


ES	REF 1N017	Mix liofilizado para la detección cuantitativa de HSV -2 (virus del herpes simple tipo 2) en PCR en tiempo real	IVD
	STAT-NAT® HSV-2		
		REAGENT: 6 x (8 x 0.025) mL BUFFER: 1 x 1.5 mL + 1 x 1.0 mL STANDARD: 3 x (4 x 0.1) mL	 48
NOTA: El folleto de este paquete se debe leer atentamente antes de usar el producto. Se deben seguir las instrucciones del folleto. La fiabilidad de los resultados del ensayo no se puede garantizar si hay alguna desviación de las instrucciones del folleto de este paquete.			

USO INDICADO

El producto STAT-NAT® HSV-2 es un ensayo cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos en PCR en tiempo real para la identificación de HSV-21 en muestras de ADN extraídas de Plasma/BAL/Hisopo/CSF/Sangre Entera.

PRINCIPIO

STAT-NAT® HSV-2 permite la detección del ADN del VHS-2 en muestras de pacientes sintomáticos. El kit permite la identificación, a partir de muestras extraídas de Plasma/BAL/Hisopo/CSF/Sangre Entera²

STAT-NAT® HSV-2 es una prueba de PCR en - tiempo real liofilizada, que permite realizar un ensayo sin pasos manuales intermedios para configurar las mezclas de reacción. Su prueba de tubo único, compuesta por una mezcla de amplificación liofilizada y estable a temperatura ambiente, minimiza cualquier riesgo potencial derivado de errores de pipeteado y contaminación. La prueba STAT-NAT® HSV-2 consta de una mezcla de reacción optimizada, una enzima para la polimerización (polimerasa Hot Start), cloruro de magnesio, cebadores, sondas y dNTPs. El uso de una polimerasa Hot Start inhibe la actividad enzimática antes del inicio de los ciclos térmicos, permitiendo la disminución o la eliminación de productos no específicos. Los cebadores y sondas específicas garantizan la sensibilidad y la especificidad del producto.

El Control Interno (CI) endógeno (globina beta) del kit proporciona indicaciones sobre la funcionalidad del sistema y sobre la ausencia de inhibidores de la actividad de la polimerasa, lo que podría causar falsos negativos.

REACTIVOS

Los reactivos, correctamente almacenados a una temperatura de 15 a 30°C, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. Use sólo paquetes no dañados.

Componentes del kit:**REAGENT:**

6 tiras x 8 tubos de PCR de 0.2mL que contienen una master mix liofilizada compuesta por:

- MgCl₂;
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP);
- Polimerasa Hot Start Taq;
- Cebadores específicos;
- Sondas específicas;
- Tampón de reacción.

STANDARD:

3 Curvas estándar secas:

STAT-NAT® HSV-2 Standard 1 1 x 10³ copias/μL (tapón marrón)

STAT-NAT® HSV-2 Standard 2 1 x 10² copias/μL (tapón violeta)

STAT-NAT® HSV-2 Standard 3 1 x 10¹ copias/μL (tapón amarillo)

STAT-NAT® HSV-2 Standard 4 1 x 10⁰ copias/μL (tapón naranja)

BUFFER:

1 x 1.0 mL STAT-NAT® Reconstitution Buffer (tapón rojo)

1 x 1.5 mL STAT-NAT® STD Curve Buffer (tapón azul)

El STAT-NAT® STD Curve Buffer puede ser usado como Control sin Plantilla (NTC).

CALIBRACIÓN

Utilice únicamente los estándares suministrados en el kit.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Interno del ensayo da indicaciones sobre el funcionamiento del sistema y sobre la ausencia de inhibidores de polimerasa que podrían causar falsos negativos.

El ciclo de umbral esperado (C_t) del Control Interno está entre 10 y 16. Un C_t más alto podría estar relacionado con la mala calidad del ácido nucleico extraído.

Hay que validar cada ciclo de diagnóstico usando:

- un NTC (es decir, STAT-NAT® STD Curve Buffer)
- un control positivo (es decir, los puntos de la curva estándar)

MUESTRA

Plasma/BAL/Hisopo/CSF/Sangre Entera recogidos siguiendo el procedimiento de laboratorio adecuado.

EQUIPO DE INSTRUMENTOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Equipo general de laboratorio molecular: pipetas de volumen variable, plásticos estériles desechables, termociclador de PCR en tiempo real (instrumentos validados: Bio-Rad CFX96, ABI QuantStudio 5). **Reactivos:** Sistema de extracción de ADN, plantilla de ADN (los mejores resultados se obtienen con ADN de alta calidad).

NOTAS Y LIMITACIONES

Para evitar la obtención de resultados erróneos:

- examine el producto antes de usar para verificar que el contenido tiene un aspecto sólido y blanco (Figura 1). Deseche el producto que tenga signos de contaminación por humedad;
- El producto debe ser manejado por personal con la formación necesaria en técnicas de biología molecular, tal como extracción de ácidos nucleicos, amplificación y detección;
- Es necesario mantener separada la zona de extracción de la muestra, la zona de preparación del reactivo y la zona de amplificación/detección.

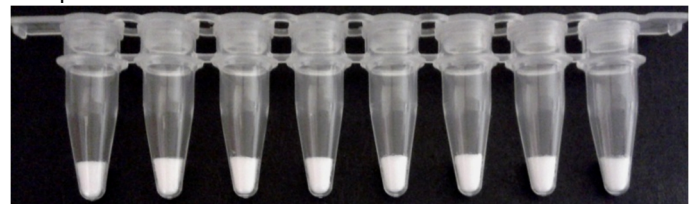


Figura 1

INSTRUCCIONES DE USO

Corte el sobre de aluminio en el punto indicado por las muescas laterales. Cada sobre de aluminio contiene una sola tira de 8 tubos y un pequeño gel de sílice naranja.

Saque las tiras del sobre. Se recomienda utilizar toda la tira de 8 tubos en una sola sesión. Conservar el kit a temperatura ambiente. **Asegúrese de que el sobre esté siempre bien sellado y de que el gel de sílice esté aún dentro.**

Elimine el sobre de aluminio y su contenido si el gel de sílice cambia de naranja a verde

PROCEDIMIENTO:**Ajustes de los parámetros cíclicos Real Time PCR:**

- antes de comenzar la reacción, encienda el equipo (ciclador térmico PCR en tiempo real y ordenador) y abra el programa específico correspondiente.
- Ajuste el detector para la sonda objetivo con reporter "FAM" e inhibidor "none".
- Ajuste el detector para el Control Interno de reacción con reporter "JOE/HEX/VIC" e inhibidor "none".
- Si fuera necesario, en el campo Passive Reference, seleccione "none".

Configuración de la reacción

- Extraiga el ADN de las muestras para que sea examinado (instrumentos Qiagen, Stratec) (sistema de extracción no incluido en el kit).
- Reconstituya cada mezcla STAT-NAT® HSV-2 Standard con 100 µL de STAT-NAT® STD Curve Buffer. Espere al menos otros 15 minutos antes del uso.
- Prepare los controles negativos.
- Disponga el número necesario de tubos de ensayo.
- Añada los componentes enumerados en la Tabla A a la mezcla liofilizada en cada tubo de ensayo.

Componentes	Volumen por tubo de ensayo/reacción
STAT-NAT® Reconstitution Buffer	15 µL
ADN extraído o STAT-NAT® HSV-2 Standard reconstituido o NTC	10 µL
Volumen final de reacción	25 µL

Tabla A

- La mezcla liofilizada se disolverá en pocos segundos;
- Asegúrese de que no hay burbujas de aire; si fuera así, elimínelas por aspiración con la punta de la pipeta;
- lleve a cabo la PCR en tiempo real usando el perfil térmico mostrado en la Tabla B.

Segmento	Número de ciclo	Temperatura	Tiempo	
1	1	95 °C	2 min	
2	10	95 °C	15 seg	Detección de la fluorescencia APAGADA
		60 °C	60 seg	
3	35	95 °C	15 seg	Detección de la fluorescencia ENCENDIDA
		60 °C	60 seg	

Tabla B

- Después de su uso deseche los residuos de los reconstituted STAT-NAT® HSV-2 Standards.

Validación de la sesión

El análisis de los resultados se lleva a cabo directamente utilizando el software de gestión específico.

El análisis de los resultados se lleva a cabo directamente en el instrumento utilizando el software de gestión específico.

Establezca los valores umbral como se indica en la tabla C:

Instrumento	FAM	JOE/HEX/VIC
BioRad CFX 96	5% de valor de fluorescencia en relación con el Estándar 1	5% del valor más alto de fluorescencia CI entre las muestras
ABI Quant Studio5		

Tabla C

Compruebe las curvas de amplificación de los controles positivos y negativos, como se indica en la siguiente tabla (Tabla D):

Estándar	Interpretación	
	FAM (C _t)	Resultado
Est.1	18.1 ± 2	VÁLIDO
Est.2	21.4 ± 2	VÁLIDO
Est.3	24.7 ± 2	VÁLIDO
Est.4	28.0 ± 2	VÁLIDO
NTC	No hay señal	VÁLIDO
NTC	Señal	NO VÁLIDO

Tabla D

Valores esperados para las curvas de amplificación	
R ² > 0.98	Pendiente < -3.0

Tabla E

La sesión se considerará NO VÁLIDA y se repetirá en caso de que:

- el Control Negativo / NTC haya dado un resultado positivo.
- muestras con resultados negativos no mostraran una amplificación correspondiente al control interno (JOE/HEX/VIC).

La Figura 2 muestra ejemplos de curvas de amplificación en una escala lineal

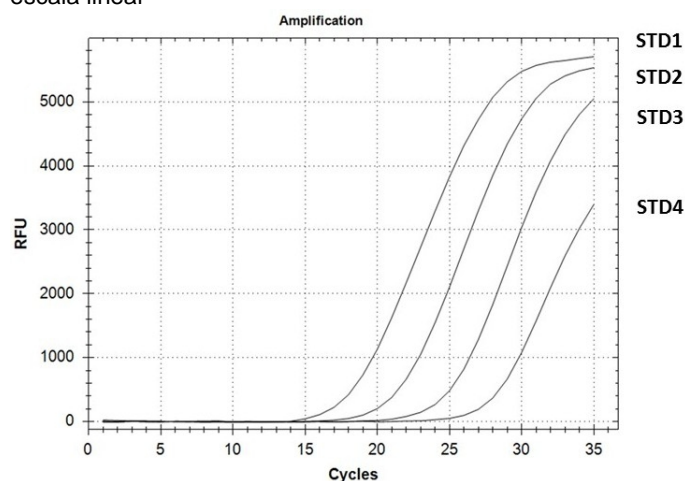


Figura 2

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- La señal FAM indica la amplificación exitosa de la secuencia específica para la identificación HSV-2;
- La señal HEX/JOE/VIC indica la amplificación exitosa de la secuencia específica para el Control Interno (Tabla F).

Detección HSV-2	Interpretación		Resultado
	FAM	HEX/JOE/VIC (C.I.)	
SÍ	SÍ	SÍ	VÁLIDO
SÍ	SÍ	NO	VÁLIDO*
NO	NO	SÍ	VÁLIDO#
-	NO	NO	NO VÁLIDO

Tabla F

*Las muestras muy concentradas podrían inhibir la amplificación del Control interno.

#En muestras que resulten negativas, no se excluye que haya una concentración de ADN HSV-2 inferior al límite de sensibilidad del ensayo.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD^{3,4}

Límite de detección (LoD)

La sensibilidad analítica del ensayo, como límite de detección, se determinó utilizando un panel de dilución de ADN HSV-2 de 10^6 a 2 copias/reacción.

LOD se calculó sobre 30 réplicas de muestras con una concentración de 10 copias/reacción con un 95% de probabilidad de tener un resultado positivo (Tabla G).

Límite de cuantificación (LoQ)

La menor concentración de ADN en una muestra que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables en las condiciones de prueba establecidas.

LOQ se calculó sobre diferentes niveles decrecientes obtenidos por diluciones x 30 réplicas con un 95% de probabilidad de tener un resultado positivo (Tabla G).

Límite de detección	
95%	10 copias/reacción
Límite de cuantificación	
95%	10 copias/reacción

Tabla G

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos utilizando la regresión lineal probit.

REACTIVIDAD CRUZADA

Para evaluar la reactividad cruzada con varios patógenos, se probaron 6 patógenos virales diferentes (Tabla H).

Muestra	Resultado	Pasa (S/N)
EBV	No hay amplificación	Y
BKV	No hay amplificación	Y
HSV-1	No hay amplificación	Y
HSV-2	Amplificación	Y
HHV-6	No hay amplificación	Y
ADN	No hay amplificación	Y
CMV	No hay amplificación	Y

Tabla H

Linealidad:

- entre 10^5 y 10^7 copias/reacción (Bio-Rad CFX96)
- entre 10^5 y 10^8 copias/reacción (ABI QuantStudio5)

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS:

Señal débil o ausente en el Control Positivo:

- Las condiciones del Real-Time PCR no cumplen con las instrucciones del folleto del kit:
 - El Control Positivo no fue añadido a la reacción. Repetir la prueba;
 - Controlar el protocolo de parámetros cíclicos de la PCR en tiempo real PCR y seleccionar los canales de fluorescencia indicados en el folleto del kit.
- Degradación de cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento del reactivo no cumplen con las instrucciones del folleto del kit:
 - Comprobar las condiciones de almacenamiento;
 - Comprobar la fecha de caducidad del kit.

Señal débil o ausente en el Control Interno.

- Efecto inhibitor de la muestra: ADN genómico con una extracción de baja calidad. El resultado es NO VÁLIDO:
 - Asegúrese de utilizar un método de extracción de ADN validado y siga cuidadosamente las instrucciones que figuran en el folleto del kit.
 - Repetir la prueba usando la misma muestra de ADN extraída. Si el resultado sigue siendo negativo, repita el paso de extracción utilizando la misma muestra primaria. De lo contrario, recoja una nueva muestra primaria y repita la prueba.
- Error de pipeteado: Reactivos o ausencia de muestra:
 - Repetir la prueba.
- Degradación de cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento del reactivo no cumplen con las instrucciones del folleto del kit:
 - Comprobar las condiciones de almacenamiento.
 - Comprobar la fecha de caducidad del kit.
- Selección errónea del canal/filtro. Las condiciones de la PCR en tiempo real no cumplen con las instrucciones del folleto del kit:
 - Controlar el protocolo de parámetros cíclicos de la PCR en tiempo real y seleccionar los canales de fluorescencia indicados en el folleto del kit.

No hay señal FAM o JOE/HEX/VIC:

- Efecto inhibitor de la muestra: ADN genómico con una extracción de baja calidad. El resultado puede ser un falso negativo. El resultado es NO VÁLIDO:
 - Asegúrese de utilizar un método de extracción de ADN validado y siga cuidadosamente las instrucciones que figuran en el folleto del kit.
- El producto podría contener contaminación por humedad:
 - Comprobar las condiciones de almacenamiento del kit; asegurarse de que el sobre esté siempre bien sellado y de que el gel de sílice esté aún dentro.
 - Comprobar si el gel de sílice pasa de naranja a verde.
 - Comprobar la fecha de caducidad del kit.

Señal FAM o en el Control Negativo:

- Contaminación durante el procedimiento de preparación de la PCR en tiempo real: todos los resultados son NO VÁLIDOS:
 - Limpiar el banco de trabajo y todos los instrumentos;
 - Manipular el control positivo al final del procedimiento de PCR en tiempo real;
 - Repetir la PCR en tiempo real usando un nuevo juego de reactivos.

Variabilidad de la intensidad de la fluorescencia:

- La Master Mix no está bien reconstituida:
 - Repetir el procedimiento de PCR en tiempo real cuidadosamente.
- Burbujas de aire atrapadas en los tubos de PCR:
 - Eliminar las burbujas de aire antes de iniciar el ciclo de PCR en tiempo real.

No hay ninguna señal:

- Comprobar el rendimiento del ciclador térmico:
 - Realizar la calibración del instrumento.
- Degradación de cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento del reactivo no cumplen con las instrucciones del folleto del kit:
 - Comprobar las condiciones de almacenamiento.
 - Comprobar la fecha de caducidad del kit.

Mensaje de error dado por el instrumento de PCR en tiempo real:

Consultar el Manual de usuario del instrumento o ponerse en contacto con el soporte técnico local.

Muestras duplicadas no reproducen resultados idénticos. Los valores de C_t de muestras idénticas pueden diferir en reacciones individuales. Variaciones $C_t > \pm 2$ sugieren errores de pipeteado u otras diferencias entre las muestras duplicadas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este ensayo es exclusivamente para uso diagnóstico IVD.
- Lea todas las instrucciones incluidas en el folleto del kit antes de realizar la prueba.
- Cumpla con la fecha de caducidad del kit.
- Siempre use DPI para la protección individual.
- No use reactivos de otros kits comerciales.
- No mezcle reactivos de kits con diferentes números de lote.
- Las MSDS están disponibles en www.sentinelagnostics.com o en su proveedor local.
- Mantenga el REAGENT protegido de la luz en su envoltura de aluminio.
-  **ATENCIÓN:** Este producto requiere el uso de muestras humanas. Se recomienda considerar todos los materiales de origen humano potencialmente infecciosos y manipularlos según la norma OSHA sobre agentes patógenos de transmisión sanguínea⁵. Aplicar el nivel de bioseguridad 2⁶ u otras prácticas de bioseguridad adecuadas^{7,8} para los materiales que contienen o se sospecha que contienen agentes infecciosos.
- Se debe evitar la contaminación por heparina de las muestras extraídas. La heparina es un fuerte inhibidor de la polimerasa y podría causar falsos negativos. Las muestras de sangre periférica deben recogerse en tubos EDTA como procedimiento de laboratorio.
- Los reactivos se deben eliminar de acuerdo con la normativa local
- Controle y elimine todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Todo el material que entre en contacto con la muestra biológica se debe tratar con hipoclorito de sodio al 0.5% durante al menos 30 minutos o esterilizar en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y después desechar.

BIBLIOGRAFÍA





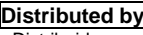









- 1) Jaishankar D, Shukla D. Genital herpes: insights in to sexually transmitted infectious disease. *Microb Cell*. 2016; 3(9): 438-450.
- 2) Aliabadi N, Jamalidoust M, Asaei S, Namayandeh M, Ziyaeyan M. Diagnosing of herpes simplex virus in-fectios in suspected patients using real-time PCR. *Jundishapur J Micobiol*. 2015 February; 8(2):e16727
- 3) CLSI. *Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases*. 3rd ed. CLSI report MM03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 4) CLSI. *Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI document MM06-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

- 5) US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
- 6) US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th Ed. Washington,DC: US Government Printing Office, January 2007.
- 7) World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2004.
- 8) Sewell DL, Bove KE, Callihan DR, et al. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline — Third Edition (M29-A3)*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
- 9) European Standard. *Performance evaluation of in vitro diagnostic medical devices EN 13612*. March 2002

Explicación de símbolos ES

REAGENT / STANDARD / CONTROL / BUFFER

El término se refiere al único reactivo / estándar / control/ buffer

 Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Número de catálogo	 Código de lote
 Contenido del kit	 Distribuido por	 Fabricante
 Precaución, consulte los documentos adjuntos Consulte las instrucciones de uso	 Límite de temperatura	 Usar antes del
 No reutilizar	 No exponga el REAGENT a la luz	 Desechar adecuadamente
 Fecha de fabricación	 Contiene suficiente para <n> pruebas	

STAT-NAT® es una marca comercial en varias jurisdicciones que está exclusivamente autorizada a SENTINEL CH. SpA. STAT-NAT® technology está protegida mediante la patente nº WO2010133628 A1.

Nota: una barra vertical en el margen del texto indica los cambios en comparación con la versión anterior.