciones antes de iniciar el procedimiento.
- Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
- Este ensayo debe ser realizado por personal cualificado.
- Las muestras clínicas deben considerarse materiales potencialmente infecciosos y deben prepararse en una campana de flujo laminar.
- Este ensayo debe realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.
- No utilice el kit después de su fecha de caducidad.
- Evitar la descongelación y congelación repetida de los reactivos, esto puede reducir la sensibilidad de la prueba. Una vez descongelados los reactivos, agitar y centrifugar brevemente los tubos antes de utilizarlos.
- Prepare rápidamente la mezcla de reacción en hielo o en el bloque de refrigeración.
- Establezca dos áreas de trabajo separadas: 1) Aislamiento del ARN/ADN y 2) Amplificación/detección de los productos de amplificación.
- Las pipetas, viales y otros materiales de trabajo no deben circular entre las unidades de trabajo.
- Utilice siempre puntas de pipeta estériles con filtro.
- Utilizar abrigos y guantes por separado en cada zona.
- No pipetear por la boca. No comer, beber ni fumar en el laboratorio

- Evite los aerosoles.
- 8. Recogida, almacenamiento y transporte de muestras**
- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Las muestras pueden extraerse inmediatamente o congelarse entre -20°C y -80°C.
- El transporte de muestras clínicas debe cumplir con la normativa local para el transporte de agentes etiológicos.

## 9. Procedimiento

### 9.1 Extracción de ADN

El kit contiene un tampón de extracción de ADN, por favor descongele el tampón completamente y centrifugue brevemente en la centrífuga antes de usarlo. Puede utilizar sus propios sistemas de extracción o kits comerciales.

1) Pipetear 50µl de muestra (suero, o exudados de la lesión disueltos en 1ml de solución salina) a un tubo de 0,5ml, añadir 50µl de tampón de extracción de ADN, cerrar el tubo y agitar en vórtice durante 10 segundos. Hacer girar brevemente en una centrífuga de mesa.

2) Incubar el tubo durante 10 minutos a 100°C.

3) Centrifugar el tubo a 13000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante contiene el ADN extraído y se utiliza como molde para la PCR.

### 9.2 Control interno

Es necesario añadir un control interno (CI) en la mezcla de reacción. El control interno (CI) permite al usuario determinar y controlar la posibilidad de inhibición de la PCR.

Añadir el control interno (IC) 1µl/rxn y el resultado se mostrará en el HEX/VIC/JOE.

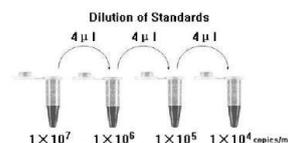
### 9.3 Cuantificación

El kit puede utilizarse para la PCR cuantitativa o cualitativa en tiempo real. Un control positivo (1×10<sup>7</sup> copias/ml) se suministra en el kit.

**Para la realización de la PCR cuantitativa en tiempo real, se deben preparar primero las diluciones estándar como se indica a continuación. Para la dilución se utiliza agua de grado molecular.**

**La dilución no es necesaria para la realización de la PCR cualitativa en tiempo real.**

Tomar el control positivo (1×10<sup>7</sup> copias/ml) como estándar alto inicial en el primer tubo. Pipetear respectivamente 36µl de agua de grado molecular en los tres tubos siguientes. Realice tres diluciones según las siguientes figuras:



Para generar una curva estándar en el sistema en tiempo real, se deben utilizar los cuatro estándares de dilución y definirlos como estándar con la especificación de las concentraciones correspondientes.

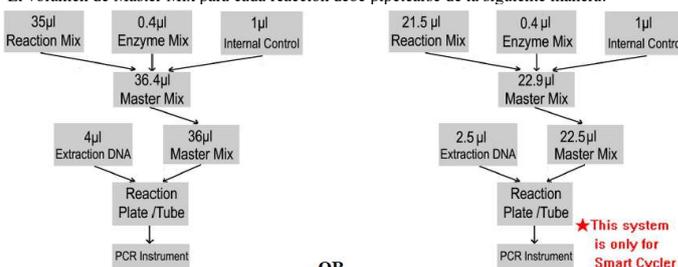
### Atención:

A. Mezclar bien antes de la siguiente transferencia.

B. El control positivo (1×10<sup>7</sup> copias/ml) contiene una alta concentración del ADN objetivo. Por lo tanto, tenga cuidado durante la dilución para evitar la contaminación.

### 9.4 Protocolo PCR

El volumen de Master Mix para cada reacción debe pipetearse de la siguiente manera:



1) Los volúmenes de Reaction Mix y Enzyme Mix por reacción se multiplican con el número de muestras, que incluye el número de controles, estándares y muestra preparada. El agua de grado molecular se utiliza como control negativo. Por razones de precisión en el pipeteo, añada siempre una muestra virtual adicional. Mezcle completamente y luego gire brevemente en una centrífuga.

2) Pipetear 36µl (22,5µl para SmartCyclerII) de Master Mix con micropipetas de puntas de filtro estériles a cada una de las placas/tubos de reacción de PCR en tiempo real. Añada por separado 4µl (2,5µl para SmartCyclerII) de muestra de ADN, controles positivos y negativos a las diferentes placas/tubos de reacción. Cierre inmediatamente las placas/tubos para evitar la contaminación.

3) Centrifugar brevemente para recoger la Master Mix en el fondo de los tubos de reacción.

4) Realice el siguiente protocolo en el instrumento:

37°C durante 2min	1 ciclo
94°C durante 2min	1 ciclo
93°C durante 15seg, 60°C durante 1min	40ciclos

Selección de canales de fluorescencia	
FAM	Diana
HEX/VIC/JOE	Control Interno

5) Si utiliza el sistema ABI Prism®, elija "none" como referencia pasiva y quencher.

**10. Ajuste del umbral:** justo por encima del nivel máximo de agua de grado molecular.

**11. Calibración para la detección cuantitativa:** Introduzca cada concentración de controles estándar al final de la corrida, y se formará automáticamente una curva estándar.

**12. Control de calidad:** El control negativo, el control positivo, el control interno y la curva QS deben realizarse correctamente, de lo contrario los resultados de la muestra no son válidos.

Control	Canal	Valor Ct
	FAM	HEX/VIC/JOE
Agua de grado molecular (C -)	UNDET	25-35
Control positivo (ensayo cualitativo)	≤35	--
QS (Detección cuantitativa)	Coeficiente de correlación de la curva QS ≤ 0,98	

## 13. Análisis e interpretación de datos

Son posibles los siguientes resultados:

	Valor Ct		Análisis de resultados
	FAM	HEX/VIC/JOE	
1#	UNDET	25-35	Por debajo del límite de detección o negativo
2#	≤38	--	Positivo; y el software muestra el valor cuantitativo
3#	38~40	25-35	Vuelva a probar; si sigue siendo 38-40, informe como 1#
4#	UNDET	UNDET	Inhibición de la PCR; no se puede concluir el diagnóstico.