



Reactivo de diagnóstico *in vitro*. Para usar solamente *in vitro*.



Información técnica y Certificado de Análisis

LightMix[®] Modular Zika Virus

Cat.-No. 64-0702-96

640

Roche SAP n° 08 048 495 001

Kit con reactivos para 96 reacciones de 20 µl para la detección del *Virus Zika* [liofilizada]
Para usar con los instrumentos Roche 480.

1. Contenido, composición, almacenamiento y caducidad **Almacenamiento a la llegada:**

- 1 Vial tapa **azul**, 96 reacciones Virus Zika (liofilizado)
 - 99.8% oligonucleótidos (<0,01pg)
 - 0.1% CAS 77-86-1 tris(hidroximetil)aminometano
 - 0.1% CAS 60-00-4 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- 1 Vial tapa **negra**, control positivo (Cp ~ 30, liofilizado)

Almacenar refrigerados o a temperatura ambiente,
No congelar los reactivos liofilizados.

- Los kits liofilizados son estables por al menos 6 meses (4 a 25°C en la oscuridad). Ver la caducidad del lote específico.
- Los reactivos disueltos son estables al menos por 2 semanas sin ser almacenados protegidos de la luz y refrigerados (4°C).
- Los reactivos disueltos pueden ser almacenados por un largo período de tiempo a -20°C (dentro de la fecha de caducidad). Evite múltiples ciclos de congelación-descongelación.

2. Reactivos adicionales necesarios

LightCycler[®] Multiplex RNA Virus Master

Cat.-No. 06 754 155 001

3. Datos de seguridad (MSDS)

El Producto no es peligroso ni tóxico, y no presenta restricciones IATA. El producto no es de origen humano, animal o vegetal. El producto contiene oligonucleótidos sintéticos (primers) y sondas. Según la directiva OSHA 29CFR1910.1200, *Commonwealth of Australia* [NOHSC:1005, 1008 (1999)] y las directivas de la Unión Europea 67/548/EC y 1999/45/EC cualquiera de los productos que no contengan más del 1% de componentes clasificados como peligrosos o carcinogénicos no requieren una ficha de seguridad (MSDS).

4. Precauciones y advertencias

El producto debe ser utilizado únicamente por personal cualificado. Usar las instrucciones específicas para el lote respectivo. No mezclar reactivos de lotes diferentes. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Desechar los reactivos no utilizados.

El flujo de trabajo del laboratorio ha de ajustarse a las prácticas estándar. Usar guantes protectores desechables, batas de laboratorio y protección ocular adecuada. Las muestras y los residuos deben ser considerados como potencialmente infecciosos. La preparación de los reactivos, extracción y PCR deben realizarse en zonas separadas físicamente. Limpiar y desinfectar las áreas de trabajo.

5. Patógeno e información del Target

El virus Zika es un Flavivirus transmitido por mosquitos vectores. La enfermedad es generalmente mucho más suave que las infecciones causadas por el dengue. Informes recientes de Brasil sugieren que las infecciones durante el embarazo pueden causar microcefalias.

Un fragmento de 86 pb del gen NS2A es amplificado y detectado con una sonda marcada con 640.

6. Uso previsto, material de muestra y Clasificación

Este kit es un ensayo en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa para instrumentos específicos para la detección cualitativa del ARN del virus Zika ARN a partir de extractos de ácido nucleicos de sangre (EDTA), plasma o suero de individuos con signos y síntomas de la infección del virus Zika o que han sido expuestos o están en riesgo de exposición al virus en conjunción con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos.

Código EDMA 15.04.40.90.00

CPV 33694000-1

País de origen: Alemania



7. Instrucciones de uso

7.1. MagNA Pure 96 Extracción de Ácidos Nucleicos automatizada

Para obtener instrucciones, equipos y materiales necesarios, referirse a las instrucciones de uso del instrumento y del kit de extracción.

Crear una orden de trabajo en el software del Magna Pure 96 con las siguientes especificaciones:

Order Type	Purification
MagNA Pure Kit Name	DNA/Viral NA LV 2.0
Protocol	Pathogen Universal 500 3.0
Volume, Sample	500 µl
Volume, Elution	100 µl
Internal Control (for use of Roche RPC)	RPC 1:4 (User defined)
Target Plate	MP96 Output Plate
Sample names	<i>Introduzca en su caso en la tabla de muestras</i>

Guardar y verificar que las cubiertas de los soportes de puntas de desecho están libres de puntas y que la cubierta de los residuos está en su lugar.

Para cada muestra, colocar 500 µl en un pocillo del cartucho de procesamiento del MagNA Pure 96 (placa fuente). Cargar los reactivos y consumibles apropiados y la placa fuente en el instrumento.

Cerrar la tapa de carga y empezar el ensayo. Una vez finalizado el ensayo, abrir la tapa de carga. Descargar el Magna Pure 96; retirar con cuidado la placa de salida que contiene los eluidos.

Mantener a los extractos de las muestras a 2-8 °C. Si no se utilizan inmediatamente, congelar a -80°C.

7.2. Programación instrumentos Roche 480

Ver el manual del operador para más detalles. Empezar la programación antes de preparar las soluciones.

Formato de detección Canal 640

Instrumento LightCycler® 480:

Instrumento LightCycler® 480 II:

Analizador cobas z 480 (canal abierto):

Set Quant Factor 10, Max Integration time 3 s

523-640

533-640

540-645

Para compensación de color ver instrucciones en **40-0320 Universal Color Compensation Hexaplex**

El protocolo consiste en 4 pasos del programa:

Program Step:	1. RT Step	2. Denaturation	3. Cycling			4. Cooling
Analysis Mode	None	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None

Tabla 1

7.3. Preparación de reactivo parámetro específico (PSR, 96 reacciones):

Manipular los reactivos y la *mastermix* en un lugar diferente al de las muestras y los controles positivos. Un vial de reactivo con la tapa **azul** contiene todos los primers y sondas para realizar 96+ reacciones.

Agregar 50 µl de agua grado PCR a cada vial de reactivo, mezclar la solución (*vortex*) y centrifugar.

Para pipeteado robótico el volumen puede ser aumentado hasta 55 µl (las señales disminuirán 10-20%).

► Usar **0.5 µl** de reactivo por cada 20 µl de reacción de PCR.

7.4. Preparación del control positivo

Agregar 160 µl de Buffer Tris libre de RNasas/DNasas o agua a el vial con la tapa **negra**, para 10 µl de volumen de muestra agregar **320 µl**. Mezclar pipeteando la solución arriba y abajo unas 10 veces. Si se ha usado el vortex, centrifugar para bajar la solución.

Nota: la apertura de estos viales puede provocar contaminaciones en el espacio de trabajo (aerosol). El uso del Buffer Tris con pH 8.0-8.5 incrementa la estabilidad a largo plazo de la solución. Almacenar congelados los controles disueltos.

► Usar **5 µl** de control positivo (≈ 1,000 copias) para una reacción de PCR de 20 µl (o 10 µl si se usaron 10 µl de muestra).

7.5. Mezcla de reacción de PCR dúplex

En un tubo de reacción refrigerado, preparar la mezcla de reacción individual (izquierda) o de una placa (derecha):

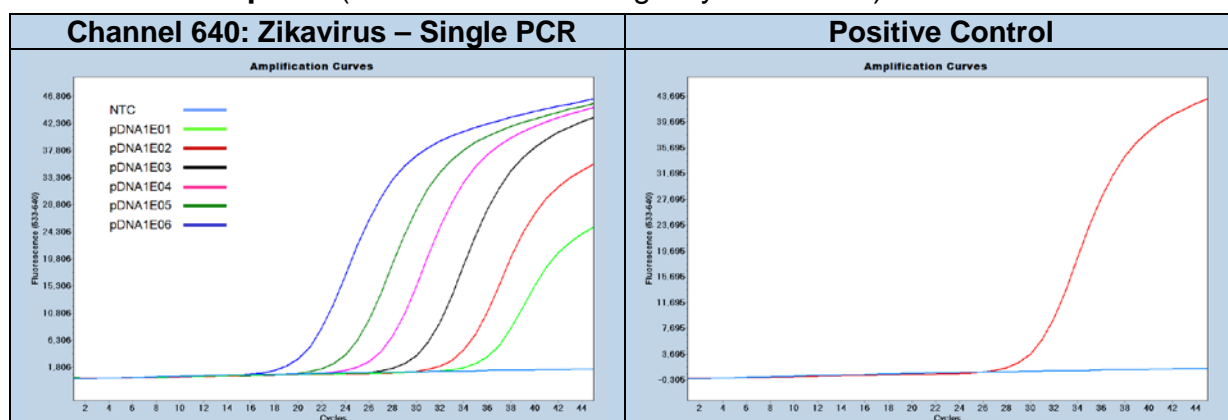
Para usar con el LightCycler® Multiplex RNA Virus Master de Roche		
10 µl extracto	Componentes	100 reacciones
3.9 µl	Agua, grado-PCR (tapa transparente, proporcionada con el kit Master Roche)	390 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos (reactivos parámetro específico que contienen primers y sondas)	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reacción de control EAV o Agua	50 µl
1.0 µl	Agua o ensayo de detección RPC (Roche vial 5)	100 µl
4.0 µl	Master Roche (Véase manual de Roche)	400 µl
0.1 µl	Enzima RT (Véase manual de Roche)	10 µl
10.0 µl	Volumen de la mezcla de reacción	1000 µl

Tabla 2

Agregar 10 µl de muestra o ADN de control a cada pocillo para un volumen final de reacción de 20 µl. Sellar la placa y centrifugar.

Start run

8. Resultados típicos (datos del sistema LightCycler® 480 II)



Líneas de dilución desde 1E6 hasta 10 copias /reacción

Figura 1

9. Lectura de los resultados

Realizar el análisis de datos como se describe en el manual del operador. Se recomienda usar el método "Second Derivative Maximum" (Automated (F" max)). Ver los resultados en el canal FAM con la compensación de color activada. Utilice el valor de cut-off del CoA (alrededor de un ciclo posterior de 10 copias). Verificar los resultados de interpretación del software para identificar supuestos de falsos-positivos y negativos. El control negativo (NTC) no debe mostrar ninguna señal

Canal 640 (muestra)	Canal 660 Reacción de control	Canal 640 Control Negativo	Resultados
No amplificación	Detectable	Negativo	No detectable
Amplificación Cp < cutoff	No relevante	Negativo	Positivo para Virus Zika
No amplificación	No detectable	No relevante	Fallo PCR, repetir
Señal de amplificación	No relevante	Positivo	Contaminación, repetir

Tabla 3

Los resultados negativos no excluyen una infección y no deben utilizarse como única base para las decisiones de gestión de pacientes.

10. Referencias

Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. Faye et al., (2013)
 Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections. Roth et al., (2014)

11. Datos de evaluación

Inclusividad. Este ensayo ha sido probado con ARN de la cepa de referencia MR766, aislados ArA 27290, ArD 30101 ARD , ArD 165522 , ArA 506/96, y muestras tomadas en 2015 en América del Sur y África.

Sensibilidad analítica. Si se combina con el kit ModularDx 66-0901-96 EAV como la reacción de control, el límite de detección está en el intervalo de 2,5 copias por PCR (0,25 copias por µl de extracto).

Exclusividad / Especificidad analítica . No se observaron reacciones cruzadas con el dengue, fiebre amarilla, Usutu , Sindbis , Mayaro, Nilo Occidental , encefalitis japonesa o ARN viral Chikungunya, o ADN de Plasmodium.

Sensibilidad del Diagnóstico/especificidad. En un estudio que compara los resultados con el ensayo recomendado CDC publicado por Lanciotti et al. incluyendo 104 muestras de plasma con 20 muestras positivas la concordancia fue del 100 %. La sensibilidad diagnóstica y el valor predictivo positivo (VPP) son del 100 % (95 % IC: 78,2 -100 %), especificidad diagnóstica y valor predictivo negativo (VPN) son del 100 % (95 % IC: 96,3 % -100 %).

12. Compatibilidad del panel tropical para PCR Multiplex

Este ensayo del Virus Zika se puede combinar con otros ensayos como se muestra a continuación:

Compensación de color 40-0320 obligatoria para PCR Multiplex

500	530	580	610	640	660
CHIK		Dengue		Zika	EAV or RPC

480 II	z 480	LC96	LC2.0	Nano
X	X			

Nota: El cobas z480 analyzer puede leer sea 500 como 530 en el primer canal


Tabla 4

13. Historial de versiones

notas rojas marcan los cambios en los procedimientos, notas azules cambio de secuencias

V160313 Primera versión

2016-06-06

Certificado de Análisis (CoA)							
Lote n°							
Fecha de caducidad:							
Dilución	1E6	1E5	1E4	PC	1E2	Corte	Aprobado
Rango Cp				29-32			
Medido							
Nivel de señal				35-50			
Medido							
Negativos	10/10						
<p>Nota: Los valores de CP (punto de cruce) recogidos con pADN (PCR un solo target). Los valores de Cp pueden variar de un instrumento a otro por hasta en 2 ciclos, mientras que la distancia entre dos puntos de dilución debe ser relativamente constante(ΔCp). Los niveles de Fluorescencia(FL) dependen de los ajustes del instrumento y pueden variar; los niveles de señal del analizador Cobas z480 son aproximadamente un 50% en comparación con los resultados del LC480 II.</p>							
QC Fecha de aceptación:				YYYYMMDD			
Nosotros, los abajo firmantes, certificamos que el producto designado arriba se ha obtenido en conformidad con las normas de producción y control de calidad.							
Nombre(s):							

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany
 Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM
 Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg

Distribuido por Roche - www.lifescience.roche.com