

ES	REF 1N015 STAT-NAT® VHH-6	Mezcla liofilizada para la detección cuantitativa del HHV-6 (Herpes Virus-6) en PCR en tiempo real REACTIVO: 6 x (8 x 0,025) mL BUFFER: 1 x 1,5 mL + 1 x 1,0 mL ESTÁNDAR: 3 x (4 x 0,1) mL	IVD CE
	NOTA: Este prospecto debe leerse atentamente 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® HHV-6 es un ensayo cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos en PCR en tiempo real para la identificación de HHV-61 en muestras de ADN extraídas de Plasma/Suero/BAL/ Hisopo/CSF.

PRINCIPIO

STAT-NAT® HHV-6 permite la detección de HHV-6 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 VHH-6. El kit permite la identificación de HHV-6, a partir de muestras extraídas de Plasma/Suero/BAL/ Hisopo/CSF². STAT-NAT® HHV-6 es una prueba de PCR en tiempo real liofilizada que permite realizar un ensayo sin pasos manuales intermedios para preparar las mezclas de reacción. Su ensayo en tubo único, compuesto 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® HHV-6 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 Hot Start Polymerase inhibe la actividad enzimática antes del inicio de los ciclos térmicos, permitiendo la reducción o eliminación de productos no específicos. Los cebadores y las sondas específicas garantizan la sensibilidad y 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 vencimiento indicada en el envase. Utilice únicamente envases no dañados.

Componentes del kit:

REACTIVO:

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

- MgCl₂;
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);
- Hot Start Taq polimerasa;
- Cebadores específicos;
- Sondas específicas;
- Tapón de reacción.

ESTÁNDAR:

3 x Curvas estándar secas:

- STAT-NAT® HHV-6 Standard 11 x 10³ copias/μL (tapón marrón)
- STAT- NAT® HHV-6 Standard 2 1 x 10² copias/μL (tapón violeta)
- STAT- NAT® HHV-6 Standard 3 1 x 10¹ copias/μL (tapón amarillo)
- STAT- NAT® HHV-6 Standard 4 1 x 10⁰ copias/μL (tapón naranja)

BUFFER:

1 x 1,0 mL Buffer de reconstitución STAT-NAT® (tapón rojo)

1 x 1,5 mL Buffer de curva STD STAT-NAT® (tapón azul)

El Buffer de 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 puedan causar falsos negativos.

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

Es necesario validar cada ejecución de diagnóstico utilizando:

- un NTC (por ej., STAT-NAT® STD Curve Buffer)
- un control positivo (por ej., puntos de la curva estándar)

MUESTRA

Plasma/Suero/BAL/Tabilla/CSF recogidos siguiendo el procedimiento de laboratorio adecuado.

INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

NOTAS Y LIMITACIONES

Para evitar resultados erróneos:

- Examine el producto antes de utilizarlo para comprobar que el contenido tenga 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.

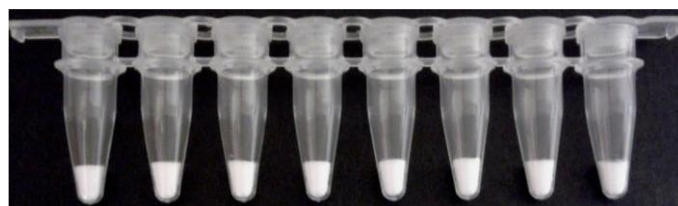


Figura 1

INSTRUCCIONES DE USO

Corte el sobre de aluminio en el punto indicado por las muescas laterales. Cada sobre de aluminio contiene una única 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. Guarde el kit a temperatura ambiente.

Asegúrese **de que el sobre esté siempre bien cerrado y de que el gel de sílice siga dentro.**

Desechar la bolsa de aluminio y su contenido si el gel de sílice pasa de color 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 la computadora) y abra el programa de software específico.
2. Configure el detector para la sonda objetivo con "FAM" e inhibidor con "none".
3. Ajuste el detector para el Control Interno de reacción con "JOE/HEX/VIC" e inhibidor "none".
4. En el campo Referencia pasiva, si se solicita, seleccione "none".

Configuración de la reacción

1. Extraer el ADN de las muestras que se van a examinar (Qiagen, Stratec Instruments) (sistema de extracción no incluido en el kit).
2. Reconstituya y mezcle cada STAT-NAT® HHV-6 Standard con 100 µL de STAT-NAT® STD Curve Buffer. Espere al menos 15 minutos antes de usar.
3. Prepare los controles negativos.
4. Disponga la cantidad necesaria de tubos de ensayo.
5. Añada los componentes enumerados en el Cuadro A a la mezcla liofilizada en cada tubo de ensayo.


LILIANA E. FARODI
FARMACEUTICA
MAT. 9357

Componentes	Volumen por prueba tubo/reacción
STAT-NAT Tampón de reconstitución	15 µl
ADN extraído o STAT-NAT® HHV-6 estándar reconstituido o NTC	10 µl
Volumen final de la reacción	25 µl

Cuadro A

6. La mezcla liofilizada se disolverá en pocos segundos.
7. Asegúrese de que no haya burbujas de aire; si hubiera, elimínalas por aspiración con la punta de la pipeta.
8. Realice la PCR en tiempo real utilizando el perfil térmico que se muestra en el Cuadro B.

Segmento	N.º de ciclo	Temperatura	Tiempo	
1	1	95 °C	2 Min.	
2	10	95 °C	15 seg.	Detección de fluorescencia OFF
		60 °C	60 seg.	
3	35	95 °C	15 seg.	Detección de fluorescencia ON
		60 °C	60 seg.	

Cuadro B

9. Después de su uso, deseche el residuo de los Estándares STAT-NAT® HHV-6 reconstituidos.

Validación de la sesión

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

Ajuste los valores umbral como se indica en el Cuadro C:


EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE

Instrumento	FAM	JOE/HEX/VIC
BioRad CFX 96	5% fluorescencia	5% del valor más alto de fluorescencia IC entre las muestras
ABI Quant Studio5	valor relativo al Estándar 1	

Cuadro C

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

Estándar	Interpretación	
	FAM (C _t)	Resultado
St 1	16.1 ± 2	VÁLIDO
St.2	19.4 ± 2	VÁLIDO
St.3	22.7 ± 2	VÁLIDO
St.4	26.0 ± 2	VÁLIDO
NTC	Sin señal	VÁLIDO
NTC	Señal	NO VÁLIDO

Cuadro D

Valores esperados para las curvas de amplificación	
R ² > 0,98	Pendiente < -3,0

Cuadro E

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

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

La figura 2 muestra ejemplos de curvas de amplificación en escala lineal.

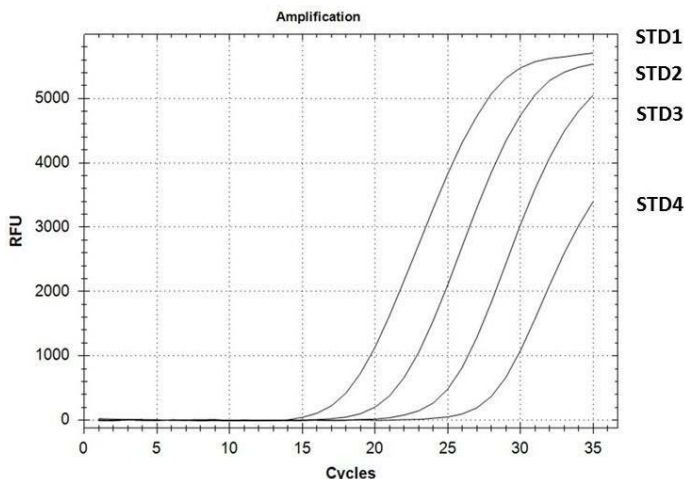


Figura 2

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS


- La señal FAM indica la amplificación exitosa de la secuencia específica para la identificación del HHV-6;
- La señal HEX/JOE/VIC indica la amplificación exitosa de la secuencia específica para el Control Interno (Ver Cuadro F).

Detección VHH-6	Interpretación		
	FAM	JOE/ HEX/ VI C (I.C.)	Resultado
SI	SI	SI	VÁLIDO
SI	SI	NO	VÁLIDO*
NO	NO	SI	VÁLIDO
-	NO	NO	NO VÁLIDO

Cuadro F

*Muestras muy concentradas podrían inhibir la amplificación del Control Interno.

#En las muestras que son negativas, no se excluye que haya una concentración de ADN HHV-6 inferior al límite de sensibilidad del ensayo.


LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAT. 9357


EZEQUIEL GOEZIO
SOCIO-GERENTE

Límite de detección (LoD)

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

El LOD se calculó sobre 30 réplicas de muestras con una concentración de 5 copias/reacción con un 95% de probabilidad de tener un resultado positivo (Cuadro G).

Límite de cuantificación (LoQ)

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 (Cuadro G).

Límite de detección	
95%	5 copias/reacción
Límite de cuantificación	
95%	5 copias/reacción

Cuadro G

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 (Cuadro H).

Muestra	Resultado	Aprobado (sí/no)
HHV-6	Sin amplificación	Sí
BKV	Sin amplificación	Sí
VHS-1	Sin amplificación	Sí
VHS-2	Sin amplificación	Sí
VHH-6	Amplificación	Sí
ADN	Sin amplificación	Sí
CMV	Sin amplificación	Sí

Cuadro H Linealidad:

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

SOLUCIÓN 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 parámetros de ciclado de la PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el prospecto 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 vencimiento del kit.


 LILIANA E. PARODI
 FARMACEUTICA
 MAJ. 9357


 EZEQUIEL BOEZIO
 SOCIO-GERENTE

Señal débil o nula en Control Interno.

1. Efecto inhibidor de la muestra: ADN genómico con una extracción de baja calidad. El resultado es NO VÁLIDO:
 - Asegúrese de utilizar un método de extracción de ADN validado y siga cuidadosamente las instrucciones 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.
2. Error de pipeteo: Ausencia de reactivos o muestra:
 - Repite la prueba.
3. 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 vencimiento del kit.
4. Selección incorrecta del canal/filtro. Las condiciones de PCR en tiempo real no se ajustan a las instrucciones del prospecto del kit:
 - Compruebe el protocolo de los parámetros de ciclado de la PCR en tiempo real y seleccione los canales de fluorescencia indicados en el prospecto del kit.

No hay señal FAM o JOE/HEX/VIC:

1. Efecto inhibidor 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.
2. El producto podría contener contaminación por humedad:
 - Compruebe las condiciones de almacenamiento del kit; asegúrese de que el sobre esté siempre bien cerrado y de que el gel de sílice siga dentro.
 - Compruebe si el gel de sílice pasa de naranja a verde.
 - Compruebe la fecha de vencimiento del kit.

Señal FAM en el control negativo:


1. Contaminación durante el procedimiento de preparación de la PCR en tiempo real: todos los resultados son NO VÁLIDOS:
 - Limpie el banco de trabajo y todos los instrumentos;
 - Manipule el Control Positivo al final del procedimiento de PCR en Tiempo Real;
 - Repita la PCR en tiempo real utilizando un nuevo juego de reactivos.

Variabilidad de la intensidad de fluorescencia:

1. La Master Mix no está bien reconstituida:
 - Repita cuidadosamente el procedimiento de PCR en tiempo real.
2. 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:

1. Compruebe el rendimiento del termociclador:
 - Realice la calibración del instrumento.
2. 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 vencimiento del kit.



LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAT. 9357



EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE

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

Consulte el Manual del Usuario del instrumento o póngase en contacto con el Servicio Técnico local.

Las muestras duplicadas no reproducen resultados idénticos.

Los valores C_t de muestras idénticas pueden diferir en reacciones individuales. Las variaciones de $C_t > \pm 2$ sugieren errores de pipeteo u otras diferencias entre muestras duplicadas.



LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAJ. 9357



EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES











- Este ensayo es exclusivamente para uso IVD.
- Lea todas las instrucciones contenidas en el prospecto del kit antes de realizar la prueba.
- Respete la fecha de vencimiento del kit.
- Utilice siempre equipos de protección individual para la protección individual.
- No utilice reactivos de otros kits comerciales.
- No mezcle reactivos de kits con diferente número de lote.
- Las fichas de datos de seguridad están disponibles en www.sentinel diagnostics.com o en el sitio del 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 OSHA sobre patógenos transmitidos por la sangre⁵, el nivel de bioseguridad 2⁶ u otras prácticas de bioseguridad adecuadas^{7,8} deben utilizarse para materiales que contengan o se sospeche que contengan 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 EDTA como procedimiento de laboratorio.
- Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local
- Gestione y deseche todas las muestras biológicas como potencialmente infecciosas. Todo el material que entre en contacto con la muestra biológica debe tratarse con hipoclorito de sodio al 0,5% durante al menos 30 minutos o esterilizarse en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y, a continuación, desecharse.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ward KN. Human herpesviruses-6 and -7 infections. Current Opinion in Infectious Diseases. 2005, 18:247- 252.
- 2) Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus6 (HHV-6). J Clin Virol. 2011 Nov;52(3):164-71.
- 3) CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. 3° ed. Informe MM03 del CLSI. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 4) CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline – 2° edición. Documento MM06-A2 del CLSI. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

- 5) Departamento de Trabajo de EE.UU., Administración de Seguridad y Salud en el Trabajo. 29 CFR Parte 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
- 6) Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5° ed. Washington, DC: US Government Printing Office, enero de 2007.
- 7) Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio, 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. Performance evaluation of in vitro diagnostic medical devices EN 13612. Marzo de 2002

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

Nota: los cambios respecto a la versión anterior se indican mediante una barra vertical en el margen del texto.


LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAJ. 9357


EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE

LABELS MASTER FILE

REF 1N015 Product STAT-NAT[®] HHV-6 FTP 187

Box

STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015



Cont.

REAGENT: 6 x 8 HHV-6 Master Mix tubes
BUFFER: 1 x HHV-6 Buffers
STANDARD: 3 x HHV-6 Standard Curve



EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE

LOT 00000 2222-12-31

(01)08058056682376(17)221231
(10)00000(240)1N015



SENTINEL CH. SpA
Via Robert Koch, 2
Milano 20152 Italy

1N015 - 01/19

LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAT. 9357

Vials

STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015 8 x HHV-6 Master Mix Tubes

2N015A - 01/19



LOT Q0000 2222-12



SENTINEL CH. SpA
Via Robert Koch, 2
Milano 20152 Italy

STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

HHV-6 Standard Curve:
1 x HHV-6 Standard 1
1 x HHV-6 Standard 2
1 x HHV-6 Standard 3
1 x HHV-6 Standard 4

2N015C - 01/19



LOT Q0000 2222-12



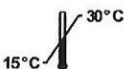
SENTINEL CH. SpA
Via Robert Koch, 2
Milano 20152 Italy

STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015
HHV-6 Buffers:
1 x 1 mL Reconstitution Buffer
1 x 1.5 mL STD Curve Buffer

2N015B - 01/19



LOT Q0000 2222-12



SENTINEL CH. SpA
Via Robert Koch, 2
Milano 20152 Italy

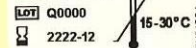
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

STANDARD 1: LYO 100 µL

LOT Q0000 2222-12



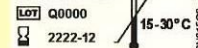
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

STANDARD 2: LYO 100 µL

LOT Q0000 2222-12



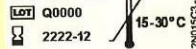
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

STANDARD 3: LYO 100 µL

LOT Q0000 2222-12



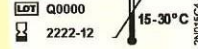
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

STANDARD 4: LYO 100 µL

LOT Q0000 2222-12



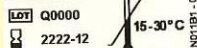
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

Reconstitution Buffer: 1 mL

LOT Q0000 2222-12



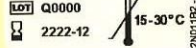
STAT-NAT[®] HHV-6

CE

REF 1N015

STD Curve Buffer: 1.5 mL

LOT Q0000 2222-12



Lots and expiry dates are examples only

Prepared by: [Signature] date 15/04/2019 Approved by: [Signature] date 15/04/2019 Rev 02
(Regulatory Affairs)

FABRICANTE.: SENTINEL CH.

**DIREC.: VIA ROBERT KOCH, 2 MILANO
20152 ITALY**

PRODUCTO: HHV6

MARCA: SENTINEL

IMPORTADOR: EXSA S.R.L

DIRECCION: AV. ADER 3620 MUNRO


D.T. FARM.: PARODI LILIANA EDITH MN: 9357

**UTILIZADO POR EL M.S Y A.S., AUTORIZADO
POR ANMAT: PM 1489- 90**

**NO UTILIZAR SI EL ENVASE SE ENCUENTRA
DAÑADO O ABIERTO VENTA EXCLUSIVA A
PROFECIONALES E INST. SANITARIAS**



EZEQUIEL BOEZIO
SOCIO-GERENTE



LILIANA E. PARODI
FARMACEUTICA
MAJ. 9357



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: EXSA S R L

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 9 pagina/s.