



CLART® ENTHERPEX

**GENOTIPADO DE HERPES Y ENTEROVIRUS HUMANOS
MEDIANTE IDENTIFICACIÓN GENÓMICA
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

CLART® ENTHERPEX

CLART® ENTHERPEX está bajo la protección de la familia de patentes correspondiente a la solicitud de Patente Internacional PCT WO2009122201. Dicha familia comprende miembros concedidos en España, Canadá, Francia, Alemania, Italia, Suiza, Reino Unido, Rusia y Méjico, y en tramitación en Brasil.

CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART® y AUTOCLART® son marcas registradas por GENOMICA.

Para ampliar la información descrita en este manual puede consultar la siguiente página web: www.genomica.com

Kit de diagnóstico in vitro bajo el Mercado CE.



GENOMICA, S.A.U.
Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, España
www.genomica.com







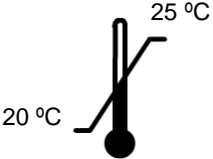
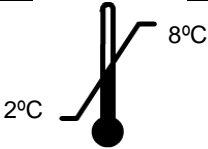
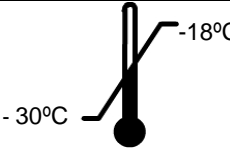


Solo ampara el diagnóstico in vitro de Citomegalovirus mediante el ON 0318

Versión 7
Febrero 2018

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS	4
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN	5
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	7
3.1. Reactivos de extracción y purificación	7
3.2. Reactivos de amplificación.....	7
3.3. Componentes de visualización	8
3.4. Otros componentes.....	8
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS.....	10
4.1. Reactivos y material	10
4.2. Equipos.....	10
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN	12
6. MUESTRAS	13
7. PROTOCOLO DE TRABAJO	14
7.1. Extracción manual de ADN/ARN.....	14
7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción manual de ADN	14
7.1.2. Protocolo de extracción manual de ADN/ ARN.....	14
7.1.3. Protocolo de extracción automática de ADN	17
7.2. Reacción de Amplificación	17
7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación	17
7.2.2. Protocolo de Amplificación	17
7.3. Visualización del producto amplificado	18
7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	18
7.3.2. Protocolo de visualización manual.....	20
7.3.3. Protocolo de visualización en autoclart®	21
7.3.4. Protocolo de visualización en autoclart® plus.....	23
8. RESULTADOS	26
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	27
9.1. Control de interferencias conocidas	27
9.2. Especificaciones técnicas	28
9.2.1. Parámetros analíticos.....	28
Sensibilidad analítica	28
Especificidad analítica	28
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	29
10. REFERENCIAS	31

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

	<p>Atención, ver instrucciones de uso</p>
	<p>Fecha de caducidad</p>
	<p>Producto sanitario para Diagnóstico <i>In Vitro</i></p>
	<p>Lote</p>
	<p>Conservar a temperatura ambiente</p>
	<p>Conservar entre 2 °C y 8 °C</p>
	<p>Conservar entre -30 °C y -18 °C</p>
	<p>Manténgase fuera de la luz del sol.</p>
 <p>p-tertiary-Octylphenoxy polyethyl alcohol CAS-No. : 9002-93-1</p>	<p>Advertencia: p-tertiary-octylphenoxy polyethyl alcohol”.</p>

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN

CLART® ENTHERPEX permite detectar infecciones de los 8 virus herpes humanos HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7 y HHV-8, y de los tres virus de la familia de Enterovirus más importantes desde el punto de vista clínico humano, Poliovirus, Echovirus y Coxsackievirus, pero sin diferenciar entre ellos.

La detección puede llevarse a cabo a partir de distintos tipos de muestras humanas: torundas, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y biopsia.

La detección está basada en nuestra tecnología CLART®: Una amplificación por PCR de un fragmento del virus de entre 106-328 pb, seguida de visualización en microarray de baja densidad. La secuencia elegida está altamente conservada entre los distintos virus, y al mismo tiempo es lo suficientemente específica como para identificar cada tipo de virus con sondas específicas.

En la Figura 1 se muestra un CLART-Strip® (CS), cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la caracterización de una muestra.

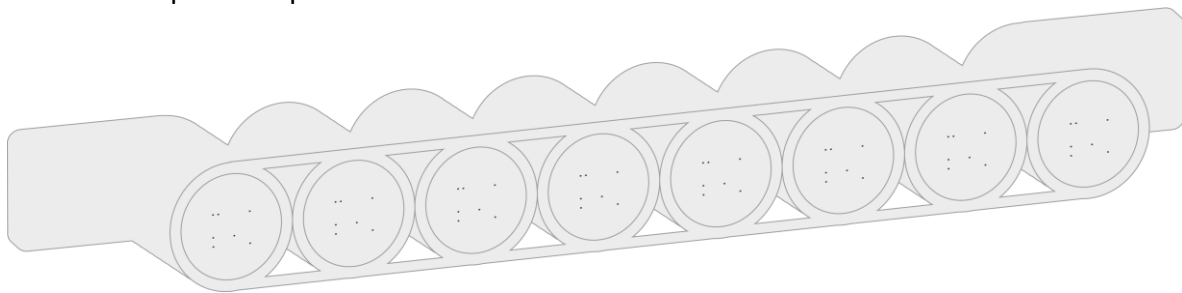


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de detección. Básicamente, los productos amplificados por PCR, y marcados con biotina, hibridan con sus sondas complementarias específicas, inmovilizadas en áreas bien definidas del microarray. A continuación, tienen lugar dos pasos de incubación secuenciales: primero, con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y segundo, con un sustrato de o-dianisidina.

Seguidamente, aparece un precipitado en aquellas regiones del microarray donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas.

Finalmente tiene lugar el análisis e interpretación automática de resultados, gracias al lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), en el cual se emplean softwares diseñados y validados por GENOMICA. Alternativamente, se puede emplear el autoclart® plus (ver apartado 7).

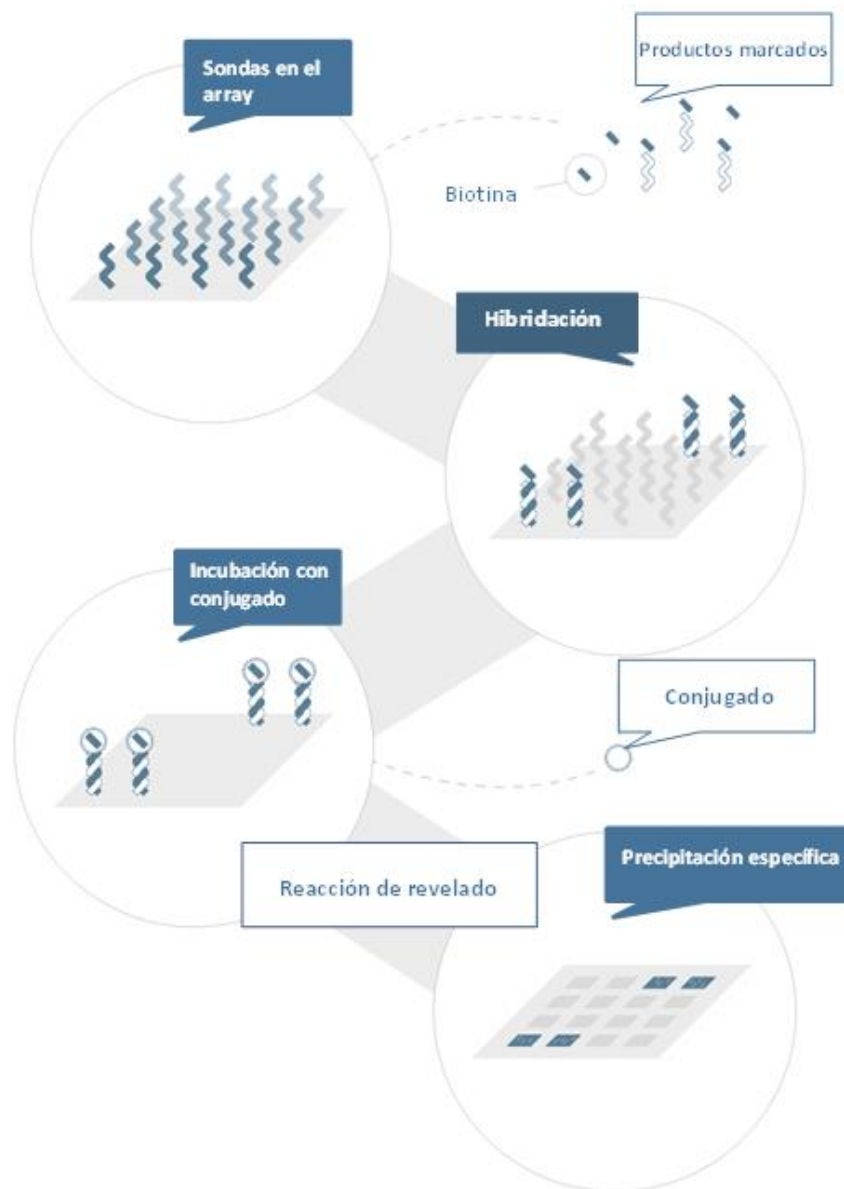


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una incubación con o-dianisidina, sustrato de la peroxidasa. Esto genera un precipitado en el área donde ha tenido lugar la hibridación.

3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

El kit **CLART® ENTHERPEX** contiene suficientes reactivos para el análisis de 16 ó 48 muestras clínicas. Cada uno de los componentes del kit se envía a su temperatura óptima de almacenamiento, y permanecerá estable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando se respeten las recomendaciones de conservación.

A continuación se indican los componentes del kit:

3.1. Reactivos de extracción y purificación

Envío a -20°C. Almacenaje según instrucciones de más abajo.

Componentes:

- SEML (Solución de extracción de muestras líquidas). Una vez descongelada se debe guardar a 4°C y emplear dentro de los 8 días siguientes.
- SD (Solución de dilución). Conservar a -20°C o a 4°C.
- IP (Isopropanol). Conservar a -20°C.
- DE (Etanol 70%). Conservar a -20°C.
- DB (Solución de digestión 5X). Una vez descongelada guardar a 4°C.
- PK (Proteinasa K 10X). Conservar a 4°C una vez descongelada. No usar si ha transcurrido más de un mes tras su descongelación.

3.2. Reactivos de amplificación

Envío y almacenaje a -20°C.

Están compuestos por Tubos de amplificación y Mezcla de Enzima. Tenga en cuenta que los tubos de amplificación son de un solo uso.

Se envían dos tipos de tubos de amplificación:

- Tubo incoloro (Multiplex PCR 1 ó Mix1) para la amplificación de HSV-1, HSV-2 y VZV. Contiene 45 µl de mezcla de reacción.
- Tubo verde (multiplex-RT-PCR 2 ó Mix2) para la amplificación de CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 y Enterovirus (Echovirus, Poliovirus y Coxsackivirus). Contiene 43 µl de mezcla de reacción.
- Mezcla de Enzima: es una mezcla de las enzimas de RT (retrotranscriptasa) y DNA Polimerasa. Se envía lista para su uso. Conservar a -20°C.

Es imprescindible añadir 2 µl de Mezcla de Enzima en cada tubo verde antes de introducir el material genético extraído. Los tubos incoloros ya llevan incorporada la enzima.

Nota: Las cajas de reactivos de amplificación incluyen un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de -20°C y no deben utilizarse.

3.3. Componentes de visualización

Los componentes de visualización se dividen en dos grupos, en base a las condiciones óptimas de envío y conservación:

- Envío a 4°C y almacenaje a temperatura ambiente:
 - **CLART-Strip® (CS)**, cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la detección de todos los virus a detectar.

Nota: Las unidades de **CS** se envían en un sobre termosellado que ha de mantenerse cerrado y protegido de la luz y las altas temperaturas (25°C máximo), hasta el momento de su uso.

- Envío y almacenaje a 4°C :
 - **DC** (Diluyente de Conjugado).
 - **SH** (Solución de Hibridación).
 - **CJ** (Solución de Conjugado).
 - **RE** (Solución de Revelado). Conservar protegida de la luz.
 - **TL** (Tampón de Lavado).
 - **Adaptador de placa Microtiter y tapa de plástico.**

3.4. Otros componentes

- Lector **CAR®** de GENOMICA o CLINICAL ARRAY READER (Figura 3).
Garantiza la lectura, análisis e interpretación automática de resultados de hasta 12 **CS** (96 muestras) por ensayo. Despliega una interfaz gráfica de fácil utilización (CLEIS), e incluye el software de procesamiento de imagen SAICLART® propiedad de GENOMICA, así como Softwares específicos para cada kit.

Nota: El uso del **CAR®** es exclusivo para kits de diagnóstico de GENOMICA.



Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

- **autoclart®** de GENOMICA.

Posibilita el procesamiento automático de hasta 12 tiras de **CSs** (96 muestras) durante la fase de visualización.

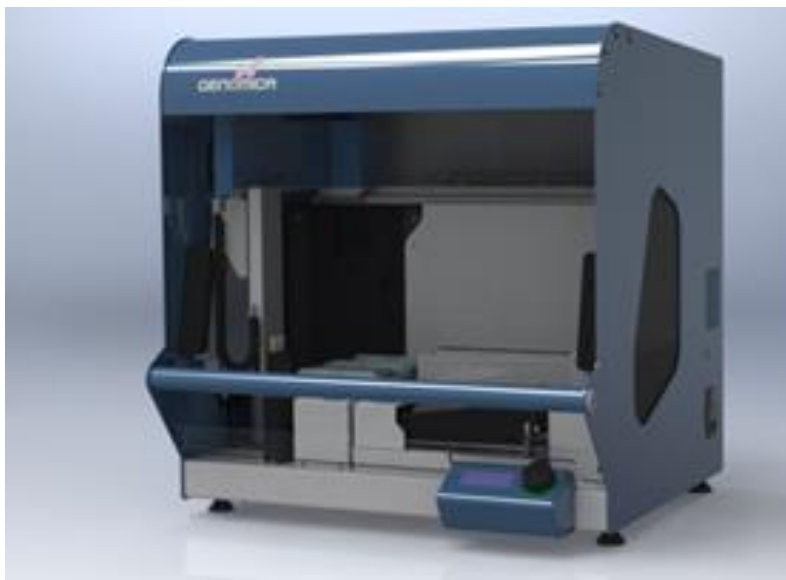


Figura 4. autoclart®

- **autoclart® plus** de GENOMICA.

Es un equipo electromédico totalmente automatizado capaz de analizar hasta 96 muestras al mismo tiempo, desde el producto desnaturalizado hasta la emisión del

informe diagnóstico.

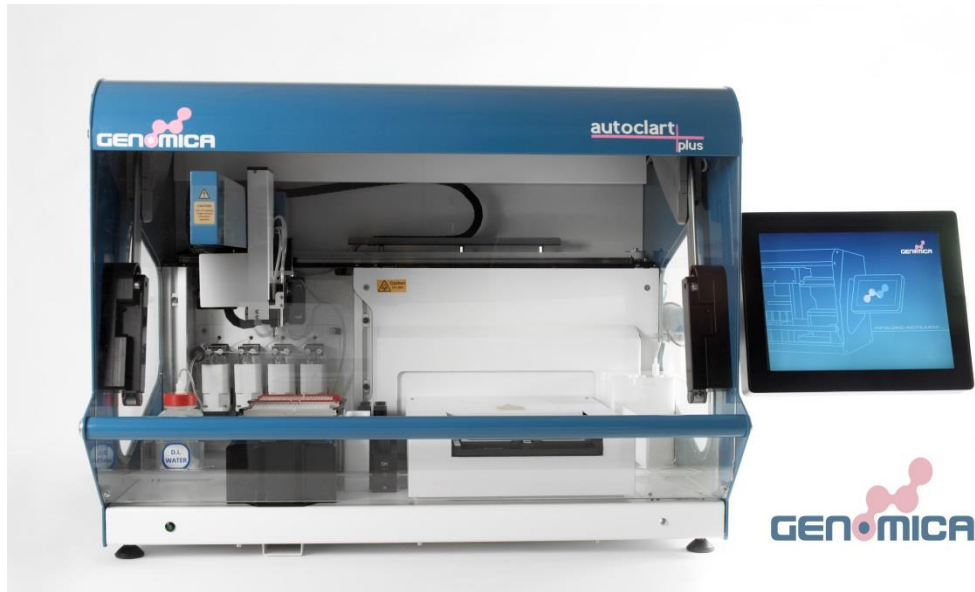


Figura 5. autoclart® plus

4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS

A continuación se proporciona una lista de todos los componentes requeridos y no suministrados:

4.1. Reactivos y material

- Agua destilada.
- Guantes desechables.
- Puntas con filtro o pipetas con desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado o "Cooler".
- Tubos Eppendorf autoclavados de 1.5 mL.
- Gradillas para tubos de 1.5 mL.
- Soporte para tubos de 0.5 mL/0.2 mL.
- Suero salino (0.9% NaCl).

4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Termociclador.
- Cabina de seguridad biológica.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 μ L, 20-200 μ L y 200-1000 μ L para el área de pre-PCR.

- Una micropipeta ajustable en el rango 1-20 μL para añadir el material genético a los Tubos de amplificación.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 μL , 20-200 μL , y 200-1000 μL para el área de post-PCR.
- Termobloque (Thermomixer) compatible con placas de amplificación de 96 pocillos con faldón y agitación, ajustable a 25°C, 30°C y 59°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío.

5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Léase detenidamente para evitar contaminaciones.

1. La técnica CLART® ENTHERPEX ha de ser llevada a cabo en dos áreas separadas físicamente, con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

Área de Pre-PCR: En éste área se lleva a cabo la preparación de las muestras, la extracción del material genético y la adición de material extraído a los tubos de amplificación. Trabajar siempre en cabina de seguridad biológica.

Área de Post-PCR: En éste área tiene lugar la amplificación y visualización del producto de amplificación. Se ha de evitar que el material del área de Post-PCR entre en contacto con el del área de Pre-PCR, por lo que se recomienda no entrar en el área de Pre-PCR tras trabajar en Post-PCR.

Cada área ha de disponer de su propio material independiente (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.), el cual nunca debe sacarse de dicho área.

2. Use guantes en todo momento. Es recomendable cambiar a menudo de guantes, y obligatorio hacerlo (i) antes de empezar a trabajar en cada una de las áreas anteriormente mencionadas, y (ii) antes de añadir ADN a los tubos de amplificación.

3. Limpie en profundidad las áreas de trabajo empleadas (poyata, cabinas, gradillas, pipetas), con lejía diluida al 10%, **después de procesar cada tanda de muestras.** Es obligatorio descontaminar todas las áreas de trabajo en caso de producirse una contaminación. Asimismo, se recomienda limpiar termocicladores y thermomixers antes y después de cada uso, siguiendo el mismo procedimiento.

4. Use puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones. Emplee juegos de pipetas diferentes para cada área. Y descarte la punta de la micropipeta después de cada uso.

5. Use material de laboratorio desechable y autoclavado.

6. No deben mezclarse reactivos de viales diferentes, incluso aunque pertenezcan al mismo lote.

7. Cierre los tubos de reactivos después de su uso, con el fin de evitar contaminaciones.

8. GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean condiciones distintas a las indicadas.

9. Como precaución específica para etapa de extracción y adición del material extraído al tubo de amplificación, se recomienda encender el flujo laminar de la cabina y la luz UV al menos 20 minutos antes de comenzar la extracción. Apagar la luz UV cuando se esté trabajando dentro de la cabina. La preparación de las muestras antes de su extracción, debe hacerse dentro de la cabina.

10. Antes del primer uso, comprobar la integridad de todos los recipientes. No usar los reactivos si se observa daño en los recipientes.

6. MUESTRAS

El kit **CLART[®] ENTHERPEX** permite analizar los siguientes tipos de muestras:

6.1. Frotis en torunda

Tomar la muestra con una torunda seca y estéril, de algodón o alginato, preferiblemente del tipo uretral (incluso para los frotis vaginales). No utilizar dispositivos que produzcan el sangrado de la lesión. Volver a introducir la torunda en su tubo sin ningún tipo de medio. Conservar la muestra a 4°C si se va a procesar antes de 7 días o a -20°C si se va a procesar después. Las torundas son de un solo uso por lo que una vez procesadas deben desecharse. Es importante evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

6.2. Suero o plasma

Las muestras de sangre de las que se desee extraer el plasma han de tomarse en tubos que contengan citrato o EDTA como anticoagulante, nunca heparina.

Para extraer el suero hay que dejar coagular la muestra de sangre durante 30 min y centrifugar a 1500 g durante 20 min.

En algunos casos, tras la toma de este tipo de muestras es posible aislar la fracción celular y proceder a la extracción del DNA/RNA a partir de ésta.

Si la muestra se va a procesar antes de 12 h, debe conservarse a 4° C. Si el análisis se realiza con posterioridad, la muestra debe dividirse en alícuotas, que habrán de conservarse a -70° C y ser descongeladas justo en el momento de su procesamiento. Es importante evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

6.3. Líquido ceforraquídeo

Si la muestra se va a procesar antes de 12 h, debe conservarse a 4° C. Si el análisis se realiza con posterioridad, la muestra debe dividirse en alícuotas, que habrán de conservarse a -70° C y ser descongeladas justo en el momento de su procesamiento. Es importante evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

6.4. Biopsias fijadas en formol o etanol e incluidas en parafina

Fijar las muestras en **formol tamponado** durante el menor tiempo posible (nunca más de 24 horas). El empleo de formol no tamponado o la fijación durante más de 24 horas puede degradar el ADN/ARN de la muestra. Es importante limpiar cuidadosamente la cuchilla con xileno, o usar cuchillas de un solo uso, antes y después de cortar la muestra, para evitar arrastrar restos de otra muestra cortada anteriormente. Hacer con el microtomo 2-3 cortes de 5 µm y ponerlos en un tubo estéril de 1,5 ml.

GENOMICA no se responsabiliza de los resultados si se utilizan otros tipos de muestras.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

La extracción de ADN/ ARN puede ser Manual o Automática. En cualquiera de los casos, para obtener unos resultados óptimos, se recomienda que el rendimiento de la extracción sea, como mínimo, de 5-10 ng/ μ l de ADN/ARN.

7.1. Extracción manual de ADN/ARN

7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción manual de ADN/ARN

- Trabajar en el área pre-PCR de extracción, siempre en campana y siguiendo las recomendaciones del punto 5.
- Antes de comenzar y al finalizar se debe limpiar cuidadosamente el área de la campana con lejía diluida al 10%.
- Limpiar las pipetas antes y después de cada uso con lejía diluida al 10%.
- Mantener las muestras en hielo.
- Utilizar tubos de 1.5 ml estériles. Mantenerlos lo más separado posible en la gradilla durante la extracción para evitar contaminaciones.
- Mantener la Proteinasa K en hielo mientras se esté usando, y después conservar a 4°C. Nunca volver a congelar una vez descongelada.

7.1.2. Protocolo de extracción manual de ADN/ ARN

7.1.2.1 Torunda

1. Añadir 1.5 ml de suero salino (cloruro sódico 0,9%) al tubo que contiene la torunda. Dar un vórtex durante 1 minuto. Al final de cada serie de muestras incluir un control negativo constituido por 1,5 ml de suero salino y procesarlo igual que el resto de las muestras.
2. Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml estéril.
3. Centrifugar las muestras durante 10 minutos en una microcentrífuga a 12.000 r.p.m. y retirar los restos de líquido con una micropipeta, evitando arrastrar el precipitado.
4. Descongelar un tubo de DB (Solución de Digestión 5X), un tubo de PK (Proteinasa K 10X) y un tubo de SD (Solución de dilución). Preparar la Mezcla de digestión, mezclando las siguientes cantidades por cada muestra a analizar:

$$70 \mu\text{l} \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = ___ \mu\text{l} \text{ de SD (Solución de Dilución).}$$

$$20 \mu\text{l} \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = ___ \mu\text{l} \text{ de DB (Solución de Digestión 5X).}$$

$$10 \mu\text{l} \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = ___ \mu\text{l} \text{ de PK (Proteinasa K 10X).}$$

5. Añadir 100 μ l de Mezcla de digestión a cada muestra. Resuspender suavemente el precipitado de células con ayuda de la micropipeta.

6. Incubar a 55-60°C durante 2 h.
7. Hervir durante 10 min para inactivar la Proteinasa K. Si el cierre de los tubos no es lo suficientemente fuerte, se recomienda perforar los tapones con una aguja para evitar que se abran durante la incubación a 100 °C. Procurar que el agua del baño no entre en el tubo por este agujero. No cerrar la tapa del baño.
8. Centrifugar en microcentrífuga a máxima velocidad durante 10 min. Pasar inmediatamente el sobrenadante a un tubo limpio y tomar una alícuota de 5 µl para llevar a cabo la reacción de amplificación. Conservar el resto a -20 °C.

7.1.2.2 Suero o plasma

1. Descongelar la muestra en hielo.
2. Tomar 100 µl de muestra clínica en un tubo de 1.5ml. Procesar en paralelo una muestra de 100 µl de suero salino, que servirá como control negativo de la reacción de amplificación y visualización.
3. Añadir 400 µl de SEML a cada tubo. Esperar a que la solución se descongele y se vuelva transparente antes de usarla. Mezclar invirtiendo los tubos varias veces e incubar durante 15 min a Tª ambiente.
4. Añadir 500 µl de Isopropanol (almacenado a -20º C, y mantenido en hielo hasta su uso). Mezclar invirtiendo los tubos varias veces y centrifugar, preferiblemente a 4º C, a 13000 rpm durante 20 min.
5. Aspirar el sobrenadante con micropipeta. Se puede utilizar la micropipeta de rango 200-1000 µL para eliminar el sobrenadante, siempre y cuando se emplee al final una micropipeta de menor escala para apurar los restos del fondo del tubo. Evitar eliminar el precipitado por equivocación.
6. Añadir 500 µl de Etanol 70% (almacenado a -20º C y mantenido en hielo hasta su uso). Agitar ligeramente para limpiar el precipitado del fondo y centrifugar 15 min a 13000 rpm.
7. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente como se indica en el paso 5. Secar perfectamente en la campana durante 15 ó 20 min dejando los tubos abiertos. Antes de resuspender la muestra, comprobar que no queden restos de etanol, que podrían inhibir la PCR.
8. Resuspender en 25 µl de SD (Solución de dilución). El ADN/ARN extraído se puede utilizar directamente para su análisis (se mantendrá en hielo hasta el momento de añadirlo al tubo de amplificación) o se puede **guardar a -20º C**.

7.1.2.3 Líquido cefalorraquídeo

1. Descongelar la muestra en hielo.

2. Tomar 50 µl de muestra clínica en un tubo de 1.5ml. Procesar en paralelo una muestra formada por 50 µl de suero salino y que servirá como control negativo de la reacción de amplificación y visualización.
3. Añadir 200 µl de SEML a cada tubo. Esperar a que la solución se descongele y se vuelva transparente antes de usarla. Mezclar invirtiendo los tubos varias veces e incubar durante 15 min a Tª ambiente.
4. Añadir 250 µl de Isopropanol (almacenado a -20º C, y mantenido en hielo hasta su uso). Mezclar invirtiendo los tubos varias veces y centrifugar, preferiblemente a 4º C, a 13000 rpm durante 20 min.
5. Aspirar el sobrenadante con micropipeta. Se puede utilizar la micropipeta de rango 200-1000 µL para eliminar el sobrenadante, siempre y cuando se emplee al final una micropipeta de menor escala para apurar los restos del fondo del tubo. Evitar eliminar el precipitado por equivocación.
6. Añadir 500 µl de Etanol 70% (almacenado a -20º C), mantener en hielo hasta su uso. Agitar ligeramente para limpiar el precipitado del fondo y centrifugar 15 min a 13000 rpm.
7. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente como se indica en el paso 5. Secar perfectamente en la campana durante 15 ó 20 min dejando los tubos abiertos. Antes de resuspender la muestra, comprobar que no queden restos de etanol, que podrían inhibir la PCR.
8. Resuspender en 25 µl de SD (Solución de dilución). El ADN/ARN extraído se puede utilizar directamente para su análisis (se mantendrá en hielo hasta el momento de añadirlo al tubo de amplificación) o se puede guardar a -20º C.

7.1.2.4 Biopsias

1.a. **Incluidas en parafina:** Hacer con el microtomo 2 cortes de 5 µm y ponerlos en un tubo Eppendorf de 1,5 ml autoclavado. Cambiar de cuchilla con cada muestra.

1.b. **Fijadas en formol o etanol:** Cortar/Machacar un fragmento de muestra de unos 2-3 cm con una cuchilla estéril sobre un porta estéril e introducirlo en un tubo estéril de 1,5 ml. Machacar el tejido con la punta de la pipeta, mezclar en el vórtex para facilitar la lisis.

2. Descongelar a temperatura ambiente un tubo de **DB** (Solución de Digestión 5X), un tubo de **PK** (Proteinasa K 10X) y un tubo de **SD** (Solución de Dilución). La Proteinasa K se debe mantener en hielo mientras se esté usando y después se debe guardar a 4ºC, nunca volver a congelarla una vez descongelada. Preparar la mezcla de digestión, mezclando las siguientes cantidades por cada muestra a analizar:

$$70 \times (n^{\circ} \text{ tubos} + 1) = \text{___ } \mu\text{l de SD (Solución de Dilución).}$$

$$20 \times (n^{\circ} \text{ tubos} + 1) = \text{___ } \mu\text{l de DB (Solución de Digestión 5X).}$$

$10 \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = \text{---} \mu\text{l}$ de **PK** (Proteinasa K 10X).

Añadir 100 μl de mezcla de digestión a cada muestra. Empujar el corte con la punta de la micropipeta para que quede completamente cubierto por la mezcla de digestión.

Añadir 100 μl de la mezcla a un tubo de 1,5 ml vacío, que se procesará como control negativo de extracción y visualización.

3. Incubar a 56° C durante 3 h en un termobloque o en un baño.
4. Hervir durante 10 min para inactivar la Proteinasa K. Si el cierre de los tubos no es lo suficientemente fuerte, se recomienda perforar los tapones con una aguja para impedir que se abran durante la incubación.
5. Centrifugar inmediatamente en microcentrífuga durante 10 min. Recoger el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml limpio, atravesando con la micropipeta la capa superior de parafina solidificada. El DNA extraído se puede utilizar directamente para su análisis o se puede guardar a -20° C.

7.1.3. Protocolo de extracción automática de ADN/ARN

Seguir recomendaciones del fabricante, teniendo en cuenta que para obtener unos resultados óptimos, se recomienda que el rendimiento de la extracción sea, como mínimo, de 5-10 ng/ μl de ADN/ARN.

7.2. Reacción de Amplificación

7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación

- Trabajar en el **área de pre-PCR**, siempre en el interior de una cabina con flujo laminar y siguiendo las recomendaciones de la Sección 5.
- Tener especial cuidado a la hora de añadir la Mezcla de Enzima a los tubos de amplificación, ya que contiene un elevado porcentaje de glicerol. Por lo que, si se introduce demasiado la punta de la pipeta, la Mezcla de Enzima se adhiere a las paredes provocando, por un lado, que se añada más mezcla de lo necesaria al tubo de reacción, y por otro lado, se produzca una pérdida de producto, pudiendo darse el caso de no tener suficiente para el resto de tubos de amplificación del kit.
- Durante el proceso de adición de ADN/ ARN, mantener los tubos separados y en hielo.

7.2.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar en hielo el número necesario de tubos según el número de muestras a procesar. Por cada muestra que se vaya a analizar se descongelan dos tubos, uno incoloro y otro verde, correspondientes a la Mix 1 y Mix 2 respectivamente. No usar temperaturas superiores a 37° C para la descongelación y mantener a 4°C.
2. Centrifugar brevemente los tubos de amplificación para trasladar todo el líquido al fondo del tubo (en caso de no disponer de adaptadores de microcentrífuga para tubo, se pueden sustituir por tubos más grandes a los que se haya cortado la tapa).
3. Añadir 2 µl de la Mezcla de Enzima a los tubos de amplificación verdes (Mix 2). Mantener la Mezcla de Enzima en hielo durante su manipulación.
4. Añadir 5 µl de ADN/ ARN extraído de las muestras, a una concentración mínima de 3ng/µl, a cada uno de los tubos de reacción. Resuspender varias veces con la pipeta. Mantener los tubos a 4°C.
5. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	45°C 45min 95°C 15min
45 ciclos	95°C 30 seg 56°C 90 seg 72°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta la retirada de los tubos (opcional)	

6. Iniciar el programa y colocar los tubos de reacción en el termociclador. La duración de la amplificación es de unas 5 horas, aunque puede variar ligeramente dependiendo del termociclador.

7.3. Visualización del producto amplificado

7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización

1. La visualización ha de llevarse a cabo siempre en el área de post-PCR. No introducir nunca de nuevo el producto amplificado en las áreas de pre-PCR.
2. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el thermomixer de placas ha estado a 59°C durante 30 min-1 hora.
3. Atemperar SH a temperatura ambiente. Comprobar que no tiene cristales en el momento de su uso.
4. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.

5. Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. Colocar los tubos de amplificación separados en el termociclador durante el proceso y nunca sobrepasar los 10 min. de desnaturalización.
6. Durante la visualización no hace falta utilizar puntas con filtro pero sí es necesario usar una punta diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añade un nuevo reactivo, aunque se trate de TL. Sí es necesario utilizar puntas con filtro durante la adición de amplificadores al pocillo del CS.
7. En caso de emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, descontaminar con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo y aclarar la solución de lejía aspirando agua destilada. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
8. En el caso de CSs, introducir el CS en el Thermomixer INMEDIATAMENTE después de añadir los productos amplificados, especialmente si el número de CSs a procesar es elevado.
9. En el caso de que se realicen un número alto de CSs a la vez, se recomienda añadir los reactivos (salvo los amplificados) con pipetas multicanal y cubetas específicas, para esto se debe seleccionar una cubeta para cada tipo de reactivo. Al final de cada ensayo se deben lavar las cubetas con lejía al 10%, y después con agua destilada.
10. Al aspirar las diferentes soluciones dentro de los pocillos en el caso de CSs, NO se dejará volumen residual (ver recomendación específica en el apartado 7.3.2.).
11. Tras la incubación con Solución CJ diluida, es esencial lavar en profundidad y rápidamente los pocillos del **CS**, para evitar que queden residuos que podrían ocasionar una precipitación inespecífica tras reacción con RE.
12. Dispensar todas las soluciones en la pared del pocillo del CS; nunca directamente sobre el fondo del mismo. Asimismo, aspirar completamente las diferentes soluciones de los pocillos del CS sin tocar el fondo del mismo con la punta. De lo contrario, podría dañarse el microarray.
13. No dejar secar el pocillo totalmente.
14. Evitar generar espuma al añadir reactivos.
15. Al visualizar la imagen en el CAR®, comprobar que aparecen los marcadores de posición y que no hay burbujas, fibras o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo exterior del pocillo con un papel de celulosa impregnado en alcohol.

La visualización puede llevarse a cabo de manera Manual (apartado 7.3.2), en “autoclar[®]” (apartado 7.3.3) y en “autoclar[®] plus” (apartado 7.3.4).

7.3.2. Protocolo de visualización manual

1. Encender el CAR[®] antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos. El aparato debe estar listo en el momento de la lectura para evitar esperas innecesarias que produzcan un exceso de revelado.
2. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador lo más separados posible, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
3. Preparación de Solución de Lavado: Para cada **CS** que se vaya a procesar, preparar 10 mL de TL diluido, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada. Agitar suavemente.
4. Prelavado de los CS: Colocar los **CS** necesarios en el adaptador de placa microtiter. Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo antes de usarlo. Resuspender 10-15 veces con la pipeta multicanal, teniendo en cuenta que no se debe tocar la superficie del microarray. Se recomienda realizar este lavado mientras tiene lugar la desnaturalización de los productos de amplificación, y mantener la solución de lavado en los **CS** hasta la adición de los dichos productos.

El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco durante mucho tiempo. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

5. Hibridación: Una vez desnaturalizados los productos amplificados, retirar la solución de lavado de los pocillos con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío. Inmediatamente después, añadir a cada pocillo 100 µL de SH atemperado a Temperatura ambiente, evitando generar espuma.

Añadir a cada pocillo de CS, **5 µL** de producto amplificado desnaturalizado. Resuspender la solución varias veces, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. Se recomienda cargar cada tira de manera independiente y separada del resto para evitar contaminaciones. Al concluir la adición de muestras en cada CS, introducir inmediatamente el CS en el thermomixer de placas.

Cubrir el adaptador de placa microtiter y los **CSs** con la tapa de plástico, e incubar en el thermomixer de placa durante **1 hora a 59° C, y 550 rpm**.

Después de la incubación, retirar la placa del thermomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con pipeta o bomba de vacío. El CS debe quedar sin restos de solución. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

Programar el thermomixer a 30°C y en movimiento para su uso posterior en el paso 7 de más abajo. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

6. Doble lavado: Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir. Usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Mantener las muestras en la solución de lavado hasta que el thermomixer alcance 30°C.
7. Bloqueo y conjugado: Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla y añadir **7.5 µL de CJ en 1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un **CS**). A continuación, homogenizar la solución usando vórtex.

Aspirar el TL diluido de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir **100 µL** de Solución CJ diluida a cada pocillo. Incubar durante **15 minutos exactos en el thermomixer de placa a 30°C y 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y retirar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. Dejar programado el thermomixer a 25°C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 8. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

8. Triple lavado: Inmediatamente después, eliminar la Solución CJ diluida, y añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar el TL diluido con la pipeta o bomba de vacío procurando eliminar el mayor volumen posible. Repetir la operación **dos veces más**. Es **muy importante** que no queden restos de Solución CJ diluida en los pocillos.
9. Revelado: Eliminar por completo el TL diluido de los pocillos. A continuación, añadir **100 µL** de RE a cada pocillo e incubar durante **10 minutos a 25°C** en el thermomixer **sin agitación**.

Retirar completamente la solución RE usando pipeta o bomba de vacío. Los pocillos deben quedar totalmente secos para la lectura. La lectura debe llevarse a cabo inmediatamente después de retirar RE.

10. Lectura: Colocar el adaptador de placa microtiter junto con el/ los CS/s a analizar en la bandeja del CAR®. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

7.3.3. Protocolo de visualización en autoclart®

1. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos.

2. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
3. Encender el equipo autoclart® y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
4. Cerrar la puerta y pulsar el mando.
5. Seleccionar “Run” en el menú de inicio.
6. Seleccionar el tipo de ensayo a realizar: ***Pneumovir/ENTHERPEX***.
7. Seleccionar el pocillo de la tira en el que se desea comenzar: A1 o E1, éste último en el caso de que se reutilice un CS donde se hayan procesado previamente los 4 primeros pocillos.
8. Seleccionar el número de muestras. Con autoclart® se pueden procesar desde 4 a 96 muestras. El número de muestras debe ser un múltiplo de 4.
9. Verificar que el número de muestras y el pocillo de inicio (A1 o E1) indicados son correctos.
10. Colocar el rack completo de puntas en su posición correspondiente.
11. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos.
12. Llenar la botella de agua destilada con 250 ml de agua destilada.
13. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® solicita en función del número de muestras que se quieran procesar:

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de TL diluido necesaria. Para prepararlo realizar una dilución 1:10 de TL en agua destilada.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada que aparece en la pantalla.

CJ. Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida que indique la pantalla. Para ello añadir 5 µL de CJ en 1 mL de DC (cantidades adecuadas para un CS). Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

14. Cerrar la puerta y pulsar el mando para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los CS y la adición de SH; a continuación emitirá un pitido para indicar que es el momento de la adición de las muestras; el pitido cesará cuando el usuario abra la puerta del equipo.
15. Para añadir las muestras, sacar los **CSs** del autoclart® y añadir **5 µl** de producto amplificado desnaturalizado del tubo incoloro, y **5 µl** de producto amplificado desnaturalizado del tubo verde, a cada pocillo del CS. Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación, introducir de nuevo la placa en el autoclart® y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.
16. Cuando ha terminado el proceso de visualización, el autoclart® emite un pitido hasta que el usuario abre la puerta del equipo para sacar los CS y proceder a la lectura en el CAR®.

ADVERTENCIA: Una vez finalizada la visualización en autoclart® debe procederse de forma inmediata a la lectura de los resultados en el CAR®, en caso contrario, podrían aparecer falsos negativos por pérdida de la intensidad de las sondas.

17. Coloque la placa en el CAR® para tomar las imágenes de todos los pocillos. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

7.3.4. Protocolo de visualización en autoclart® plus

El equipo puede ser utilizado de dos formas, dependiendo de las necesidades del cliente. Para más información ver más abajo y también el Manual de usuario del “autoclart® plus.

A) Proceso de visualización completo con adición manual de la muestra

1. Encender el equipo autoclart® plus y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
2. Seleccionar “Nuevo análisis” en el menú inicio.
3. Indicar el número de **CSs** necesarios presionando las cruces que aparecen en la fila superior.
4. Seleccionar el tipo de ensayo “CLART_ENTHERPEX” de los listados. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los **CSs** presione “Auto Select”. Después pulse la flecha de dirección derecha para continuar.
5. En la pantalla de Configuración del análisis seleccionar “Adición manual de la muestra” y pulse la flecha de dirección derecha para continuar.

6. El instrumento comenzará el paso de acondicionamiento de temperaturas. Para ello aparecerán en pantalla una serie de requisitos; pulse la flecha de dirección para aceptarlos.
7. Colocar los racks completos de puntas de 1000 µl para dispensar los reactivos.

¡ADVERTENCIA! Las puntas de 10 µl para la adición de muestras NO SON NECESARIAS.

Nota: Tenga en cuenta que en este momento comienza la refrigeración de los reactivos. Cuando termina, el equipo emite una señal acústica.

8. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de amplificación. Colocar los tubos amplificados en el termociclador, e incubar a 95°C durante 10 minutos. Sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.
9. Colocar el soporte con el número requerido de **CSs** en el equipo.
10. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos y continuar.
11. Llenar la botella de agua con 250 ml de agua destilada, pulsar siguiente paso.
12. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® plus solicita en función del número de muestras que se quieran procesar.

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de Solución de Lavado necesaria. Para preparar la Solución de Lavado, realizar una dilución 1:10 del TL en agua destilada.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada que aparece en la pantalla.

CJ. Se recomienda centrifugar el CJ durante 10 segundos antes de usarse. Cada 1 ml de solución CJ diluida que indique la pantalla, se prepara añadiendo 1 ml de DC y 5 µl de Solución CJ. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

13. Cerrar la puerta y pulsar “inicio” para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los **CSs** y la adición de SH; a continuación emitirá un pitido para indicar que es el momento de la adición de las muestras; el pitido cesará cuando el usuario cierre la puerta del equipo o presione el símbolo que aparece en la pantalla táctil para acallarlo.

14. Para añadir las muestras, sacar los **CSs** del autoclart® plus y añadir **5 µl** de producto amplificado desnaturalizado del tubo incoloro y **5 µl** de producto amplificado desnaturalizado del tubo verde a cada pocillo del CS. Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación, introducir de nuevo la placa en el autoclart® plus y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.
15. Cuando ha finalizado el proceso de visualización, el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

B) Solo lectura de la muestra

1. Encender el equipo autoclart® plus.
2. Colocar el soporte con el número de **CSs** a leer en el equipo y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
3. Seleccionar “Nuevo análisis” en el menú inicio.
4. Indicar el número de **CSs** necesarios presionando la cruz que aparece en cada columna.
5. Seleccionar el tipo de ensayo “CLART_ENTHERPEX” del listado. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los **CSs** presione “Auto Select”. Después **pulse la flecha de dirección derecha para continuar.**
6. **En la pantalla de “Configuración del análisis” seleccionar “Lectura” y pulse la flecha de dirección derecha para continuar.**
7. Cuando ha terminado la lectura, el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

8. RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El análisis de resultados y la emisión del informe correspondiente serán llevados a cabo de manera automática por el equipo, CAR® o autoclart® plus.

En la pantalla del equipo aparecerá una tabla con tres columnas, en la columna de la izquierda aparecerán los virus que se caracterizan en el microarray. En la columna del centro aparece el resultado de positivo o negativo para cada virus, y en la columna de la derecha aparecerá la conformidad del control de amplificación.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos fundamentalmente a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales, etc.). Con el kit **CLART® ENTHERPEX** se han eliminado estos falsos negativos de amplificación añadiendo un control interno en ambos tubos de reacción.

Cada tubo de reacción contiene los siguientes oligos:

- Oligonucleótidos que amplifican un plásmido modificado incluido en el tubo de amplificación y que se usa como control de amplificación de la reacción de RT-PCR/PCR.
- Oligonucleótidos específicos de virus herpes humanos y Enterovirus.

El tubo de RT-PCR se ha diseñado para favorecer la amplificación de los virus frente a la del control de amplificación. De manera que, en ciertas condiciones (ej. cuando hay un elevado número copias de un virus o cuando la muestra presenta coinfección de varios tipos a la vez) puede suceder que no se amplifique el control y aparezca una lectura de CONFORME.

A continuación se describen los distintos resultados que se pueden obtener con el Kit:

RESULTADO VÁLIDO:

RESULTADO para algún virus	SEÑAL DEL CONTROL	INTERPRETACIÓN
√. POSITIVO	√. POSITIVO	POSITIVO
√. POSITIVO	x. NEGATIVO	POSITIVO
x. NEGATIVO	√. POSITIVO	NEGATIVO

RESULTADO NO VÁLIDO:

RESULTADO para	SEÑAL DEL CONTROL	INTERPRETACIÓN
----------------	-------------------	----------------

algún virus		
x. NEGATIVO	x. NEGATIVO	PCR Inhibida

Se recomienda repetir la extracción o, si esto no es posible, pedir al facultativo una nueva toma de muestra al paciente.

RESULTADO NO CONCLUYENTE.

CAUSA:

- Las réplicas de una misma sonda arrojan valores muy diferentes entre sí.
- En coinfecciones de más de 5 virus.

9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

9.1. Control de interferencias conocidas

Existen sustancias que pueden interferir en el funcionamiento del sistema **CLART® ENTHERPEX**. Principalmente, son sustancias que inhiben la mezcla de enzimas y, por tanto, la reacción de amplificación. Las interferencias más conocidas son:

1 Presencia de hemoglobina o parafina tras la extracción del ADN/ARN. El ADN extraído a partir de muestras de sangre total o hemoderivados, así como el obtenido a partir de muestras de tejidos incluidos en parafina, puede contener restos de hemoglobina y parafina respectivamente. Este problema se puede evitar purificando el ADN/ARN tras su extracción.

2 Restos de Isopropanol en el ADN/ARN. En el proceso de extracción del ADN/ARN a partir de muestras de suero, plasma y líquido cefalorraquídeo, tiene lugar una etapa de precipitación con Isopropanol. Si no se procede a un secado correcto del precipitado, la presencia de Isopropanol en la muestra puede producir una inhibición de la reacción de amplificación.

3 Utilización de muestras no adecuadas. El análisis de cualquier otro tipo de muestra clínica distinta a las indicadas en el manual del kit **CLART® ENTHERPEX**, así como una toma incorrecta de las muestras, puede conllevar que el resultado del análisis no sea concluyente. Por ejemplo, si la torunda ha sido incluida en algún tipo de medio, la amplificación por PCR puede resultar inhibida.

4 La conservación inadecuada de las muestras puede influir en el resultado del análisis. Si las muestras se someten a condiciones que puedan provocar una degradación del ADN que contienen, por ejemplo, un exceso en el tiempo de fijación en formol, el resultado del análisis será de muestra inhibida por falta de amplificación del control del ADN de la muestra.

5 Actividad residual de la Proteinasa K. En el proceso de extracción de ADN/ARN a partir de torundas y biopsias, se tiene que inactivar la Proteinasa K mediante incubación a 100 °C durante 10 minutos. En estas condiciones, la inactivación se produce de forma completa. Si este paso fuera omitido o las condiciones de inactivación fueran menos estrictas, podría perdurar una actividad residual de la Proteinasa K, lo cual podría resultar en degradación de la ADN polimerasa y, por tanto, en inhibición de la PCR.

9.2. Especificaciones técnicas

9.2.1. Parámetros analíticos

Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se determina mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN de plásmidos recombinantes para cada uno de los virus detectados por el kit. Cada uno de ellos lleva inserto el producto amplificado, incluyendo la parte complementaria a las sondas específicas de detección. La visualización se realizó en CSs. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

VIRUS	Nº copias de plásmido recombinante por reacción de PCR
VZV	10
HHV-7	
HSV-1	
HSV-2	100
CMV	
EBV	
HHV-6	
HHV-8	
Coxsackivirus	1000
Echovirus	
Poliovirus	

Tabla 1. Relación del número de copias de plásmido recombinante necesarias para obtener una sensibilidad del 100% en la detección de cada uno de los microorganismos.

Especificidad analítica.

Se llevaron a cabo experimentos de especificidad con plásmidos recombinantes visualizados en CSs.

VIRUS	ESPECIFICIDAD ANALÍTICA
HSV-1	100 %
VZV	

CMV	
HHV-6	
HHV-7	
HHV-8	
HSV-2	99.4 %
EBV	
Enterovirus	92.2 %

Tabla 2: Especificidad analítica por virus.

9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Para determinar los parámetros de utilidad diagnóstica del sistema **CLART® ENTHERPEX**, se han realizado estudios comparativos de la técnica con extracción manual, frente a las siguientes técnicas:

- Herplex (Kit de GENOMICA): para los virus HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV y HHV-6
- PCR cuantitativa: en algunos de los casos, para CMV y EBV
- PCR a tiempo real: para Enterovirus
- PCR de desarrollo propio y detección en gel: para los virus HHV-7 y HHV-8
- Inmunohistoquímica para HHV-8

Dichos estudios se llevaron a cabo en colaboración con los siguientes hospitales:

- Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander)
- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza)
- Hospital Universitario La Paz (Madrid).

Se analizaron 173 muestras de las cuales 30 fueron torundas, 56 sueros/plasmas, 19 muestras de líquido cefalorraquídeo y 68 biopsias.

En la Tabla 3 se ilustran los Parámetros diagnósticos obtenidos para **CLART® ENTHERPEX**:

VIRUS	Muestras Positivas Analizadas	Muestras Negativas Analizadas	Total	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
HSV-1					
Torundas	16	14	30	100	100
Suero/Plasma	4	52	56	75	100
LCR	7	12	19	57.1	100
Biopsias	8	60	68	87.5	100
<i>Total</i>	<i>35</i>	<i>138</i>	<i>173</i>		
HSV-2					
Torundas	4	26	30	75	100
Suero/Plasma	0	56	56	--	--
LCR	0	19	19	--	--
Biopsias	4	64	68	100	100

<i>Total</i>	<i>8</i>	<i>165</i>	<i>173</i>		
VZV					
Torundas	3	27	30	100	100
Suero/Plasma	1	55	56	100	100
LCR	2	17	19	100	94.1
Biopsias	4	64	68	100	95.3
<i>Total</i>	<i>10</i>	<i>163</i>	<i>173</i>		
CMV					
Torundas	2	28	30	50	100
Suero/Plasma	47	9	56	87.2	100
LCR	8	11	19	62.5	100
Biopsias	41	27	68	95.1	100
<i>Total</i>	<i>98</i>	<i>75</i>	<i>173</i>		
EBV					
Torundas	6	24	30	100	100
Suero/Plasma	2	54	56	100	98.1
LCR	2	17	19	100	94.1
Biopsias	38	30	68	94.7	93.3
<i>Total</i>	<i>48</i>	<i>125</i>	<i>173</i>		
HHV-6					
Suero/Plasma	9	47	56	77.8	100
Torundas	0	30	30	--	--
LCR	3	16	19	33.3	100
Biopsias	23	45	68	91.3	100
<i>Total</i>	<i>35</i>	<i>138</i>	<i>173</i>		
HHV-7					
Torundas	3	27	30	100	100
Suero/Plasma	2	54	56	100	100
LCR	1	18	19	100	100
Biopsias	11	57	68	100	100
<i>Total</i>	<i>17</i>	<i>156</i>	<i>173</i>		
HHV-8					
Torundas	0	30	30	--	--
LCR	0	19	19	--	--
Suero/Plasma	3	53	56	100	100
Biopsias	2	66	68	100	100
<i>Total</i>	<i>5</i>	<i>168</i>	<i>173</i>		
ENTEROVIRUS					
Suero/Plasma	0	56	56	--	--
Biopsias	0	68	68	--	--
Torundas	0	30	30	--	--
LCR	10	9	19	80	100
<i>Total</i>	<i>10</i>	<i>163</i>	<i>173</i>		

Tabla 3. Parámetros diagnósticos de CLART® ENTHERPEX

10. REFERENCIAS

1. Tsan-Chi Chen, Guang-Wu Chen, Chao Agnes Hsiung, Jyh-Yuan Yang, Shin-Ru Shih, Yiu-Kay Lai, Jyh-Lyh Juang: "Combining Multiplex Reverse Transcription-PCR and a Diagnostic Microarray to Detect and Differentiate Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16". *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2212-2219 (2006).
2. Jaaskelainen AJ, Piiparinen H, Lappalainen M, Koskiniemi M, Vaheri A.: "Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens". *Journal of Clinical Virology*, 37(2), 83-90 (2006)
3. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P.: "Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays". *Journal Medical Virology*, 72(3), 484-495 (2004).
4. Zheng ZB, Wu YD, Yu XL, Shang SQ.: "DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses". *Journal Medical Virology*, 80(6), 1042-1050 (2008).
5. Hudnall SD, Chen T, Allison P, Tying SK, Heath A.: "Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion*, Apr 15 (2008).
6. Afenjar A, Rodriguez D, Rozenberg F, Dorison N, Guët A, Mignot C, Doummar D, Billette de Villemeur T, Ponsot G.: "Human herpes virus type 6, etiology of an acute encephalitis in childhood: case report". *Arch Pediatric*, 14(5), 472-475 (2007).
7. Zambrano Y, Chiarello A, Soca A, Villalobos I, Marreno M, Soler M, Laferte J, Alvarez M." Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of central nervous system infections". *Invest Clin.*, 47(4),337-347 (2006).
8. Huang C, Morse D, Slater B, Anand M, Tobin E, Smith P, Dupuis M, Hull R, Ferrera R, Rosen B, Grady L. " Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses." *Clin Infect Dis.*, 39(5), 630-635 (2004).
9. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. "Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study". *Journal Medical Virology* 57(2), 145-151 (1999).
10. Kanerva M, Jääskeläinen AJ, Suvola M, Piiparinen H, Vaheri A, Pitkäranta A. "Human herpesvirus-6 and -7 DNA in cerebrospinal fluid of facial palsy patients". *Acta Otolaryngol.* 128(4), 460-464 (2008).
11. Ginanneschi F, Donati D, Moschetti D, Dominici F, Cermelli C, Rossi A. "Encephaloradiculomyelitis associated to HHV-7 and CMV co-infection in immunocompetent host". *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 109(3), 272-276 (2007).

12. Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, Ventola C, Seccia R, Stomati D, Brancasi B.: "Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system". *Journal Clinic Virology*, 25(suppl.), S71-S78 (2002).
13. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, Hermet L, Roger O, Agut H.: "Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gentrade mark kit". *Journal Virology Methods*, 149(2), 285-291 (2008).
14. Hubacek P, Sedlacek P, Keslova P, Formankova R, Stary J, Kulich M, Cinek O.: "Incidence of HHV7 in donors and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". *Pediatric Blood Cancer*. 50(4), 935 (2008).
15. Holden SR, Vas AL.: "Severe encephalitis in a haematopoietic stem cell transplant recipient caused by reactivation of human herpesvirus 6 and 7". *Journal Clinic Virology*, 40(3), 245-247 (2007).
16. Berger C, Hug M, Gysin C, Molinari L, Frei M, Bossart W, Nadal D.: "Distribution patterns of beta- and gamma-herpesviruses within Waldeyer's ring organs". *Journal Med. Virology*, 79(8), 1147-1152 (2007).
17. Chen T, Hudnall SD.: "Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection". *Mod. Pathol.*,19(5), 726-737 (2006).
18. Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, Aquino VH, Figueiredo LT.: "Viral infections of the central nervous system in Brazil". *Journal Infect.*, 54(6), 589-596 (2007).
19. Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Ohno S, Aoki K, Suzutani T. "Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2". *Journal Med. Virology*, 80(5), 883-7 (2008).
20. Ulrich C, Hackethal M, meyer T, Geusau A, Nindl I, Ulrich M, Forschner T, Sterry W, Stockfleth E.: "Skin infections in organ transplant recipients". *Journal Dtsch Dermatol Ges.*, 6(2), 98-105, (2008).
21. Anne de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, Uiterwaal CS, van Baarle D, Sanders EA, Boelens J.: "Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome". *Biol. Blood Marrow Trasplant*, 14(7), 831-839 (2008).
22. Kim DH, Messner H, Minden M, Gupta V, Kuruvilla J, Wright J, Lipton J.: "Factors influencing varicella zoster virus infection after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: low-dose acyclovir prophylaxis and pre-transplant diagnosis of lymphoproliferative disorders". *Transpl. Infect Dis.*, 10(2), 90-98 (2008).
23. Dolcetti R.: "B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders". *Autoimmun Rev.*, 7(2):96-101 (2007).
24. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M.: "Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis". *Br. J. Ophthalmol.*, 11 (2008)




25. Karatas H, Gurer G, Pinar A, Soylemezoglu F, Tezel GG, Hascelik G, Akalan N, Tuncer S, Ciger A, Saygi S.: "Investigation of HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-6 and HHV-8 DNA by real-time PCR in surgical resection materials of epilepsy patients with mesial temporal lobe sclerosis". *J. Neurol Sci.*, 164(1-2); 151-6 (2008).
26. Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A.: "Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay". *Journal Clin. Virology*, 42(1): 58-64 (2008).
27. Read SJ, Mitchell JL, Fink CG.: "LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system". *Journal Clin. Microbiology*, 39(9): 3056-3059 (2001).
28. Mette Kusk Bøving, Lisbeth Nørhum Pedersen, and Jens Kjølseth Møller
Eight-Plex PCR and Liquid-Array Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Cerebrospinal Fluid from Patients with Suspected Meningitis . *J. Clin. Microbiol.* April 2009 47: 908-913

Anexo I:

COMPOSICIÓN:

Reactivos de extracción

- **SEML** (Solución de Extracción de Muestras Líquidas)

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	3x	4 ml	3x	4 ml
48	6x	4 ml	6x	4 ml
CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008: Este producto es una Mezcla de sustancias				
COMPONENTES	%			
Glicógeno	5	Esta sustancia No posee componentes peligrosos		
Tri sodio citrato di hidrato	25	Esta sustancia No posee componentes peligrosos		
Tiocianato de guanidinio CAS: 593-84-0 Index: 615-030-00-5	80	<i>Esta sustancia se considera nociva en caso de ingestión ,contacto con la piel o inhalación. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Nocivo para los organismos acuáticos, con efecto nocivos duraderos</i>		
		PICTOGRAMA	FRASE	
		Atención ! 	H302+H312+H332,H412, P261,P280, P301+P312+P330	
N-Lauroyl sarcosina CAS : 137-16-6	50	<i>Esta sustancia se considera mortal en caso de inhalación.Provoca irritación cutánea y lesiones oculares</i>		
		PICTOGRAMA	FRASE	
		Peligro ! 	H315,H318,H330 P260,P280,P284,P305+P351 +P338,P310	
DTT CAS: 3483-12-3	1	<i>Esta sustancia se considera nociva en caso de ingestión. Provoca irritación cutánea y ocular grave.</i>		
		PICTOGRAMA	FRASE	
		Atención ! 	H302,H315,H319 P301 + P312 + P330 P305 + P351 + P338	

- **Etanol**


Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	30 ml	1x	30 ml
48	4x	30 ml	4x	30 ml
COMPONENTES	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Etanol CAS 64-17-5 CE 200-578-6	70	Esta sustancia se considera líquido inflamable e irritante en contacto con los ojos.		

Index: 603-002-00-5 REACH:01-2119457610-43-	PICTOGRAMA		FRASE
	Peligro! 		H225 H319 P210, P240 P305+P351+P338 P403+P233

- **SD (Solución de dilución)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	1.5ml	1x	1.5ml
48	4x	1.5 ml	4x	1.5 ml
COMPONENTES				
Solución de dilución	100	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008: <i>Esta sustancia No posee componentes peligrosos</i>		

- **Isopropanol**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	1.5ml	1x	1.5ml
48	4x	1.5 ml	4x	1.5 ml
COMPONENTES				
Isopropanol CAS:67-63-0 EC:200-661-7 Index:603-117-00-0	100	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008: Esta sustancia se considera líquido inflamable e irritante en contacto con los ojos. Nocivo para determinados organismos		
		PICTOGRAMA		FRASE
		Cuidado! 		H225 H319 H336 P243,P261,P271,P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338

- **Proteinasa K**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	1.5ml	1x	1.5ml
48	4x	1.5 ml	4x	1.5 ml
COMPONENTES				
Proteinasa K CAS 39450-01-6 EINECS: 254-457-8	100	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008: Esta sustancia se considera que puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Provoca irritación cutánea , ocular grave y de vías respiratorias		
		ICONO		FRASE
		Peligro !		H315,H319,H335, P285,P261,P305+P351+P338, P321,P405,P501,

--	--	--	--

- **Solución de digestión**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	2x	1.4ml	2x	1.4ml
48	1x	1.4ml	1x	1.4ml
COMPONENTES				
	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Tampon Taq 10 X sin Mg	50	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		
Tween 20	2.5	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		
MgCl ₂ 25 mM	30	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		


Reactivos de amplificación;

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	16x	45 µl	16x	45 µl
48	48x	45 µl	48x	45 µl
COMPONENTES				
	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Master Mix PCR	89	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		
Oligonucleótidos de amplificación	11	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		

Reactivos de visualización;

- **SH (Solución de Hibridación)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	6ml	1x	11.5ml
48	1x	6ml	1x	11.5ml
COMPONENTES				
	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Fosfato sódico	25	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		

SSC	5	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		
EDTA	0.2	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		
Triton X-100	2.25	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> La concentración de los posible componentes peligrosos de acuerdo con el reglamento se encuentran por debajo de los límites permitidos		
		COMPONENTE PELIGROSO	ICONO	FRASE
		p-tertiary-Octylphenoxy polyethyl alcohol CAS: 9002-93-1 concentración <0.05	Peligro! 	H319,H412 P305+P351+P338

- **RE (Revelado)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	3ml	-	-
48	1x	5.5 ml	1x	11.5ml
COMPONENTES	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Solución acuosa de o-dionisina en un buffer de citrato con peróxido de hidrogeno	100	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias.</i> La concentración de los posible componentes peligrosos de acuerdo con el reglamento se encuentran por debajo de los límites permitidos Puede ser peligroso para los organismos acuáticos		

- **DC (Disolvente del Conjugado)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	7ml	1x	11.5ml
48	1x	7ml	1x	11.5ml
COMPONENTES	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Tampón de fosfato salino BSA	100	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		

- **CJ (Conjugado)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	100 µl	1x	100 µl
48	1x	100 µl	1x	100 µl
COMPONENTES	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Streptavidina peroxidasa	1	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		

Diluyente de conjugado (DC)	99	<i>Este producto</i> No posee componentes peligrosos
-----------------------------	----	--

- **TL (Tampón de Lavado)**

Nº test	Manual		autoclart y autoclart plus	
16	1x	7ml	1x	11.5ml
48	1x	7ml	1x	11.5ml
COMPONENTES	%	CLASIFICACIÓN Según el reglamento 1272/2008:		
Tampón fosfato salino con Tween	100	<i>Este producto es una Mezcla de sustancias</i> No posee componentes peligrosos		

***Texto completo de las frases H y P mencionadas :**

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

H302 Nocivo en caso de ingestión.

H302 + H312 + H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H312 Nocivo en contacto con la piel.

H315 Provoca irritación cutánea.

H318 Provoca lesiones oculares graves.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H330 Mortal en caso de inhalación.

H332 Nocivo en caso de inhalación.

H336 Puede provocar somnolencia o vértigo.

H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Declaración(es) de prudencia

P210 Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. No fumar.

P240 Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción. Intervención

P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas.

P260 No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.

P280 Llevar guantes/ prendas de protección.

P284 Llevar equipo de protección respiratoria.

P301 + P312 + P330 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal. Enjuagarse la boca.

P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando

P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.

P304+P340 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

Métodos para el tratamiento de residuos Producto

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.