

|  |                             |   |  |
|--|-----------------------------|---|--|
| <b>ES</b>  | <b>REF 1N014</b>            | <b>Mezcla liofilizada para la detección cuantitativa de Adenovirus en PCR en tiempo real</b>  | <b>IVD</b>   |
|  | <b>STAT-NAT® Adenovirus</b> | REACTIVO: 6 x (8 x 0,025) mL<br>BUFFER: 1 x 1,5 mL + 1 x 1,0 mL<br>ESTÁNDAR: 3 x (4 x 0,1) mL |  48 |
| NOTA: Este prospecto debe leerse detenidamente antes de utilizar el producto. Deben seguirse las instrucciones del prospecto. No se puede garantizar la fiabilidad de los resultados del ensayo si hay alguna desviación de las instrucciones de este prospecto. |                             |   |  |

**USO PREVISTO**

El producto STAT-NAT® Adenovirus es un ensayo cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos en PCR en tiempo real para la identificación de Adenovirus1 en muestras de ADN extraídas de Plasma/BAL/Swab/CSF/Aspirado de Bronco/Hisopo Nasofaríngeo.

**PRINCIPIO**

STAT-NAT® Adenovirus permite la detección de Adenovirus en muestras de pacientes sintomáticos sospechosos de infección respiratoria aguda o gastroenteritis. Los niños y los individuos inmunocomprometidos se ven más afectados por las infecciones por Adenovirus. El kit permite la identificación, a partir de muestras extraídas de Plasma/ BAL/ Swab/ CSF/ Aspirado de Bronco/ hisopo nasofaríngeo2.

STAT-NAT® Adenovirus 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 pipeteo y contaminación. La prueba STAT-NAT® Adenovirus consta de una mezcla de reacción optimizada, una enzima para la polimerización (Hot Start Polymerase), 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, lo que permite reducir o eliminar los productos no específicos. Los cebadores y las sondas específicas garantizan la sensibilidad y la especificidad del producto.

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

**REACTIVOS**

Los reactivos, almacenados correctamente a 15-30°C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. Utilizar sólo los envases no dañados.

**Componentes del kit:****REACTIVO:**

6 tiras x 8 tubo de PCR de 0,2 mL que contiene una mezcla maestra liofilizada compuesta por:

- MgCl<sub>2</sub>;
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP);
- Polimerasa Taq Hot Start;
- Cartillas específicas;
- Sondas específicas;
- Tampón de reacción.

**ESTÁNDAR:**

3 x Curvas estándar secas:

STAT-NAT® Adenovirus Estándar 1 2 x 10<sup>3</sup> copias/ µL (tapa marrón) STAT-NAT® Adenovirus Estándar 2 2 x 10<sup>2</sup> copias/ µL (tapa violeta) STAT-NAT® Adenovirus Estándar 3 2 x 10<sup>1</sup> copias/ µL (tapa amarilla) STAT-NAT® Adenovirus Estándar 4 2 x 10<sup>0</sup> copias/ µL (tapa naranja)

**BUFFER:**

1 x 1,0 mL de tampón de reconstitución STAT-NAT® (tapa roja) 1 x 1,5 mL de tampón de curva STAT-NAT® (tapa azul)

El tampón de la curva STAT-NAT® STD puede utilizarse como control sin plantilla (NTC).

**CALIBRACIÓN**

Utilice únicamente los estándares suministrados en el kit.

**CONTROL DE CALIDAD**

El control interno del ensayo proporciona indicaciones sobre la funcionalidad del sistema y sobre la ausencia de inhibidores de la polimerasa que podrían causar falsos negativos.

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

Es necesario validar cada ejecución de diagnóstico utilizando:

- un NTC (es decir, el tampón de la curva STAT-NAT® STD)
- un control positivo (es decir, puntos de la curva estándar)

**MUESTRA**

Plasma/BAL/Swab/CSF/Aspirado de Bronco/ Hisopo Nasofaríngeo. recogidos siguiendo el procedimiento de laboratorio adecuado.

**INSTRUMENTOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**

**Equipo general de laboratorio molecular:** pipetas de volumen variable, plásticos estériles desechables, termociclador para 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 resultados erróneos:

- Examine el producto antes de utilizarlo para comprobar que el contenido tiene un aspecto sólido y blanco (Figura 1). Deseche el producto que aparezca con signos de contaminación por humedad.
- El producto debe ser manipulado por personal formado en técnicas de biología molecular, como la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos.
- Es necesario mantener separadas la zona de extracción de muestras, la zona de preparación de reactivos y la zona de amplificación/detección.

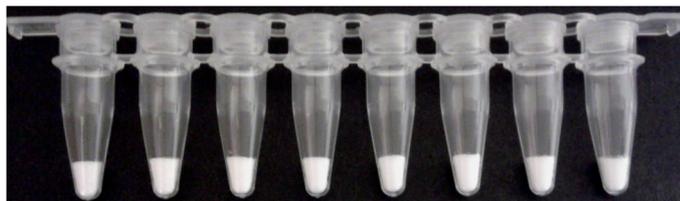


Figura 1

**INSTRUCCIONES DE USO**

Cortar la bolsa de aluminio en el punto indicado por las muescas laterales. Cada bolsa de aluminio contiene una única tira de 8 tubos y un pequeño gel de sílice de color naranja, el gel de sílice se vuelve verde en presencia de humedad. Saque las tiras de la bolsa y se recomienda utilizar una sola tira de 8 tubos en una sola sesión.

**Asegúrese de que la bolsa esté siempre bien cerrada y que el gel de sílice siga dentro.**

Desperdiciar la bolsa de aluminio y su contenido si el gel de sílice pasa de naranja a verde

**PROCEDIMIENTO:****Ajuste de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real:**

1. Antes de iniciar la reacción, encienda el equipo (termociclador de PCR en tiempo real y ordenador) y abra el programa de software dedicado.
2. Configure el detector para la sonda objetivo con reporter "FAM" y quencher "none".
3. Configure el detector para el Control Interno de la reacción con reporter "JOE/HEX" y quencher "none".
4. En el campo Referencia pasiva, si se solicita, seleccione "ninguna".

**Configuración de la reacción**

1. Extraer el ADN de las muestras a examinar (Qiagen, Stratec Instruments) (sistema de extracción no incluido en el kit).
2. Reconstituya y mezcle cada estándar de adenovirus STAT-NAT® con 100 µL de tampón de curva STAT-NAT® STD. Espere al menos 15 minutos antes de utilizarlo.
3. Prepare los controles negativos.
4. Disponga el número necesario de tubos de ensayo.
5. Añada los componentes enumerados en la Tabla A a la mezcla liofilizada en cada tubo de ensayo.

| Componentes   | Volumen por prueba tubo/reacción |
|---|----------------------------------|
| Tampón de reconstitución STAT-NAT                                   | 15 µL                            |
| ADN extraído o estándar de adenovirus STAT-NAT® reconstituido o NTC | 10 µL                            |
| <b>Volumen de reacción final</b>                                    | <b>25 µL</b>                     |

**Tabla A**

6. La mezcla liofilizada se disolverá en pocos segundos.
7. Asegúrese de que no hay burbujas de aire; si es así, elimínelas por aspiración con la punta de la pipeta.
8. Realice la PCR en tiempo real utilizando el perfil térmico mostrado en la Tabla B.

| Segm. | Número de ciclo | Temperatura | Tiempo      |                               |
|-------|-----------------|-------------|-------------|-------------------------------|
| 1     | 1               | 95 °C       | 2 minutos   |                               |
| 2     | 10              | 95 °C       | 15 segundos | Fluorescencia detección OFF   |
|       |                 | 60 °C       | 60 segundos |                               |
| 3     | 35              | 95 °C       | 15 segundos | Detección de fluorescencia ON |
|       |                 | 60 °C       | 60 segundos |                               |

**Tabla B**

9. Después de su uso, deseche el residuo de los Estándares de Adenovirus STAT- NAT® reconstituidos

**Validación de la sesión**

El análisis de los resultados se realiza directamente con el software de gestión específico. Establezca los valores de los

umbrales como se indica en la tabla C:

| Instrumento       | FAM   | JOE/HEX |
|-------------------|-------|---------|
| BioRad CFX 96     | 300   | 200     |
| ABI Quant Studio5 | 60000 | 30000   |

**Tabla C**

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

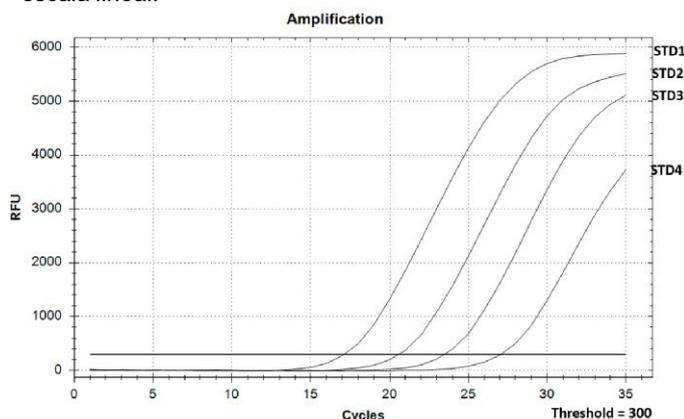
| Estándar | Interpretación |           |
|----------|----------------|-----------|
|          | FAM (Ct)       | Resultado |
| San 1    | 17 ±1,5        | VALIDO    |
| St.2     | 20 ±1,5        | VALIDO    |
| San 3    | 23 ±1,5        | VALIDO    |
| San 4    | 26 ±1,5        | VALIDO    |
| Neg. C.  | No hay señal   | VALIDO    |
| Neg. C.  | Señal          | NO VALIDO |

**Tabla D**

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

- El control negativo / NTC proporcionó un resultado positivo;
- Las muestras con resultados negativos no mostraron una amplificación del control interno (JOE/HEX).

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 de Adenovirus;
- La señal HEX/JOE indica la amplificación exitosa de la secuencia específica para el Control Interno (Ver Tabla E).

| ADENOVIRUS Detección | Interpretación |                |           |
|----------------------|----------------|----------------|-----------|
|                      | FA             | JOE/HEX (I.C.) | Resultado |
| SI                   | SI             | SI             | VALIDO    |
| SI                   | SI             | NO             | VALIDO*   |
| NO                   | NO             | SI             | VALIDO#   |
| -                    | NO             | NO             | NO VALIDO |

**Tabla E**

\*Las muestras con alta concentración de adenovirus podrían inhibir la amplificación del control interno.

# En las muestras que son negativas, no se excluye que haya una concentración de ADN de Adenovirus inferior al límite de sensibilidad del ensayo.

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD<sup>3,4</sup>****Límite de detección (LoD)**

La sensibilidad analítica del ensayo, como límite de detección, se determinó utilizando un panel de dilución de ADN de Adenovirus de <sup>106</sup> a 2 copias/reacción.

El LOD se calculó sobre 30 réplicas de muestras con una concentración de 20 copias/reacción con un 95% de probabilidad de tener un resultado positivo (Tabla F).

**Límite de cuantificación (LoQ)**

La concentración más baja de ADN en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con una precisión y exactitud aceptables en las condiciones de prueba establecidas

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

| Límite de detección      |                        |
|--------------------------|------------------------|
| 95%                      | 20 ejemplares/reacción |
| Límite de cuantificación |                        |
| 95%                      | 20 ejemplares/reacción |

Tabla F

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la regresión lineal Probit.

**REACTIVIDAD CRUZADA**

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

| Muestra | Resultado            | Aprobado (sí/no) |
|---------|----------------------|------------------|
| EBV     | No hay amplificación | Sí               |
| BKV     | No hay amplificación | Sí               |
| VHS-1   | No hay amplificación | Sí               |
| VHS-2   | No hay amplificación | Sí               |
| HHV-6   | No hay amplificación | Sí               |
| ADN     | Amplificación        | Sí               |
| CMV     | No hay amplificación | Sí               |

Tabla G

**Linealidad:**

- entre 20 y <sup>107</sup> copias/reacción (Bio-Rad CFX96)
- entre 20 y <sup>108</sup> copias/reacción (ABI QuantStudio5)

**LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS:****Señal débil o nula en el Control Positivo:**

- Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
  - El Control Positivo no se añadió a la reacción. Repita la prueba;
  - Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit.
- Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
  - Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit;
  - Compruebe la fecha de caducidad del kit.

**Señal débil o nula en el Control Interno.**

- Efecto inhibitorio de la muestra: ADN genómico con una extracción de baja calidad. El resultado NO ES VÁLIDO:
  - Asegúrese de utilizar un método de extracción de ADN validado y siga cuidadosamente las instrucciones

indicadas en el prospecto del kit.

- Repita la prueba utilizando 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 pipeteo: Ausencia de reactivos o muestra:
    - Repite la prueba.
  - Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
    - Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit.
    - Compruebe la fecha de caducidad del kit.
  - Selección incorrecta del canal/filtro. Las condiciones de la PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
    - Compruebe el protocolo de los parámetros del ciclo de PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el inserto del kit.

**No hay señal FAM/HEX:**

- Efecto inhibitorio de la muestra: ADN genómico con extracción de baja calidad. El resultado podría ser un falso negativo. El resultado NO ES VÁLIDO:
  - Asegúrese de utilizar un método de extracción de ADN validado y siga cuidadosamente las instrucciones indicadas en el prospecto del kit.
- El producto podría contener contaminación por humedad:
  - Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit; asegúrese de que el sobre está siempre bien cerrado y de que el gel de sílice sigue dentro.
  - Compruebe si el gel de sílice pasa de naranja a verde.
  - Compruebe la fecha de caducidad del kit.

**señal FAM en el control negativo:**

- Contaminación durante el procedimiento de preparación de la PCR en tiempo real: todos los resultados NO SON VÁLIDOS:
  - Limpia el banco de trabajo y todo el instrumental;
  - Manipule el control positivo al final del procedimiento de PCR en tiempo real;
  - Repita la PCR en tiempo real utilizando un nuevo conjunto de reactivos.

**Variabilidad de la intensidad de la fluorescencia:**

- La mezcla maestra no está bien reconstituida:
  - Repita cuidadosamente el procedimiento de PCR en tiempo real.
- Burbujas de aire atrapadas en los tubos de PCR:
  - Elimine las burbujas de aire antes de iniciar la ejecución de la PCR en tiempo real.

**No hay señal en absoluto:**

- Compruebe el rendimiento del termociclador:
  - Realice la calibración del instrumento.
- Degradación de los cebadores/sondas: las condiciones de almacenamiento de los reactivos no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
  - Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit.
  - Compruebe la fecha de caducidad del kit.

**Mensaje de error dado por el instrumento de PCR en tiempo real:** Consulte el manual de usuario del instrumento o póngase en contacto con el servicio técnico local.

**Las muestras duplicadas no reproducen resultados idénticos.**

Los valores Ct de muestras idénticas pueden diferir en reacciones individuales. Las variaciones de Ct > ± 2 sugieren errores de pipeteo u otras diferencias entre muestras duplicadas.

**ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES**

- Este ensayo es exclusivamente para uso IVD.
- Lea todas las instrucciones contenidas en el prospecto del kit antes de realizar la prueba.
- Cumplir con la fecha de caducidad del kit.
- Utilice siempre el equipo de protección personal para la protección individual.
- No utilice reactivos de otros kits comerciales.
- No mezclar reactivos de kits con diferente número de lote.
- Las hojas de datos de seguridad están disponibles en [www.sentinel diagnostics.com](http://www.sentinel diagnostics.com) o en el proveedor local.
- Mantenga el REACTIVO protegido de la luz en su envoltura de aluminio.

**! -PRECAUCIÓN:** Este producto requiere la manipulación de especímenes humanos. Se recomienda que todos los materiales de origen humano se consideren potencialmente infecciosos y se manipulen de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos transmitidos por la sangre<sup>5</sup>, se debe utilizar el nivel de bioseguridad <sup>26</sup> u otras prácticas de bioseguridad adecuadas<sup>7-8</sup> para los materiales que contienen o se sospecha que contienen agentes infecciosos.

- Las muestras extraídas deben evitar la contaminación por heparina. La heparina es un fuerte inhibidor de la polimerasa y podría causar falsos negativos. Las muestras de sangre periférica deben recogerse en tubos con EDTA como procedimiento de laboratorio.
- Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local
- Gestionar y desechar todas las muestras biológicas como potencialmente infecciosas. Todo el material que entre en contacto con la muestra biológica debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 0,5% durante al menos 30 minutos o esterilizado en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y luego desechado.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Smith, J.G.; Wiethoff, C.M.; Stewart, P.L.; Nemerow, G.R. Adenovirus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2010, 343, 195-224.
- 2) Varga, M.J.; Weibull, C.; Everitt, E. Vía de entrada infecciosa del adenovirus tipo 2. J. Virol. 1991, 65, 6061-6070.
- 3) CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. 3ª ed. Informe MM03 del CLSI. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 4) CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline - Second Edition. Documento del CLSI MM06-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

- 5) Departamento de Trabajo de los Estados Unidos, Administración de Seguridad y Salud Ocupacional. 29 CFR Parte 1910.1030. Patógenos transmitidos por la sangre.
- 6) Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Ed. Washington, DC: US Government Printing Office, enero de 2007.
- 7) Organización Mundial de la Salud. Laboratory Biosafety Manual, 3ª ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 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) Norma europea. Evaluación del rendimiento de los productos sanitarios de diagnóstico in vitro EN 13612. Marzo de 2002

| Explanation of symbols  |   |   | EN |
|---|---|---|----|
| <b>REAGENT / STANDARD / CONTROL / BUFFER</b><br>The terms refers to the: single reagent / standard / control / buffer   |   |   |    |
| <b>IVD</b><br>In vitro Diagnostic Medical Device  | <b>REF</b><br>Catalogue number  | <b>LOT</b><br>Batch code  |    |
| <b>Cont.</b><br>Contents of kit   | <b>Distributed by</b><br>Distributed by   | <br>Manufacturer            |    |
| <br>Caution, consult accompanying documents<br>Consult instructions for use |   | <br>Temperature limitation |    |
| <br>Do not reuse   | <br>Do not expose the REAGENT to light | <br>Use by                 |    |
| <br>Date of Manufacture  | <br>Contains sufficient for <n> tests  | <br>Dispose of properly    |    |

STAT-NAT® es una marca registrada en varias jurisdicciones cuya licencia es exclusiva de SENTINEL CH. SpA. La tecnología STAT-NAT® está cubierta por la patente nº WO2010133628 A1.