

## 1 Uso previsto

*RealCycler* GRIP-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ARN de Influenza A y B en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

## 2 Especificaciones

- **Sensibilidad:** 100 copias/μL Influenza A y 100 copias/μL Influenza B.
- **Especificidad:** Influenza A (genes M1 y M2 (matrix protein)) e Influenza B (genes M1 y M2 (matrix protein)).

## 3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* GRIP-G deben ser almacenados a -20°C.




El kit es estable a -20°C hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

## 4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. La amplificación de Influenza A se detecta en FAM, la de Influenza B en TxR y la del control interno en Alx532.

## 5 Composición

*RealCycler* GRIP-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix**, una **retrotranscriptasa** y un **Control Positivo ARN Influenza A**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
<b>AmpliMix</b>		1	1100 μL	-15 /-25 °C
<b>Retrotranscriptasa</b>		1	16 μL	-15 /-25 °C
<b>Control Positivo ARN FluA</b>		1	120 μL	-15 /-25°C

## 6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ARN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20°C)

## 7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

## 8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20°C hasta su uso.
- Utilizar ARN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

## 9 Procedimiento

### a) Extracción de ARN

### b) Protocolo

Stage 1				Stage 2				Stage 3				
Hold				Hold				Repeat 45 times.				
Temp	Secs	Optics		Temp	Secs	Optics		3-Temperature Cycle				
50.0	1200	Off		95.0	900	Off		Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	
								NA	95.0	15	Off	
								NA	60.0	30	On	
								NA	72.0	30	Off	
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage												

Selección de fluoróforos:

- FAM: detecta FluA.
- TxR: detecta FluB.
- Alx532: detecta el control interno.

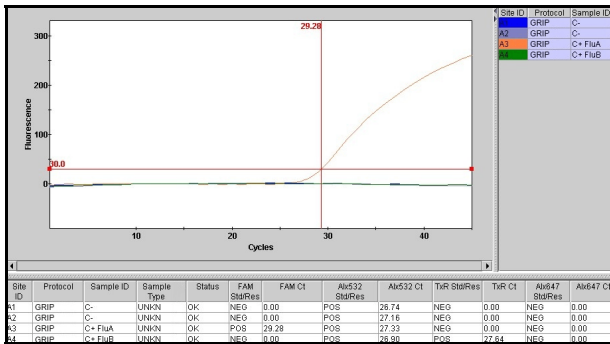
### c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo FluA**.
- Tomar una alícuota de **22,8 μL** de Amplimix, añadir **0,3 μL** de **retrotranscriptasa** y **7,5 μL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "GRIP-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

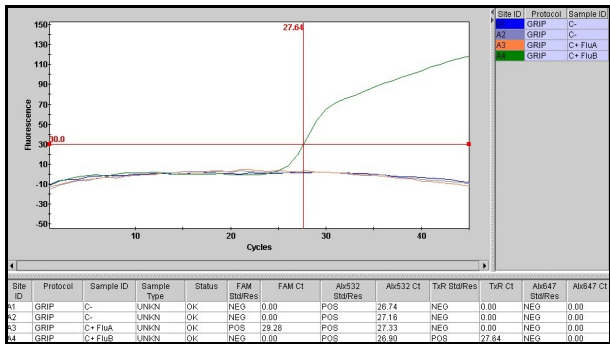
## d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	Indiferente	POSITIVO Influenza A
ND	POS	Indiferente	POSITIVO Influenza B
POS	POS	Indiferente	POSITIVO Influenza A y B
ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	NO VALORABLE

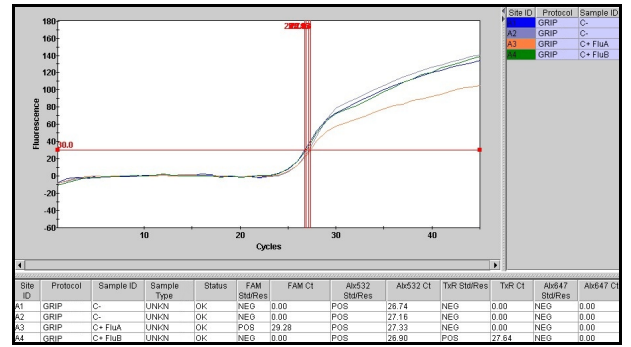
## e) Ejemplo de resultado



Gráfica 1 (Canal FAM: FluA): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal. Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=29,28. Control positivo FluB (A4 en verde): ausencia de señal.



Gráfica 2 (Canal TxR: FluB): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal. Control positivo FluA (A3 en naranja): ausencia de señal. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=27,64.



Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): se observa señal con Ct=26,74. Control negativo (A2 en gris): se observa señal con Ct=27,16. Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=27,33. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=26,90.

## 10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.

Cada lote del kit *RealCycler* GRIP-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

## 11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Febrero 2012.