

ES	REF 1N053	Mezcla liofilizada PCR en tiempo real para la detección de la especie <i>Leishmania</i> spp.	IVD
	STAT-NAT[®] Leishmania spp.		CE
Cont.		48 (6x8) tubos de ensayo de 0.2 mL que contienen mezcla liofilizada para reconstituir con 25 µL	
NOTA: lea atentamente el folleto antes del uso. Siga estrictamente las instrucciones.			

USO INDICADO

STAT-NAT[®] *Leishmania* spp. es una prueba de PCR multiplex cualitativa en tiempo real para la identificación de la leishmaniosis en ADN extraído de sangre entera recogida en tubos EDTA. Es una prueba diagnóstica aplicable ante la presencia de un posible caso de leishmaniosis. El ensayo es capaz de identificar la presencia de especies que pertenecen al género *Leishmania* que afectan a humanos. El kit incluye también un juego de cebadores (y una sonda) para la amplificación de un Control Interno.

PRINCIPIO

STAT-NAT[®] *Leishmania* spp. es una mezcla liofilizada para amplificación del ADN de un ensayo/un tubo que permite la ejecución de un ensayo sin la preparación manual de mezclas de reacción. La configuración en alícuotas pequeñas, liofilizadas, estables a temperatura ambiente minimiza todos los posibles riesgos derivados de la contaminación y de los errores de pipeteado. STAT-NAT[®] *Leishmania* spp. está compuesto por un tampón optimizado de reacción, una enzima polimerasa (polimerasa Hot Start Taq), cloruro de magnesio, cebadores, sondas y dNTPs. El uso de polimerasa Hot Start reduce la formación de productos de amplificación no específicos debido a la inhibición de la actividad enzimática a bajas temperaturas. Los cebadores y sondas específicos garantizan la sensibilidad y la especificidad del ensayo.

REACTIVOS

Los reactivos, correctamente almacenados a una temperatura de 15 a 30°C, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en el envase.

COMPONENTES DEL KIT:

6 strips de PCR para 8 tubos, que contienen una mezcla liofilizada compuesta por:

- MgCl₂;
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP);
- Polimerasa Hot Start Taq;
- cebadores específicos;
- sondas específicas;
- tampón de reacción.

Para reconstituir con 25 µL.

INSTRUMENTOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Equipo habitual de laboratorio molecular: pipetas de volumen variable, plásticos estériles desechables, sistema de extracción de ADN y ciclador térmico PCR en tiempo real. **Reactivos:** agua (use solo agua para PCR), plantilla ADN (los mejores resultados se obtienen con ADN de alta calidad), controles positivos y negativos.

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.

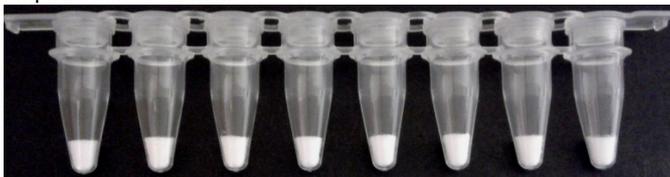


Figura 1

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 la tira 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:

1. Extraiga el ADN de las muestras para que sea examinado (sistema de extracción no incluido en el kit);
2. prepare los controles positivos y negativos (control negativo *Leishmania* y control sin plantilla, NTC), controles no suministrados;
3. antes de comenzar la reacción, encienda el equipo (ciclador térmico PCR en tiempo real y ordenador) y abra el programa específico correspondiente;
4. ajuste el detector para la sonda de *Leishmania* con reporter "FAM" e inhibidor "none";
5. ajuste el detector para el Control Interno de reacción con reporter "JOE" e inhibidor "none";
6. en el campo de Referencia Pasiva, seleccione "none";
7. saque del kit el número de tubos de ensayo necesario;
8. añada los componentes enumerados en la **Tabla A** a la mezcla liofilizada en cada tubo de ensayo, excepto para NTC donde hay que añadir solo agua para PCR. La mezcla liofilizada se disolverá en pocos segundos;

Componentes	Volumen por tubo/reacción
ADN extraído (≈100 ng/µL)	1-5 µL
Agua para PCR	Hasta un volumen final de 25 µL
Volumen final de reacción	25 µL

Tabla A

9. asegúrese de que no hay burbujas de aire; si fuera así, elimínalas por aspiración con la punta de la pipeta;
10. lleve a cabo el PCR en tiempo real usando el perfil térmico mostrado en la **Tabla B**.

Segmento	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	10 min
2	45	95 °C	15 seg
		60 °C	60 seg

Tabla B

El perfil térmico sugerido fue probado con cicladores térmicos Applied Biosystems series 7000.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Analice los resultados usando un software específico.

El análisis de los datos fluorescentes debe ser llevado a cabo de esta manera:

- analice individualmente la sonda *Leishmania* (FAM) y el Control Interno (JOE);
- ajuste los niveles basales introduciendo el primer y el último ciclo en los que no se han observado cambios en fluorescencia;
- ajuste el umbral de amplificación.

Normalmente, los ciclos de umbral (Cts) de los fragmentos amplificados están entre 20 y 30. Valores Ct diferentes podrían indicar niveles de infección muy altos (menos de 20 Ct) o muy bajos (más de 30 Ct). Si los Cts están por debajo de 20, se recomienda repetir el análisis, diluyendo la cantidad inicial de ADN extraído. Si los Cts están por encima de 30, se recomienda repetir el análisis, aumentando la cantidad inicial de ADN extraído para confirmar los datos.

La reacción NO se considera válida y debe repetirse si:

- las muestras negativas *Leishmania* muestran una amplificación que no corresponde con el Control Interno;
- NTC presenta amplificación.

La **Figura 2** muestra ejemplo de curvas de amplificación en una escala lineal.

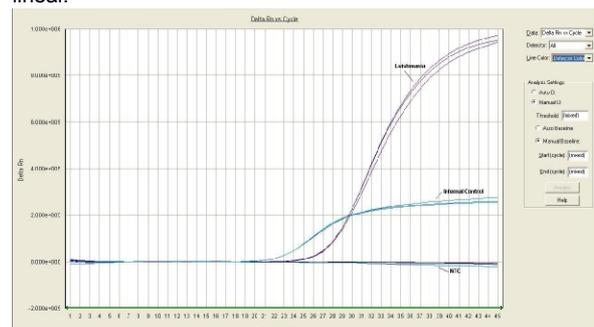


Figura 2

Para muestras que se demuestran correctamente negativas, no debe excluirse que haya una concentración de ADN *Leishmania* más baja del límite de detección del sistema.

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. Se recomienda encarecidamente validar cada ciclo de análisis introduciendo un control positivo y otro negativo.

Como control negativo se puede utilizar una muestra diagnosticada previamente como negativa.

Como control positivo, se puede utilizar una muestra diagnosticada previamente como positiva.

Como NTC, puede usarse agua para PCR.

Se recomienda utilizar una muestra positiva de nivel medio para validar el ciclo de análisis.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

• SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Límite de detección

La sensibilidad analítica del ensayo, como límite de detección, se determine utilizando un panel de dilución de *Leishmania* ADN en el rango de concentración limitante. Los valores se asignaron utilizando el siguiente procedimiento experimental (Tabla C):

Sesiones	Ensayo por sesión
5	5 niveles x 10 duplicados

Tabla C

La sensibilidad analítica de este ensayo identifica la presencia de 5 parásitos por reacción.

Los límites de detección se calcularon con una probabilidad entre el 95% y el 50% de tener un resultado positivo (Tabla D).

Límite de detección	
95%	5 parásitos/prueba
50%	1 parásito/prueba

Tabla D

• SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA Y ESPECIFICIDAD

Muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como positividad de la muestra clínica, se evaluó con el análisis de muestras previamente diagnosticadas en el centro de referencia con las pruebas de referencia estándar.

Muestras negativas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como negatividad clínica de la muestra, se evaluó con el análisis de un panel de muestras negativas. Los resultados se muestran en la Tabla E.

Muestras	Esperados	Encontrados	
		Positivo	Negativo
Muestras positivas	28	28	0
Muestras negativas	50	0	50

Tabla E

Tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo corresponden a un 100%.

CONSISTENCIA

• CONTAMINACIÓN CRUZADA

La consistencia del ensayo, como ausencia de contaminación cruzada, se evaluó utilizando un panel de positivos fuertes y negativos. El panel contenía 10 muestras, cinco negativas y cinco positivas fuertes, que se analizaron en posiciones alternas. No se obtuvo evidencia de contaminación cruzada y todos los negativos se confirmaron como se muestra en la Tabla F.

Panel de muestras alternadas positivas y negativas	Esperados	Encontrados	
		Positivo	Negativo
Muestras positivas	5	5	0
Muestras negativas	5	0	5

Tabla F

PRECAUCIONES PARA EL USO

Este ensayo es exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Las muestras de sangre periférica se deben recoger en EDTA según lo indicado en los procedimientos de laboratorio y almacenarlos a 2-8 °C durante tres días como máximo. Se puede almacenar durante un máximo de 30 días a -20 °C.

Se debe evitar la contaminación por heparina de las muestras extraídas. La heparina es un inhibidor fuerte de la polimerasa y podría causar falsos negativos.

Además de los posibles riesgos relacionados con los componentes reactivos, los productos pueden contener componentes no reactivos como los conservantes (azida sódica u otros) y detergentes.

La concentración total de estos componentes es inferior a los límites indicados en las directivas 67/548/CEE, 1999/45/CE y la Norma EC 1272/2008 (CLP) y las modificaciones subsiguientes sobre la clasificación, el etiquetado y el embalaje de preparaciones peligrosas se han llevado a cabo consecuentemente.

No obstante, se recomienda manejar los reactivos con cuidado y evitar la ingestión y el contacto con los ojos, la piel y las mucosas, y utilizar los reactivos según las buenas prácticas de laboratorio. 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. Siempre use dpi para la protección individual. Lea todas las instrucciones incluidas en el folleto del kit antes de realizar la prueba. Siga estrictamente las indicaciones del folleto del kit. No coma, fume ni beba en la zona de trabajo. Cumpla con la vida en almacenamiento del kit. Use solamente los reactivos incluidos en el kit. No use reactivos de otros kits comerciales para la prueba.

TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Los reactivos se deben eliminar de acuerdo con la normativa local.

BIBLIOGRAFÍA

- Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
- Innis H, Gelfant D, Sninsky J, White T. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York, 1990.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction Methods Enzymol. 1987; 155:335-50.
- Park DJ. PCR Protocols: Third Edition. Methods in Molecular Biology. Springer Protocols. Human Press 2011.
- Patent No. WO2010133628 A1. A dried and stabilized ready-to-use composition containing nucleic acid polymerization enzymes for molecular biology applications
- Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20-22 March 2007 Ref: WHO/CDS/NTD/IDM/2007.5
- Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature reviews & Microbiology Vol.5, Nov.2007, 873.
- White TJ, Arnheim N, Erlich HA. The polymerase chain reaction. Trends Genet. 1989;5(6):185-9.

ES

Explicación de símbolos

REAGENT / STANDARD / CONTROL / BUFFER
El término se refiere al único reactivo / estándar / calibrador / control/ diluyente /

 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	 No reutilizar
 Desechar adecuadamente	 Usar antes del	 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. La tecnología STAT-NAT® 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.