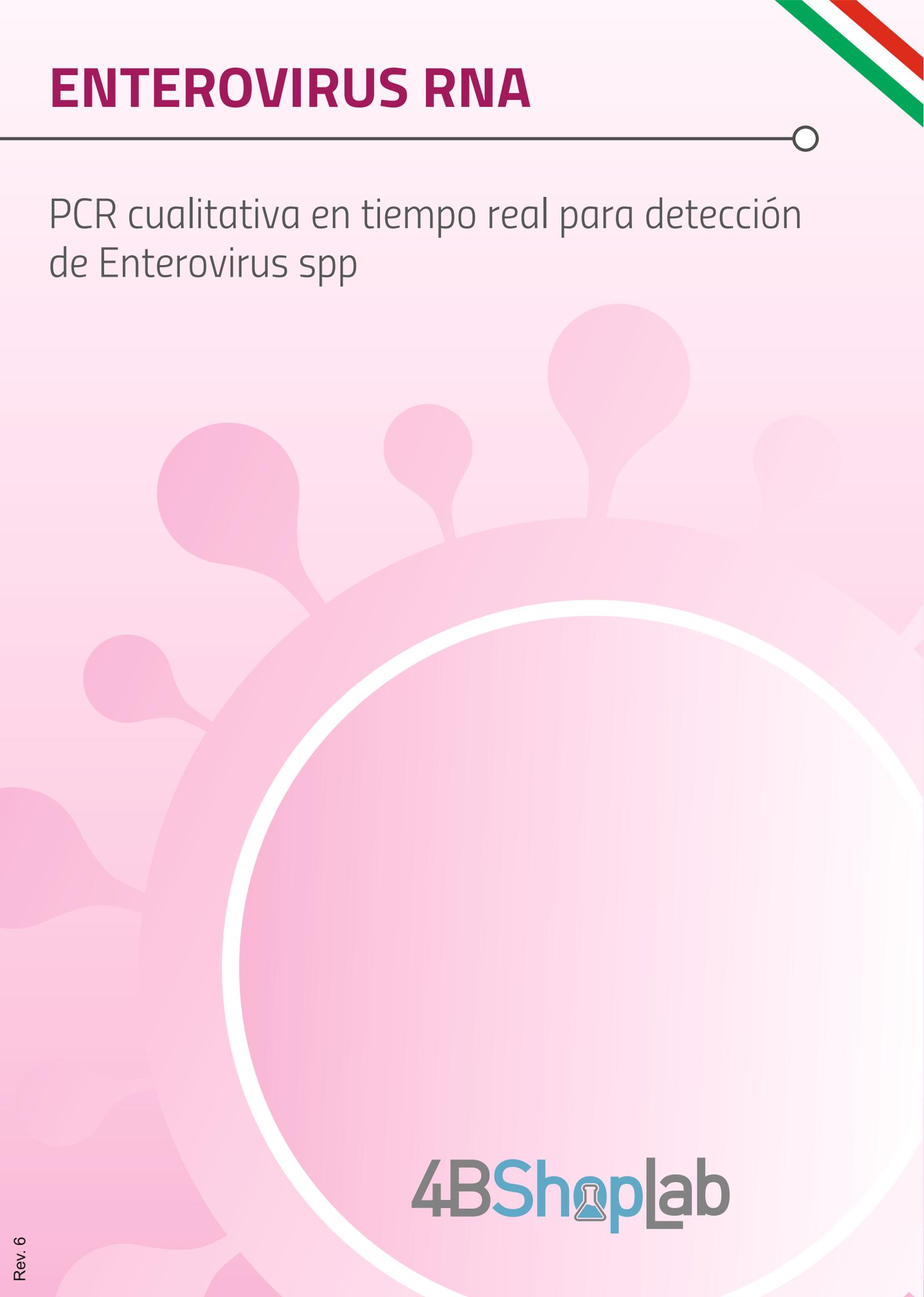


ENTEROVIRUS RNA



PCR cualitativa en tiempo real para detección de Enterovirus spp

4BShopLab

ARN de enterovirus

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

El equipo de PCR en tiempo real para **ARN de enterovirus**, con código **ENTERORNA.CE**, ha sido desarrollado para la detección cualitativa de ARN del enterovirus en muestras humanas de plasma y CSF (fluido cerebroespinal) con un control simultáneo de la reacción de amplificación a través de un **Control Interno (IC)**.

El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time y ABI 7500 Sequence Detection System® (software SDS, versión 1.3.1, Applied Biosystems™*), o MX3000P (software MxPro, versión 4.01, Stratagene™**).

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.

**Stratagene es una marca comercial registrada.

NOTA IMPORTANTE: El equipo ARN de enterovirus ha sido diseñado para detectar el genoma de ARN de todos los serotipos de enterovirus: Poliovirus 1-3, Coxsackievirus A1-A22, A-24, Coxsackievirus B1-B6, Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33, Enterovirus 68-71. El Parechovirus humano (Echovirus 22 y 23) no se detecta con este equipo.

B. INTRODUCCIÓN.

Los enterovirus humanos (hasta ahora se conocen 70 serotipos, pertenecientes a la familia Picornaviridae) son patógenos ubicuos con una alta incidencia a nivel mundial. Aunque la mayoría de las infecciones por enterovirus humano son asintomáticas, estos virus pueden causar un amplio espectro de síndromes clínicos, que van desde enfermedad de las vías respiratorias superiores, exantema febril, meningitis aséptica, pleurodinia, encefalitis, parálisis flácida aguda y seudosepsis neonatal. El enterovirus humano también puede estar implicado en la patogenia de enfermedades crónicas graves, incluyendo diabetes mellitus tipo 1, miocarditis y cardiomiopatía congestiva, y enfermedades neuromusculares. Por otra parte, las infecciones por enterovirus representan un número importante de pacientes de meningitis aséptica y encefalitis que requieren hospitalización en verano y otoño.

Los virus entéricos humanos se excretan en las heces de los pacientes infectados en altas concentraciones y se transmiten principalmente por vía fecal-oral a través de alimentos y agua contaminados. Se estima que causan del 30% al 90% de los casos de gastroenteritis a nivel mundial. Los enterovirus son virus pequeños, no encapsulados, que contienen un genoma de ARN lineal de cadena simple (7,4 kb), que incluye una región no codificante 5' y 3', y un único marco abierto de lectura largo que codifica una poliproteína de aproximadamente 2200 aminoácidos. El cultivo celular fue un método común para aislar virus en agua hasta principios de los 90. Más recientemente, la PCR ha llegado a ser una herramienta importante para la detección de estos virus.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El equipo ENTERORNA.CE se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicos.

El **ARN de enterovirus**, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se retrotranscribe en ADNc y se amplifica utilizando un sistema de amplificación en tiempo real. El producto amplificado se detecta utilizando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para una secuencia genómica única de enterovirus.

El Control Interno (IC) heterólogo sirve como control de amplificación para cada muestra procesada individualmente con el fin de identificar inhibidores de la reacción.

Un control positivo alto (CTRL-H) y un control positivo bajo (CTRL-L) se suministran como controles de la reacción PCR.

D. COMPONENTES

El formato estándar del producto, código ENTERORNA.CE, contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Contenido	ENTERORNA.CE 50 reacciones
A CÓDIGO: ALL/MM-1 CÓDIGO COLOR: AZUL CLARO	Mezcla maestra	Viales n.º 2 / 0,4 ml
B CÓDIGO: ENT/CB CÓDIGO COLOR: AMARILLO	Cebadores/s ondas liofilizados	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
C CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: ROJO	Agua grado molecular	Vial n.º 2 / 1,5 ml
NTC CÓDIGO: ALL/NTC CÓDIGO COLOR: BLANCO	Negativo Control	Vial n.º 1 / 1,5 ml
CTRL-H Control positivo alto (10 ⁴ copias/ul) CÓDIGO: ENT/CTRL-H CÓDIGO COLOR: VIOLETA	Positivo alto cualitativo liofilizado	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
CTRL-L Control positivo bajo (50 copias/ul) CÓDIGO: ENT/CTRL-L CÓDIGO COLOR: ROSA	Positivo alto Positivo bajo cualitativo	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
IC Control Interno CÓDIGO: ENT/IC CÓDIGO COLOR: VERDE	Control interno liofilizado	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	N.º 1

Nota importante: A petición, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25, 100, 150 pruebas, como se indica a continuación:

1. Componente A 2. Componente B 3. Componente C 4. NTC 5. IC 6. CTRL-H 7. CTRL-L 8. Manual instrucc.	Vial n.º 1 / 0,4 ml nº1 vial Vial n.º 1 / 1,5 ml Vial n.º 1 / 1,5 ml nº1 vial n.º 4 viales n.º 4 viales n.º 1	Viales n.º 4 / 0,4 ml Viales n.º 4 Viales n.º 2 / 1,5ml Vial n.º 1 / 1,5 ml Viales n.º 4 n.º 4 viales n.º 4 viales n.º 1	Viales n.º 6 // 0,4 ml Viales n.º 6 Viales n.º 3 / 1,5ml Vial n.º 1 / 1,5 ml Viales n.º 6 n.º 6 viales n.º 6 viales n.º 1
Número de pruebas	25	100	150
Código	ENTERORNA.CE.25	ENTERORNA.CE.100	ENTERORNA.CE.150

E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El equipo ENTERORNA.CE debe almacenarse a +2...8 °C. Una vez disueltos, el **Componente B** (código ENT/CB) y el **Componente IC** (código ENT/IC) se mantienen estables durante 4 meses a -20 °C. Una vez disueltos, los **Componentes de control positivo ALTO y BAJO** (código ENT/CTRL-HIGH, LENT/CTRL-LOW) se mantienen estables durante 2 semanas a -20 °C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente, deberían congelarse en alícuotas. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos. Solo se permite descongelar una vez.

F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl < volumen < 1000 µl)
2. Equipo de extracción de ARN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Microcentrifuga
6. Racks para tubos
7. Punta filtrada estéril con barrera contra aerosoles
8. Microtubos de 0,2 ml o microplacas PCR recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
9. Guantes desechables, sin polvo
10. Termociclador
11. Termociclador Real-Time PCR (*)
12. Papel absorbente.
13. Vórtex o similar.

(*) **Atención:** Se debe realizar de forma rutinaria una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo).

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo sólo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada del laboratorio, guantes sin polvo y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire.
7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.

8. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.

9. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2,8 °C en un refrigerador o en una cámara de refrigeración con control de temperatura.

10. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.

11. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.

12. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

13. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

14. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo.

15. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Los hisopos uretrales y cervicales, y las muestras de orina humanos deben ser manipulados al nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU., y de conformidad con lo publicado por los Institutos nacionales de la salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Almacenar y extraer las muestras separadas de los demás reactivos y usar un espacio separado para su manipulación

17. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta, indicada en la etiqueta, de componente C (código: ALL/C) suministrado con el equipo.

18. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de refrigeración.

19. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.

20. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados para evitar contaminación cruzada.

21. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. Especialmente, los desechos líquidos procedentes de los procedimientos de extracción de muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados antes de su eliminación. No poner en contacto los desechos de la extracción con lejía.

22. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

23. Otros materiales de desecho generados (por ejemplo: puntas usadas para las muestras) deben ser manipulados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. El CSF se extrae asépticamente mediante punción lumbar. Debe ser límpido y no hemolizado.

2. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el plasma según las técnicas estándar de preparación de muestras para laboratorios de análisis clínicos.

3. No se ha detectado ninguna influencia en la preparación de la muestra con citrato, EDTA.

Atención: La heparina (>10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR. Las muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante no deben usarse. Por lo tanto, las muestras de pacientes heparinizados no deben usarse.

4. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.

5. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.

6. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hipertípicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados. al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.

7. Las muestras de plasma para extracción de ARN deben recogerse de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 4 horas. Las muestras de plasma pueden almacenarse a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos.

8. Las muestras de CSF y plasma, si no se usan inmediatamente, deben almacenarse en alícuotas a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la recogida. Las muestras pueden almacenarse congeladas a una temperatura de -20 °C a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.

9. Al utilizar muestras congeladas, descongelar las muestras justo antes de la extracción para evitar posibles casos de degradación de los ácidos nucleicos.

I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Mezcla maestra:

Componente A. Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar y centrifugar brevemente para recoger el volumen completo.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Cebadores/Sondas:

Componente B.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente B liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial .
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Agua grado molecular:

Componente C. Listo para el uso.

Control negativo:

NTC. Listo para el uso.

Controles positivos:

Componente CTRL-H.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente CTRL-H liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial .
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

Componente CTRL-L.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.

- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente CTRL-L liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial .
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

Control interno:

IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente I.C. liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial .
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%.
2. **Dispositivo de extracción:** El equipo ENTERORNA.CE está previsto para usarse sólo en combinación con QIAamp Viral RNA, código 52906 (QIAGEN), NucleoSpin RNA Virus, código 740956 (Macherey-Nagel) y NA Body Fluid Kit, código: D-2021 (Chemagen distribuido por Dia.Pro). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por el fabricante.
3. **Fase de retrotranscripción:** El equipo ENTERORNA.CE está previsto para usarse sólo en combinación con el equipo de retrotranscripción de ARN, RNA Retro-transcription Kit (Dia.Pro srl, código: RNART.CE). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por el fabricante.
4. **Termocicladores Real-Time.** El equipo ENTERORNA.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que en la parte inferior de los viales de los componentes liofilizados haya un agregado bien formado. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (código: ALL/C) como se describe en la sección correspondiente (I).
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.

- Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores Real-Time.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

N.1 Extracción de ARN

La fase de extracción del ARN genómico de enterovirus debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Herramientas para extracción manual

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
CSF/Plasma	QIAamp Viral RNA mini kit®	52906	Qiagen™
CSF/Plasma	NucleoSpin RNA Virus	740956	MN™

Herramienta para extracción automática en combinación con el instrumento DIA.FASTEX

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
CSF/Plasma	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distribuido por Dia.Pro

El aislamiento de ADN solo debe realizarse de acuerdo con el manual de instrucciones (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro).

Nota importante: los siguientes volúmenes deben usarse estrictamente en los procedimientos de extracción:

Descripción	Volumen muestra μ l	Volumen elución μ l
QIAamp Viral RNA mini kit	140	30
NucleoSpin RNA Virus	150	30
NA Body Fluid Kit	230	50

El ARN obtenido de las muestras, no usado en la serie, debe almacenarse congelado (-80 °C).

NOTA IMPORTANTE:

10 μ l de ARN extraído para cada muestra deben usarse para la retrotranscripción con RNART.CE (Dia.pro).

N.2 Retrotranscripción de ARN viral en ADNc

La fase de retrotranscripción del ARN genómico de enterovirus debe realizarse exclusivamente en combinación con el siguiente equipo:

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
ARN	Equipo de retrotranscripción de ARN	RNART.CE	Dia.Pro srl

La retrotranscripción de ARN debe realizarse sólo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Dia.Pro srl).

N.3 Configuración de la reacción

El equipo **ENTERORNA.CE** ha sido diseñado para usarse solo con ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene).

N.3.1 Preparación de PCR

Importante: En la sección O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consúltelo antes de leer las instrucciones siguientes.

- Preparar los componentes como se describe en la sección I;
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para los controles positivos (preparados como se describe en la sección I).

Nota importante: Usar sólo tubos ópticos o microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían comprobarse en duplicado, siempre que sea posible;
- Incluir al menos 1 tubo/pocillo para el NTC (control negativo)
- Preparar la **mezcla de amplificación** para **muestras, NTC y controles positivos (CTRL-H, CTRL-L)** según la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 μ l	150 μ l
B	Cebadores/Sondas	2 μ l	24 μ l
C	Agua grado molecular	4.5 μ l	54 μ l
IC	Control Interno	1 μ l	12 μ l
Vol. total		20 μl	240 μl

N.3.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 20 μ l de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca
- Añadir 5 μ l de las **muestras, NTC, CTRL-H y CTRL-L** a los tubos de reacción.
- Cerrar bien los tubos de reacción
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm.

- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos ni exponer a la luz (cubrir los tubos).
- Cargar los tubos en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.
- Tras las operaciones de configuración descritas en la sección N4 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

Nota importante: Los componentes liofilizados tras la disolución en componente C (agua grado molecular) no estarán estables más de 3 horas. Mantener en hielo o a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

El volumen no utilizado de Componente B, CTRL-H, CTRL-L y de IC puede congelarse a -20 °C y usarse como se indica en el apartado E

N.4 Programación del instrumento

Para la programación del instrumento, consultar el manual de instrucciones proporcionado por los fabricantes.

Nota importante: Para Mx3000P ajustar "Ajuste de ganancia del filtro": ROX = x1, FAM = x4, JOE = x4. (véase el manual de instrucciones del software MxPro™ QPCR, pág. 41)

N.4.1 Perfil térmico

El perfil térmico se indica en la siguiente tabla:

Fase	Ciclo	Temp.	Tiempo
1	1	50°C	2 min
1	1	95°C	10 min
2	50	95°C	15 s
		60°C (*)	1 min

NOTA IMPORTANTE: (*) fase para la adquisición de datos en tiempo real

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

N.4.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (ABI 7500 y MX3000P Stratagene), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
Enterovirus	FAM	No fluorescente
Control Interno (IC)	JOE	No fluorescente
Referencia pasiva	ROX	No presente

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con la configuración correcta siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

O. ESQUEMA DEL ENSAYO.

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado para análisis cualitativo:

Microplaca o tubos				
	1	2	3	4
A	CTRL-H 10 ⁴ copias/ µl	Muestra 6		
B	CTRL-L 50 copias/ µl	Muestra 7		
C	NTC	Muestra 8		
D	Muestra 1	Muestra 9		
E	Muestra 2	Muestra 10		
F	Muestra 3	Muestra 11		
G	Muestra 4	Muestra 12		
H	Muestra 5	Muestra 13		

Leyenda: NTC = Control negativo CTRL-H, CTRL-L = Control positivo ARN enterovirus, IC = Control interno, Muestra 1,2,3...13 = Muestras en evaluación.

P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

P.1 Configuración pre-análisis

Antes de iniciar el análisis:

- Ajustar la "línea de base" (nivel fluorescente del fondo) como se indica a continuación:

"Línea de base"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Línea de base Manual: Inicio=3, Fin=15
STRATAGENE™ MX3000P®	Línea de base adaptable (no usar algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00)

- Ajustar manualmente el "umbral" fluorescente FAM/JOE

"Umbral" fluorescente FAM	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.10

"Umbral" fluorescente JOE	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.02
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en los controles positivos alto y bajo cada vez que se usa el equipo para verificar si sus valores Ct son los esperados e indicados en la siguiente tabla:

Compruebe que	Exigencia
CTRL-H	23 ≤ Ct (ciclo umbral) <27
CTRL-L	31 ≤ Ct (ciclo umbral) <35

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valor Ct positivo/negativo) y la fluorescencia JOE del control interno para validar la detección de ARN de enterovirus, como se describe en la siguiente tabla:

Enterovirus FAM	JOE del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	+	CORRECTO
	-	CORRECTO*
MUESTRA NEGATIVA	Ct <42	CORRECTO
	Ct ≥ 42 o indeterminado	INVÁLIDO**

*Una concentración inicial alta de ARN de enterovirus en la muestra (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

**Pueden aparecer problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos. El procedimiento de prueba debe repetirse empezando desde la fase de extracción, utilizando una muestra fresca procedente del paciente.

Los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados teniendo en cuenta los síntomas clínicos y los demás parámetros del laboratorio relacionados con las condiciones del paciente.

Los siguientes resultados son posibles:

Tabla de solución de problemas

	FAM	JOE	Resultado	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	+	+/-	RESULTADO CORRECTO <i>Positivo</i>	¡IMPORTANTE! Una concentración inicial alta de ARN de enterovirus (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
MUESTRA desconocida	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento o mal funcionamiento de los instrumentos	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de enterovirus y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo; 7. que los procedimientos de extracción se hayan realizado correctamente.
MUESTRA desconocida	-	+	RESULTADO CORRECTO <i>Negativo</i>	
CTRL - H/CT RL-L	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	¡IMPORTANTE! Una concentración inicial alta de ARN de enterovirus (señal FAM positiva) puede llevar a una señal

				fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
CTRL - H/CT RL-L	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de enterovirus y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo;
CTRL - H/CT RL-L	-	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de enterovirus y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente;
NTC	-	+	RESULTADO CORRECTO	
NTC	+	+/-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

R. RENDIMIENTO

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS). La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por el laboratorio clínico de referencia.

R.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se puede expresar para los métodos cualitativos como **Límite de detección**, **Límite de detección (LOD)**: es la cantidad mínima de sustancia que puede detectarse por un sistema de comprobación con una probabilidad establecida.

Para las pruebas NAT, se expresa como la concentración mínima del **analito** que, tras probarse en múltiples repeticiones, da resultados positivos.

El **límite de detección (LOD)** se determina probando diluciones en serie que contienen concentraciones conocidas del analito.

El **LOD** es la concentración mínima de analito que puede detectarse de forma consistente (p. ej., en $\geq 95\%$ de las muestras en condiciones rutinarias del laboratorio).

En el equipo con código ENTERORNA.CE, el LOD se ha determinado probando diluciones en serie de 1:2 (8 réplicas en tres series distintas), de la dilución máxima del analito que puede detectarse en el 100% de éstas.

Los resultados son los siguientes:

Límite de detección	
ABI™PRISM® 7500 SDS	2.5 copias/ µl
MX3000P Stratagene	2.5 copias/ µl

Esto significa que existe una probabilidad del 100% de detectar una concentración de 2,5E+00 copias/µl con el instrumento indicado anteriormente.

R.2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar y cuantificar sólo el marcador meta.

La especificidad analítica del ensayo de ARN de ENTEROVIRUS se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia meta del genoma con un software adecuado (LionSoft v.1.0 suministrado por Biotools y Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystems Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia meta del genoma han sido controlados por el software "BLAST" para comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos a nivel mundial tiene alguna homología con el enterovirus, y por el software "ClustalX" para comparar las secuencias meta del genoma de los distintos genotipos de enterovirus.
3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
4. Las muestras procedentes de pacientes con infecciones debidas a organismos que interfieren potencialmente se obtuvieron de la Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Milán, Italia, y se comprobaron

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Organismo	Resultado
Rinovirus	negativo

R.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

R.3.1. Especificidad diagnóstica:

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador meta. Así, la muestra negativa verdadera es una muestra conocida como negativa para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

Este parámetro se estudió examinando 33 extractos de muestras de plasma negativas de ARN de enterovirus:

NEGATIVOS VERDADEROS	33
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	33
ESPECIFICIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la **especificidad diagnóstica del sistema se ha calculado >99%**.

R.3.2. Sensibilidad diagnóstica

La **sensibilidad diagnóstica** es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador meta. Así, la muestra **positiva verdadera** es una muestra conocida como positiva para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

En el equipo con código ENTERORNA.CE, este parámetro se estudió examinando 12 muestras de plasma positivas de ARN de enterovirus en duplicados en la misma serie. También se comprobaron muestras del panel QCMD 2008 Enterovirus (EVRNA08). A continuación, se calculó el porcentaje (%) de muestras positivas.

POSITIVOS VERDADEROS	19
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	19
SENSIBILIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la **sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%**.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	> 99.5 %

R. 4 PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo con código ENTERORNA.CE, la **precisión** se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Se probaron en la misma serie (intraensayo) y en dos series distintas (interensayo) el CTRL-H y el CTRL-L en 8 réplicas.

A continuación, se calcularon la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo.

En ausencia de parámetros internacionales establecidos, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el equipo ENTERORNA.CE:

Variación de coeficiente de intraensayo (CV%) $\leq 10\%$.

Variación de coeficiente de interensayo (CV%) $\leq 10\%$.

S. LIMITACIONES

El usuario final de este equipo deberá leer cuidadosamente y entender este manual de instrucciones. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables. Especialmente, el pipeteado preciso de muestra y reactivo, la aplicación de un flujo de trabajo correcto junto con una programación cuidadosa de la fase de termociclado, son esenciales para la detección precisa y reproducible de ARN de enterovirus.

Se recomienda, de modo confidencial, un asesoramiento y evaluación médica apropiados.

T. BIBLIOGRAFÍA

1. Evaluation of real-time PCR versus PCR with liquid-phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. K Kay-Yin Lai, L Cook, S Wendt, L Corey, and KR Jerome. J Clin Microbiol, July 2003, p3133-3141.
2. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and real-time fluorescence PCR. HF Rabenau, AMK Clarici, G Muhlbauer, A Berger, A Vince, S Muller, E Daghofer, B I Santner, E Marth, H H Kessler. J Clin Virol 25 (2002), p155-164.
3. Rapid and Sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. M Nijhuis, N van Maarseveen, R Schuurman, S Verkuijlen, M de vos, K Hendriksen, and A M van Loon. J Clin Microbiol, Oct 2002, p3666-3670.
4. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. W A Verstrepen, S Kuhn, M M Kockx, M E van de Vyvere, and an H Mertens. J Clin Microbiol, Nov 2001, p4093-4096.

5. Símbolos

LEYENDA			
REF	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
IVD	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
LOT	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
CE	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

4BShopLab



consip

acquistinretepa

DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND 
Because diagnosis matters