

Kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-Fluorescencia)

Número de referencia
S3352E-12-P, S3352E-48
Nombre del producto
Kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-Fluorescencia)
Especificación del paquete
48 pruebas/kit, preenvasado 12 pruebas/kit
Uso previsto

El kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-Fluorescence Probing) es una prueba de PCR en tiempo real destinada a la detección cualitativa de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (MPV) en suero, sangre total, vesículas o pústulas, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo de individuos sospechosos de infección por el virus de la viruela del mono. Los resultados sirven para identificar el ADN del virus de la viruela del mono y no deben utilizarse como única base para tomar decisiones sobre el tratamiento del paciente. El Kit de Diagnóstico de Ácidos Nucleicos del Virus de la Viruela del Mono (PCR-Probación de Fluorescencia) está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico profesional, cualificado y formado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
Resumen

El ADN del virus de la viruela del mono es generalmente detectable en muestras respiratorias durante la fase aguda de la infección. Los resultados positivos son indicativos de la presencia del ADN del virus de la viruela del mono, siendo necesaria la correlación clínica con la historia clínica y otra información diagnóstica para determinar el estado de infección del paciente. Los resultados positivos no descartan una infección bacteriana o una coinfección con otros virus. El agente detectado puede no ser la causa definitiva de la enfermedad. Los resultados negativos no excluyen la infección por el virus de la viruela del mono. Los resultados negativos deben combinarse con las observaciones clínicas, la historia clínica y la información epidemiológica.

Principio de prueba

El kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-sonda de fluorescencia) es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en tiempo real. Los conjuntos de cebadores y sondas del MPV están diseñados para detectar el ADN del MPV en suero, sangre total, vesículas o pústulas, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo de pacientes con sospecha de infección por el virus de la viruela del mono. El kit se utiliza para la detección del ADN del VPM de forma cualitativa.

Un conjunto de cebadores y sondas específicamente diseñados se dirigen al gen humano como control interno, que controla la recogida de muestras, la manipulación de las mismas y el proceso de qPCR para evitar resultados falsos negativos.

Especificación y cantidad				
No. Nombre	Reactivo	48 T	Preparado 12T	Ingredientes principales
1	MPV PCR Mix tampón PCR	912 µL/tubo × 2 tubos	38 µL/tubo × 12 tubos	Primeros, Sondas, dNTPs, MgCl2,
2	Mezcla de enzimas MPV	96 µL/tubo × 1 tubo	2 µL/tubo × 12 tubos	Taq ADN polimerasa, UNG
3	Control positivo de MPV	500 µL/tubo × 1 tubo	500 µL/tubo × 1 tubo	Las secuencias sintéticas contienen dianas de interés
4	Control negativo de MPV	500 µL/tubo × 1 tubo	500 µL/tubo × 1 tubo	Salina normal

- Nota:**
- Todo el contenido de este paquete está preparado y validado para el propósito de las pruebas previsto. La sustitución o modificación de cualquiera de los contenidos del paquete afectará al rendimiento de las pruebas del kit. Los componentes contenidos en un kit están destinados a ser utilizados conjuntamente. No mezcle ni intercambie componentes de diferentes lotes de productos.
 - Materiales necesarios pero no proporcionados: Tubos de microcentrifuga de 1,5mL libres de DNasa y ADNse, tubos y tira de PCR de 0,2mL, varios modelos de pipetas y puntas de pipeta (puntas de 10µL, 200µL y 1000µL con filtros), microcentrifuga, mezclador vortex.
 - Reactivo necesario pero no suministrado: Reactivo de Liberación de Muestras (Número de Referencia: S1011E) o Kit de Extracción-Purificación de ADN/ARN de Muestras de Tipo Múltiple (Método de Perlas Magnéticas) (Referencia Número: S1006E) fabricado por Sansure Biotech Inc. para la extracción de ácidos nucleicos.

Almacenamiento y estabilidad

- Este kit debe guardarse en su caja original a -20 ± 5°C y protegido de la luz. El kit es válido durante 12 meses.
- Consulte la fecha de fabricación y la fecha de caducidad impresas en el exterior de la caja.
- Los reactivos sin abrir son válidos y estables hasta la fecha de caducidad.
- Una vez abiertos los reactivos, el número máximo de ciclos de congelación/descongelación no debe superar los tres.
- Los reactivos se mantienen válidos y estables antes de la fecha de caducidad que figura en el envase exterior cuando se transportan durante 7 días en una caja de espuma sellada que contiene refrigerante con la temperatura inferior a 20°C.

Instrumentos compatibles

Este kit de diagnóstico ha sido validado en los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Sistema 7500 de Applied Biosystems,
- Sistema de PCR en tiempo real Thermofisher QuantStudio™ 5,
- Instrumento Roche LightCycler® 480 II,
- Termociclador cuantitativo en tiempo real MA-6000,
- Sistema de PCR en tiempo real SLAN®-96P,
- Estación de trabajo de moléculas portátil S-Q31A&B,
- Estación de trabajo molecular portátil S-Q36A,
- Instrumento de PCR QuantGene 9600.

Requisitos de las muestras

- Tipos de muestras aplicables: suero, sangre completa, vesículas o pústulas, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo.
- Recogida de especímenes

Recogida de suero: Utilizar una jeringa estéril para extraer 2 mL de sangre venosa e inyectarla en un tubo estéril, mantenerla a temperatura ambiente hasta 4 horas para separar el suero mismo, o centrifugarla a 4000 rpm durante 5 minutos para separar el suero del resto de la sangre, y luego transferir el suero a un tubo estéril de 1,5 mL para su uso posterior.

Recogida de sangre total: Recoger 5ml de anticoagulante del paciente sospechoso por vía intravenosa y mezclarlo suavemente durante 6-8 veces para la espera.

Recogida de vesículas o pústulas: Seleccione vesículas o pústulas frescas en la piel, desinfectelas primero con yodoforo y luego limpie el yodoforo con alcohol al 70%. Una vez que el alcohol se haya evaporado por completo, utilice una aguja estéril para pincharla, exprima el líquido del tejido y sumerja un bastoncillo de algodón en el líquido. Coloque el hisopo de algodón en el tubo de muestreo de 3~5mL que contiene la solución de preservación, rompa el hisopo de algodón cerca de la parte superior, apriete la tapa del tubo y séllelo para su inspección.

Recogida de vesículas o hisopo nasofaríngeo: Usar el hisopo para medir la longitud entre el ápice nasi y el lóbulo de la oreja, luego marcar con el dedo. Introducir la torunda en la cavidad nasal en dirección perpendicular a la nariz (cara). El hisopo debe introducirse al menos en la mitad de la longitud desde el lóbulo de la oreja hasta el ápice nasi. Hacer que el hisopo se detenga en la nasal durante 15~30 s, girar suavemente 3~5 veces,

Colocar rápidamente la torunda en el tubo de recogida de muestras que contiene 2 mL de tampón de lisis (el mismo que el tampón de lisis del reactivo de liberación de muestras). Inserte el hisopo, luego rompa la varilla estéril del hisopo cerca de la parte superior, apriete la tapa del tubo y selle con la película de sellado.

Recogida de vesículas o hisopo orofaríngeo: Se debe utilizar un hisopo estéril para la toma de muestras, limpiando moderadamente la pared faríngea posterior, evitando tocar la lengua. Colocar rápidamente una torunda estéril en el tubo de recogida utilizado para la recogida de la torunda orofaríngea. Romper la varilla del hisopo estéril cerca de la parte superior, apretar la tapa del tubo y sellar con una película de sellado.

Tras la recogida de la muestra, se recomienda colocarla en el reactivo de almacenamiento de muestras para su conservación.

Muestra de un kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono

Se ha comprobado que la solución de preservación, como la solución salina normal, el tampón TE, 2-4M que contiene guanidina (como el clorhidrato de guanidina) también se puede utilizar como Reactivo de Almacenamiento de Muestras para la preservación de la muestra.

3. Almacenamiento y entrega de muestras:

Los especímenes que deben ser analizados pueden ser procesados inmediatamente, los especímenes que deben ser analizados dentro de 24 horas pueden ser almacenados a 4°C. Los especímenes que no pueden ser detectados en 24 horas deben ser almacenados a

-70°C o menos (en ausencia de condiciones de almacenamiento a -70°C, los especímenes a analizar pueden almacenarse a -20°C durante 10 días, el ácido nucleico puede almacenarse a -20±5°C durante 15 días). Deben evitarse los ciclos múltiples de congelación/descongelación. Los especímenes deben transportarse en un contenedor congelado sellado con hielo o en una caja de espuma sellada con paquetes de hielo.

Método de prueba

Por favor, procese según los siguientes pasos para el sistema 7500 de Applied Biosystems, el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 5 de Thermofisher, el instrumento 480 LightCycler® II de Roche, el termociclador cuantitativo en tiempo real MA-6000, el sistema de PCR en tiempo real SLAN®-96P, la estación de trabajo molecular portátil S-Q31A&B, la estación de trabajo molecular portátil S-Q36A, el instrumento de PCR QuantGene 9600.

1. Preparación del reactivo (realizada en la "sala de preparación de reactivos")

1.1 Saque cada componente del kit y póngalos a temperatura ambiente. Equilibrar todos los reactivos a temperatura ambiente, agitar en vórtex y dar un pequeño giro para su uso posterior.

1.2 Prepare la mezcla maestra para la PCR del VPM de acuerdo con la siguiente tabla. El volumen necesario se basa en el número total de muestras, un control positivo de MPV y un control negativo de MPV. Mezclar bien y luego centrifugarlo para su uso posterior. El reactivo restante debe almacenarse inmediatamente a -20°C.

	1 muestra	12 muestras	48 muestras
MPV PCR Mix (µL)	38	456	1824
Mezcla de enzimas MPV (µL)	2	24	96

Nota: La configuración anterior es sólo de referencia.

2. Procesamiento y carga de especímenes (realizado en la "sala de procesamiento de especímenes")

2.1 Utilice el reactivo de liberación de muestras (número de referencia: S1011E) o el kit de extracción-purificación de ADN/ARN de muestras de tipo múltiple (método de perlas magnéticas) (número de referencia: S1006E) fabricado por Sansure Biotech Inc. para extraer el ácido nucleico según el manual correspondiente.

2.2 Añada 10 µL del ADN extraído a los tubos de PCR en el siguiente orden: Control negativo de MPV, muestras de pacientes, control positivo de MPV. Añadir 40 µL de MPV PCR Mix en cada pocillo. Tapar cada pocillo, centrifugar a 2000 rpm durante 10 segundos y colocar en los instrumentos de PCR en tiempo real.

Muestra de un kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono

3. Amplificación PCR (Consulte el manual de usuario de cada instrumento para ajustar la configuración).

3.1 Coloque los tubos de PCR en los pozos de muestras del equipo de amplificación. Coloque el control negativo de MPV, las muestras y el control positivo de MPV a analizar en orden e introduzca el nombre de la muestra.

3.2 Seleccione el canal de prueba PCR:

1) Seleccionar el canal FAM (Reporter: FAM, Quencher: None) para probar el ADN MPV, 2) Seleccionar el canal CY5 (Reporter: CY5, Quencher: None) para probar el control interno MPV, 3) Establecer la referencia pasiva: none. Establecer el volumen de la muestra: 50.

Muestra de un kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono

3.3 Ajustar los parámetros del ciclo	Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos.
1	Descontaminación	50°C	2 min	1
2	Activación de la Taq ADN polimerasa	95°C	5 seg.	1
3	Desnaturalización	95°C	5 seg.	41
	Recalentamiento, extensión y adquisición de señales	60°C	16 segundos*	
4	Enfriamiento del dispositivo (opcional)	25°C	10 seg.	1

Una vez completados los ajustes, guarde la configuración y lleve a cabo el procedimiento de reacción. (*Nota: Debido a la configuración de la versión 1.5 de ABI7500, el paso #3 podría establecerse en 31 segundos o 32 segundos)

4. Por favor, procese de acuerdo a los siguientes pasos para la Estación de Trabajo de Moléculas Portátil (Modelo: S-Q31A&B):

4.1 Preparación de consumibles y reactivos

(1) Saque el soporte del tubo de reacción, el tubo de reacción PCR y la punta.

(2) Ponga la punta en el pozo H, y el tubo de reacción PCR en el pozo PCR (La información de la ubicación de los pozos ha sido marcada en el soporte del tubo de reacción).

(3) Ponga el reactivo de liberación de muestras (número de referencia: serie S1011E) en el pozo B; ponga la mezcla de PCR MPV en el pozo C; ponga la mezcla de enzimas MPV en el pozo D;

(4) Añada 10µL de la muestra a analizar o del control positivo de MPV o del control negativo de MPV en el pocillo B (Para evitar burbujas durante la operación, se recomienda pipetear profundamente y soltar lentamente).

4.2 Procedimiento de prueba

4.2.1 Presione suavemente la puerta delantera para abrirla.

4.2.2 Coloque el pozo A de la tira de reactivos en el instrumento hacia el exterior del mismo.

4.2.3 Haga clic en "**Tarea experimental**" en la pantalla del instrumento para acceder a la interfaz de configuración de una nueva tarea experimental.

4.2.4 Seleccione el proyecto experimental requerido en el menú desplegable de **Proyecto experimental**, introduzca el nombre de la tarea correspondiente en la barra de **Nombre de la tarea**, e introduzca y seleccione otros elementos que deban ser introducidos o seleccionados.

4.2.5 Haga clic en "**Submit**" para enviar la tarea experimental y en "**OK**" para ejecutar el instrumento e iniciar la tarea experimental sucesivamente.

4.2.6 Cuando la Estación de Trabajo de Moléculas Portátil (Modelo: S-Q31B) muestra "Por favor, transfiera el tubo de PCR **al 1/2/3/4**"(El S-Q31A muestra "Por favor, transfiera el tubo de PCR") en la interfaz, saque el tubo de PCR y cúbralo bien, luego centrifíquelo instantáneamente.

4.2.7 Introduzca el tubo PCR en el módulo de amplificación PCR (la tapa "PCR 1/2/3/4" se ha abierto automáticamente en este momento), cierre la tapa PCR del módulo de amplificación, y haga clic en

"OK" para la detección de la amplificación.

5.Por favor, procese según los siguientes pasos para la Estación de Trabajo Molecular Portátil (Modelo: S-Q36A):



5.1 Preparación de consumibles y reactivos

(1) Saque los kits de consumibles y los reactivos.

(2) Ponga el reactivo de liberación de muestras (número de referencia: serie S1011E) en el pozo B; ponga la mezcla de PCR MPV en el pozo C; ponga la mezcla de enzimas MPV en el pozo D; (la información de la ubicación de los pozos se ha marcado en el juego de soporte)

(3) Añada 10µL de la muestra a analizar o del control positivo de MPV o del control negativo de MPV en el pocillo B (Para evitar burbujas durante la operación, se recomienda pipetear profundamente y soltar lentamente).

5.2 Procedimiento de prueba

5.2.1 Haga clic en el botón "y" en la pantalla del instrumento para abrir la puerta del instrumento y poner los consumibles preparados en la posición designada del instrumento.

Sansure Biotech

5.2.2 Haga clic en "**Nuevo**" en la pantalla del instrumento para entrar en la interfaz de configuración de la nueva tarea del experimento.

5.2.3 Seleccione el proyecto experimental requerido en el menú desplegable de **Proyecto experimental**, introduzca el nombre de la tarea correspondiente en la barra de **Nombre de la tarea**, e introduzca y seleccione otros elementos que deban ser introducidos o seleccionados.

5.2.4 Haga clic en "**Submit**" para enviar la tarea experimental y en "**OK**" para ejecutar el instrumento e iniciar la tarea experimental sucesivamente. **6. Por favor, procese según los siguientes pasos**

6. Análisis de resultados (Consulte el manual de usuario del instrumento para ajustar la configuración).

Los resultados se guardarán automáticamente cuando se completen las reacciones. Analice la curva de amplificación del objetivo de detección y del control interno. Ajuste los valores de inicio, fin y umbral de la línea base del gráfico según el resultado del análisis (los usuarios pueden ajustar los valores según la situación real. El valor inicial puede ajustarse entre 3-15, y el valor final entre 5-20. Ajuste la curva de amplificación del control negativo para que sea plana o por debajo del umbral). Haga clic en "Analyze" para implementar el análisis, asegúrese de que cada parámetro satisfice los requisitos indicados en "7. Control de calidad". Vaya a la ventana "Plate" para registrar los resultados cualitativos.

7. Control de calidad

El resultado de la prueba se considera válido si se cumplen todas las condiciones de la tabla siguiente para la misma prueba. En caso contrario, el resultado de la prueba se considera inválido y debe volver a probarse

Resultados	Control positivo de MPV	Control negativo de MPV
MPV (FAM) Valor Ct	≤35	>40 o No Ct
IC(CY5) Valor Ct	≤35	>40 o No Ct

Rango de referencia

A través de la investigación de los valores de referencia, se determina que el valor de referencia Ct del gen objetivo es 40, el valor de referencia Ct del control interno es 40.

Explicación del resultado de la detección

1. Para el canal FAM con Ct ≤40, y el control interno se detecta Ct ≤40, debe ser informe MPV positivo.

2. Para el canal FAM con Ct >40, y el control interno se detecta Ct ≤40, debe ser informe MPV negativo.

3. Si el control interno detectó con Ct >40 o No Ct, entonces el resultado de detección del espécimen es inválido. Se debe realizar una investigación para averiguar las razones y luego volver a probar los especímenes. (Si las pruebas repetidas siguen produciendo resultados no válidos, póngase en contacto con Sansure Biotech Inc.)

Limitaciones del método de detección

- Los falsos negativos pueden deberse a la mala calidad de la muestra, a una recogida incorrecta de la misma, a un transporte inadecuado, a un procesamiento incorrecto en el laboratorio o a una limitación de la tecnología de las pruebas.
- Las mutaciones en la secuencia diana de la VPM pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
- El almacenamiento inadecuado de los reactivos puede dar lugar a resultados falsos negativos.
- El uso de este ensayo está limitado al personal capacitado en el procedimiento.
- Los resultados de las pruebas del kit sólo pueden utilizarse como ayuda para el diagnóstico clínico. Los síntomas y los signos físicos, la historia clínica, otros exámenes de laboratorio y las reacciones terapéuticas de los pacientes deben considerarse de forma exhaustiva para el diagnóstico clínico y el tratamiento.
- Las sustancias interferentes no verificadas o los inhibidores de la PCR pueden dar lugar a resultados falsos negativos o inválidos.

Índice de rendimiento del producto

1. Especificidad

El kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-Fluorescencia) no presenta reacciones cruzadas con el virus del sarampión, el virus de la rubéola, el parvovirus B19, el virus de la varicela zoster, el Treponema pallidum, el virus del herpes simple, el herpesvirus humano 6, el herpesvirus humano 7, el virus de Epstein Barr, el citomegalovirus, el adenovirus, el rotavirus

2. Límite de detección

El límite de detección de este kit es de 200 copias/mL.

3. Precisión

El coeficiente de variación (CV%) del valor Ct de la precisión dentro de la ejecución es ≤5%.

4. Posibles sustancias interferentes en las muestras

La bilirrubina total (≤28mg/dL), los triglicéridos (≤3g/dL), la IgG total (≤40mg/mL), y el Paracetamol (≤60µg/mL), los medicamentos antivirales (300U/MI) no tienen una interferencia significativa en los resultados de detección del kit.













Precauciones

- Sólo para uso de diagnóstico *in vitro* (IVD).
- Siga las precauciones estándar. Todas las muestras de pacientes y los controles positivos deben considerarse potencialmente infecciosos y manejarse en consecuencia.
- Elimine los materiales peligrosos o biológicamente contaminados de acuerdo con las prácticas de su institución.
- Por favor, lea atentamente el prospecto antes de utilizarlo. El kit de diagnóstico de ácido nucleico del virus de la viruela del mono (PCR-Probación por fluorescencia) es sólo para uso de emergencia como prueba de diagnóstico *in vitro* (DIV). Cada paso de la operación, desde la recogida, el almacenamiento y el transporte de las muestras, hasta las pruebas de laboratorio, debe llevarse a cabo estrictamente de acuerdo con las normas de bioseguridad pertinentes y la gestión del laboratorio molecular.
- Se requieren salas de laboratorio separadas, dedicadas a realizar los procedimientos predefinidos del ensayo. a) 1ª Sala: Sala de preparación-Preparar el reactivo de la prueba, b) 2ª Sala: Sala de procesamiento de la muestra-Procesar la muestra y los controles, c) 3ª Sala: Sala de amplificación-Realización de la PCR.
- Todas las muestras para la detección deben manipularse como si fueran infecciosas. Utilice batas de laboratorio, guantes protectores desechables y cambie los guantes con frecuencia para evitar la contaminación cruzada entre las muestras. La manipulación de las muestras y de los residuos debe cumplir los requisitos pertinentes indicados en la normativa local, estatal y nacional.

Bibliografía

- Centros de Control de Enfermedades Viruela del mono. El cese de la administración del virus de la vaccinia dio lugar a un aumento de la susceptibilidad. Cancerw eekly Plus, 1997, 28:5-6.
- Kurt, D, Reed, et al. The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere [J]. New England Journal of Medicine, 2004, 350(4).
- Kozlov M, et al. Monkeypox goes global: why scientists are on alert [J]. Nature. 2022, Epub ahead of print.

Símbolos

Símbolos	Significados	Símbolos	Significados
	Dispositivo médico de diagnóstico		Fecha de fabricación
	Uso por		Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura		Fabricante
	Número de lote		Número de referencia
	Número de pruebas		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Advertencias y/o precauciones que deben tomarse		Este producto cumple los requisitos de la Directiva Europea 98/79/CE para productos sanitarios de diagnóstico <i>in vitro</i> .

Información básica



Sansure Biotech Inc.

Dirección No. 680, Lusong Road, Yuelu District, 410205 Changsha, provincia de Hunan, REPÚBLICA POPULAR DE CHINA

Tel: +86-731-88883176

Fax: +86-731-88884876

Web: www.sansureglobal.com



Obelis S.A

Bd. Général Wahis 53, 1030 Bruselas, BÉLGICA

Tel: + (32) 2.732.59.54

Fax: + (32) 2.732.60.03

Correo electrónico: mail@obelis.net



Sólo para uso profesional