

Simplexa™ CMV Quantitation Standards

REF MOL2210

Rev. B

Los patrones de cuantificación Simplexa™ CMV han sido diseñados con el propósito de establecer una curva estándar para el ensayo Simplexa™ CMV ejecutado en el equipo 3M Integrated Cyclor.



Para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES DE USO

Los patrones de cuantificación Simplexa™ CMV de Focus Diagnostics han sido diseñados con el propósito de establecer una curva estándar para el ensayo Simplexa™ CMV ejecutado en el equipo 3M Integrated Cyclor.

ANTECEDENTES

El ensayo patrones de cuantificación Simplexa™ CMV se ha alineado con el estándar para el CMV de la OMS¹. La carga viral notificada del ensayo Simplexa™ para CMV en copias/ml es igual al estándar para el CMV de la OMS en UI/ml.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El conjunto de patrones de cuantificación Simplexa™ CMV de Focus Diagnostics contiene material suficiente para llevar a cabo dos reacciones.

Descripción del kit del patrón de cuantificación (QS)

Focus Diagnostics Patrones de cuantificación Simplexa™ CMV (N.º REF MOL2210)					
Componente del kit	REF	Número de tubos por kit	Reacciones por vial	Volumen (µl) por vial	Descripción de los componentes
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 1 (QS-1) (Patrón de cuantificación 1 Simplexa™ CMV)	MOL2211	1	2	400	Amplicón de CMV en una base de matriz humana.
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 2 (QS-2) (Patrón de cuantificación 2 Simplexa™ CMV)	MOL2212	1	2	400	Amplicón de CMV en una base de matriz humana.
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 3 (QS-3) (Patrón de cuantificación 3 Simplexa™ CMV)	MOL2213	1	2	400	Amplicón de CMV en una base de matriz humana.
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 4 (QS-4) (Patrón de cuantificación 4 Simplexa™ CMV)	MOL2214	1	2	400	Amplicón de CMV en una base de matriz humana.
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 5 (QS-5) (Patrón de cuantificación 5 Simplexa™ CMV)	MOL2215	1	2	400	Amplicón de CMV en una base de matriz humana.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Simplexa™ CMV (REF MOL2200)
2. Equipo Integrated Cyclor 3M con Integrated Cyclor Studio 3M versión 4.1 o superior.
3. Discos universales para el equipo Integrated Cyclor 3M.
4. Cinta de cubierta para discos universales
5. ^a Roche MagNA™ Pure LC System y elementos fungibles asociados.
6. ^a Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (N.º de cat. de Roche 3038505001)
7. ^b Equipo NucliSENS® easyMAG™ de bioMérieux y consumibles y reactivos asociados
8. ^b Pipeta multicanal Biohit/bioMérieux
9. ^b Placa de tiras ELISA

10. Micropipeta(s), de canal único, multicanal y/o de repetición, de una precisión comprendida en el rango de 1-10 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl.
11. Congelador (eliminación de escarcha manual) de -10 a -30 °C (para guardar los componentes del kit congelados)
12. Frigorífico de 2 °C a 8 °C (para los componentes del kit y reactivos que han sido descongelados)
13. Cabina de bioseguridad (campana de flujo laminar) para las extracciones
14. Microcentrífuga
15. Mezclador vórtex
16. Puntas de micropipetas, estériles, desechables, exentas de ARNasas/ADNasas, con protección contra aerosoles
17. Tubos para microcentrifuga de polipropileno de 1,5 ml y gradillas (se recomienda usar tubos exentos de ARNasas/ADNasas, pero no es obligatorio).
18. Guantes sin polvo desechables.
19. Agua libre de nucleasas (que se utiliza durante la extracción y como el control sin molde (No Template Control (NTC))
20. Gradillas frías para los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
 - a. Para uso con el método de extracción Roche MagNA Pure LC.
 - b. Para uso con el método de extracción easyMAG de bioMérieux.

PERÍODO DE VALIDEZ Y MANIPULACIÓN

1. Conserve los reactivos a una temperatura entre -10°C y -30°C (no use un congelador de tipo («no-frost»).
2. Tras el uso inicial, conserve los reactivos descongelados a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante no más de 5 días.
3. No use los reactivos después de la fecha de caducidad.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para utilización en el diagnóstico *in vitro*.
2. Todos los productos sanguíneos humanos deben ser tratados como potencialmente infecciosos. La materia prima utilizada para la fabricación de este producto se ha analizado con métodos aprobados por la FDA para detectar la presencia de antígenos de superficie de hepatitis B, anticuerpos de hepatitis C y de VIH-1/2 (SIDA) con resultados negativos. Sin embargo, como ningún método de ensayo conocido puede ofrecer un 100% de garantía de que los productos derivados de la sangre humana no transmitirán estos u otros agentes infecciosos, todos los controles, muestras de suero y equipos que entren en contacto con estas muestras deben considerarse potencialmente infecciosos y descontaminarse o eliminarse con las precauciones adecuadas de riesgo biológico. El CDC y los institutos nacionales de la salud recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manejen en el nivel 2 de bioseguridad.^{2,3}
3. Cuando manipule los reactivos del kit, use equipos de protección personal, como guantes y batas de laboratorio, entre otros. Lávese las manos minuciosamente cuando termine de realizar la prueba.
4. No pipetee con la boca.
5. No fume, beba, coma, manipule lentes de contacto ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se usan los reactivos del kit o muestras de origen humano.
6. Elimine los reactivos del kit que no se hayan usado conforme a las normas locales, estatales y federales.
7. La contaminación de las muestras de pacientes o de reactivos puede dar lugar a resultados erróneos. Utilice técnicas asépticas.
8. Pipetee y manipule los reactivos con cuidado para evitar que se mezclen con muestras de pocillos adyacentes.
9. Utilice técnicas de pipeteo adecuadas y mantenga las mismas condiciones de pipeteo durante todo el procedimiento para garantizar valores óptimos y reproducibles.
10. No sustituya o mezcle reactivos de diferentes lotes de kits o de otros fabricantes
11. No intercambie las tapas de los tubos de reactivos. Eso puede provocar su contaminación y alterar los resultados de la prueba.
12. No reutilice los discos universales que ya han estado expuestos a muestras de pacientes o reactivos.
13. Deseche el disco usado sin separar ni retirar la cinta de cubierta.
14. Si el envase del kit tiene aspecto de estar roto o deteriorado, no lo use y póngase en contacto con Focus Diagnostics. La información de contacto aparece en la última página de este documento.

INSTRUCCIONES DE USO

A ZONA DE EXTRACCIÓN PARA EL PATRÓN DE CUANTIFICACIÓN

Lleve a cabo el procedimiento en la zona destinada a la extracción de muestras. La preparación del modelo de cuantificación para la extracción debe realizarse en una cabina de bioseguridad.

Extracción mediante el método Roche MagNA Pure LC

1. Extraiga los patrones de cuantificación mediante el kit Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation y el equipo Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor. Consulte las instrucciones de uso del fabricante para extraer ácidos nucleicos con este kit.

2. En el menú desplegable «Protocol» (Protocolo) del equipo MagNA Pure LC, seleccione «Total NA» y luego «Total NA Variable_elution_volume.blk». Se cargarán los ajustes apropiados para el proceso.
3. El protocolo de la muestra debe ser «Total NA Variable_elution_volume».
4. El volumen de la muestra debe ajustarse a 200 µl y el volumen de elución a 50 µl.
5. El volumen de dilución debe ajustarse a cero para todas las muestras.
6. Asegúrese de que el protocolo tras la elución se sitúa en «None» (Ninguno).
7. Asegúrese de que los patrones de cuantificación y el control sin molde (NTC) están en la posición correcta en el cartucho de muestras.
8. Mezcle cada patrón y control sin molde en el mezclador vórtex entre 2 y 4 segundos y centrifugue brevemente para que el contenido baje al fondo del tubo.
9. Pipetee 200 µl de cada patrón y del control sin molde en la posición correspondiente del cartucho de muestras.
10. Inspeccione visualmente el nivel de los patrones y los controles en el cartucho de muestras para asegurarse de que los patrones se han agregado.
11. Dele un pulso en el agitador vórtex al ADN para control de extracción y amplificación (CI) 2 veces y centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
12. Por cada conjunto de patrones, pipetee 100 µl del CI en 6 ml del amortiguador de lisis en un tubo de base cónica. Mezcle con el agitador vórtex brevemente. Añada a la bandeja apropiada del sistema de extracción MagNA Pure.
13. Transfiera el cartucho de muestras con las muestras al MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor e inicie el proceso de extracción.
14. Después de completar la extracción del ácido nucleico, se puede retirar el cartucho con los patrones extraídos del MagNA Pure y sellarse. Guarde el ADN extraído a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C antes de usarlo. No se recomienda el almacenamiento prolongado a esta temperatura de los patrones extraídos. Mantenga las muestras de ADN extraído en un bloque refrigerador mientras carga el disco.

Extracción mediante el método NucliSENS® easyMAG™ de bioMérieux.

1. Consulte el manual de usuario del equipo NucliSENS® easyMAG™ para ver el funcionamiento del equipo y del software.
2. Elija la plantilla «Generic» (Genérica) en el software NucliSENS® easyMAG™ con los siguientes parámetros:

Default Request (Solicitud por defecto):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (ou equivalente)
Run Name Prefix (Prefijo del nombre del proceso):	(as appropriate) (conforme apropiado)
Sample ID prefix (Prefijo de ID de muestra):	(as appropriate) (conforme apropiado)
Sample Type (Tipo de muestra):	Primary (Primária)
Workflow Defaults (Flujo de trabajo predeterminado):	On-board lysis Incubation (Incubação de lise on-board) On-board Silica Incubation (Incubação de sílica on-board) Sample Addition Guidance Off (Desligar orientação para adição de amostra)
Reagent Tracking (Seguimiento de reactivos):	Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled (Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking desabilitado)
3. Introduzca la información individual de cada muestra en la pantalla Extraction Request (Solicitud de extracción) tal y como se indica a continuación.

Sample ID (Identificación de las muestras):	(Enter sample name)(Digitar nome da amostra)
Request (Solicitud):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (ou equivalente)
Volume (ml) (Volumen en ml):	0,200
Eluate (µl) (Eluato en µl):	50
Type (Tipo):	Primary (Primária)
Priority (Prioridad):	Normal
Matrix (Matriz):	Other (Outros)
4. Inicie un proceso de extracción en el software NucliSENS® easyMAG™ siguiendo el manual de usuario.
5. Mezcle cada patrón en el mezclador vórtex entre 2 y 4 segundos y centrifugue brevemente para que el contenido baje al fondo del tubo.
6. Pipetee 200 µl del patrón y del control sin molde en los compartimientos para la(s) muestra(s).
7. Dele dos (2) pulsos en el agitador vórtex al control interno (CI) y centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
8. Pipetee 5 µl del CI en cada patrón y en todos los pocillos de control. Cambie las puntas entre patrones.
9. Cargue los recipientes de las muestras, los nuevos desechables del aspirador y los reactivos en el extractor easyMAG™ siguiendo el manual del usuario.
10. Inicie la lisis en la placa e incube las muestras lisadas durante 10 minutos antes de añadir la mezcla de sílice magnética.

11. Durante el periodo de incubación de lisis, prepare la mezcla de sílice magnética. Mezcle la sílice y dilúyala en agua sin nucleasas añadiendo 1 parte de sílice magnética a 3 partes de agua sin nucleasas (p. ej., 270 µl de sílice magnética + 810 µl de agua sin nucleasas). Prepare un mínimo de 135 µl de mezcla de sílice magnética por muestra.
12. Para transferir la mezcla de sílice a los pocillos de las tiras ELISA, mezcle la mezcla de sílice magnética y use 1 punta, hágalo con el modo P2 de la pipeta Biohit. Pulse **Start** (Iniciar) para aspirar 1050 µl de mezcla de sílice magnética y pulse otra vez **Start** (Iniciar) para dispensar la primera administración en el tubo de mezcla de sílice. Pulse **Start** (Iniciar) para dispensar 125 µl de la mezcla de sílice magnética en 8 pocillos individuales de la tira ELISA. Repita la operación según el número de tiras ELISA adicionales.
13. Después del periodo de incubación de lisis de 10 minutos, use 8 puntas (por cada tira ELISA) y utilizando el modo P3 de la pipeta Biohit transfiera 100 µl de la mezcla de sílice magnética a cada patrón y del control sin molde (NTC) del recipiente para muestras. Coloque las puntas en los pocillos de la tira ELISA y pulse **Start** (Iniciar) para mezclar y aspirar la mezcla de sílice magnética.
14. Transfiera la mezcla de sílice magnética al recipiente para muestras apropiado y coloque las puntas de la pipeta en las muestras, por debajo del nivel del líquido. Pulse **Start** (Iniciar) para aspirar, dispensar y mezclar (x3) la sílice magnética y las muestras. Asegúrese de que las puntas están bajo el nivel del líquido para garantizar una mezcla adecuada.
15. Repita los pasos 13 y 14 para el resto de recipientes para muestras adicionales.
16. Después de añadir la mezcla de sílice magnética a todos los recipientes para muestras, inicie el proceso de extracción.
17. Cuando el proceso haya terminado, retire los recipientes para muestras del equipo. Si las muestras no se van a utilizar inmediatamente, transfiera el contenido a tubos individuales para minimizar la probabilidad de que la sílice magnética vuelva a caer en la muestra. Guarde el ADN extraído a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C antes de usarlo. No se recomienda el almacenamiento prolongado a esta temperatura de las muestras extraídas. Mantenga el ADN extraído en un bloque refrigerador mientras carga el disco.

B. CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL

1. Consulte el manual del operador del equipo Integrated Cycler para configurar el software Integrated Cycler Studio para añadir una definición de ensayo, establecer una curva estándar (proceso de calibración) y analizar procesos en el equipo Integrated Cycler.

- Nota: En el proceso de calibración (Calibration Run) sólo deben cargarse los patrones de cuantificación y el control sin molde (NTC). Las muestras de pacientes y los controles positivos pueden procesarse después de que se haya establecido un proceso de calibración válido.

Ejemplo de disposición del disco

	Rayo 1	Rayo 2	Rayo 3	Rayo 4	Rayo 5	Rayo 6	Rayo 7	Rayo 8	Rayo 9	Rayo 10	Rayo 11	Rayo 12
A	QS-1	QS-3	QS-5									
B	QS-1	QS-3	QS-5									
C	QS-1	QS-3	QS-5									
D	QS-1	QS-3	QS-5									
E	QS-2	QS-4	NTC									
F	QS-2	QS-4										
G	QS-2	QS-4										
H	QS-2	QS-4										

C. ZONA DE PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Zona específica para la preparación de la mezcla de reacción de la prueba Simplexa™ CMV.

1. Descongele la mezcla de cebadores y la mezcla maestra a temperatura ambiente (aproximadamente a una temperatura entre 18 °C y 25 °C). Cada vial del componente del kit contiene reactivos suficientes para 50 reacciones. Antes de cada uso, mezcle suavemente la mezcla de cebadores y centrifúguelas brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
2. Prepare el volumen requerido de la mezcla de reacción en un tubo para microcentrifuga de polipropileno del tamaño adecuado pipeteando el volumen de cada componente como se indica en la tabla siguiente.

Volúmenes de la mezcla de reacción

Reactivo	Mezcla de reacción/ Volumen/ 1 reacción	Mezcla de reacción/ Volumen/ 24 reacciones
Mezcla maestra Simplexa™	4,0 µl	96 µl
Mezcla de cebadores Simplexa™ CMV	1,0 µl	24 µl
Volumen total	5,0 µl	120 µl

3. Mezcle suavemente la mezcla de reacción mediante inversión o pipeteando de 8 a 10 veces.
4. Centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
5. Continúe con la preparación de la PCR.

6. Use la mezcla de reacción antes de que pase una hora de la preparación. Guarde la mezcla de reacción a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C si la PCR no se llevara a cabo inmediatamente después de preparar la mezcla de reacción.

D. ZONA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

Realice la preparación del disco universal de 96 pocillos para la prueba Simplexa™ CMV en una zona habilitada exclusivamente para ello.

Consulte el ejemplo de disposición del disco de la sección B mientras realiza lo siguiente:

1. Añada 5 µl de mezcla de reacción a cada pocillo.
2. Añada 5 µl del patrón de cuantificación extraído al pocillo «QS» correspondiente.
3. Añada 5 µl de control negativo (sin molde) extraído al pocillo «NTC».
4. Cubra el disco con cinta de cubierta para discos universales.
5. Abra la tapa del equipo Integrated Cyclers.
6. Coloque el disco universal sellado sobre el plato.
7. Cierre la tapa suavemente.
8. Pulse sobre **Run** (Proceso).
9. Pulse sobre **Start** (Iniciar).

E. ANÁLISIS DE LA CURVA ESTÁNDAR (PROCESO DE CALIBRACIÓN)

1. El software Integrated Cyclers Studio determinará automáticamente si el proceso de calibración es válido.
 - a. De ser válido, el proceso de calibración se guardará automáticamente para su posterior uso.
 - b. Si resulta inválido, el proceso de calibración se desechará y se deberá realizar un nuevo proceso de calibración antes de analizar las muestras de los pacientes.

LIMITACIONES

1. Para ser utilizado con el kit Simplexa™ CMV.
2. Los analistas deben tener una buena formación y estar familiarizados con los procedimientos de las pruebas y la interpretación de los resultados antes de realizar la prueba.
3. El software Integrated Cyclers Studio conserva el último archivo de calibración válido para cuantificar muestras de pacientes desconocidas. Los patrones de cuantificación y las muestras de los pacientes deben extraerse utilizando la misma metodología de extracción. De lo contrario, los resultados obtenidos pueden ser erróneos.

REFERENCIAS

1. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.
2. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed. (1999).
3. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

Este prospecto está disponible en francés, alemán, italiano, español y portugués de Brasil en www.focusdx.com, y puede estar disponible en otros idiomas a través de su distribuidor local.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Alemania

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Teléfono: (800) 838-4548 (EE.UU. solamente) (562) 240-6500 (Internacional)
Fax: (562) 240-6510

ASISTENCIA TÉCNICA

Teléfono: (800) 838-4548 (EE.UU. solamente) (562) 240-6500 (Internacional)
Fax: (562) 240-6526

Visite nuestro sitio web en www.focusdx.com



PI.MOL2210.OUS.ES

Rev. B

Fecha de redacción: 21-oct-2011



Cypress, California 90630 EE.UU.