



Pneumo CLART bacteria®

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS
CAUSANTES DE INFECCIONES RESPIRATORIAS HUMANAS
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

Pneumo CLART bacteria[®]

Pneumo CLART bacteria[®] está bajo la protección de la familia de patentes correspondiente a la solicitud de Patente Internacional PCT WO2015055768. Dicha familia comprende miembros en tramitación en Europa, Brasil y China.

CLART[®], *CLART-Strip*[®], *CAR*[®], *SAICLART*[®], *AUTOCLART*[®] y *Pneumo CLART bacteria*[®], son marcas registradas por GENOMICA.

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



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



Versión 6
Agosto 2017

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	4
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN	5
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	8
3.1. Reactivos de amplificación	8
3.2. Componentes de visualización	8
3.3 Otros componentes	9
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS.....	11
4.1. Reactivos y material	11
4.2. Equipos	11
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN	12
6. MUESTRAS	13
7. PROTOCOLO DE TRABAJO.....	14
7.1. Extracción automática de ADN, en NucliSENS BioMérieux easyMag.	14
7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción y la adición del material extraído al tubo de amplificación.....	14
7.1.2. Protocolo de extracción automática de ADN en equipo NucliSENS BioMérieux easyMag.....	14
7.2. Reacción de Amplificación.....	15
7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación.....	15
7.2.2. Protocolo de Amplificación	15
7.3. Visualización del producto amplificado.....	16
7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	16
7.3.2. Protocolo de visualización manual.....	17
7.3.3. Protocolo de visualización en autoclart®	19
7.3.4. Protocolo de visualización en autoclart® plus.....	21
8. RESULTADOS.....	25
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	27
9.1. Control de interferencias conocidas.....	27
9.2. Especificaciones técnicas.....	27
9.2.1. Parámetros analíticos	27
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	28
10. REFERENCIAS	30

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



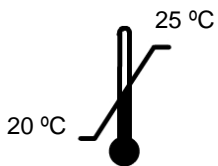
Fecha de caducidad



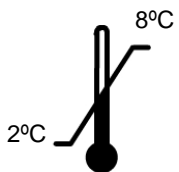
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



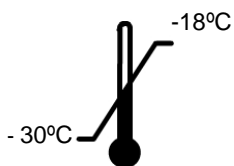
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 2 °C y 8 °C



Conservar entre -30 °C y -18 °C

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN

Pneumo CLART bacteria[®] permite detectar la presencia de las principales bacterias causantes de infecciones respiratorias humanas en las siguientes muestras clínicas: esputos, lavados/exudados/aspirados nasofaríngeos, lavado broncoalveolar (BAL) y broncoaspirados (BAS).

Las bacterias detectables con **Pneumo CLART bacteria**[®] son:

- *Staphylococcus aureus*^{1, 2}
- *Streptococcus pneumoniae*²
- *Haemophilus influenzae*²
- *Haemophilus spp*²
- *Moraxella catarrhalis*²
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Bordetella holmesii*
- *Bordetella spp.*³

1 Incluyendo la detección del transposón responsable de la aparición de la resistencia a meticilina, mecA. La presencia de mecA puede ser debida a la presencia de *S. aureus*, o de cualquier otro *Staphylococcus* Coagulasa Negativo (SCN) presente en la muestra. En el informe de este kit solo se informa de la presencia de mecA en presencia de *S. aureus*.

2 Estos microorganismos pueden estar presentes en la flora comensal del paciente de forma habitual; de manera que un resultado positivo del kit debe valorarse teniendo en cuenta la anterior circunstancia.

3 El resultado de *Bordetella spp.* aparecerá cuando el software no sea capaz de distinguir entre las especies de *Bordetella* anteriormente mencionadas.

La detección está basada en nuestra tecnología CLART[®]: Una amplificación por PCR de un fragmento de cada bacteria de entre 150-550 pb, seguida de visualización en microarray de baja densidad.

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.

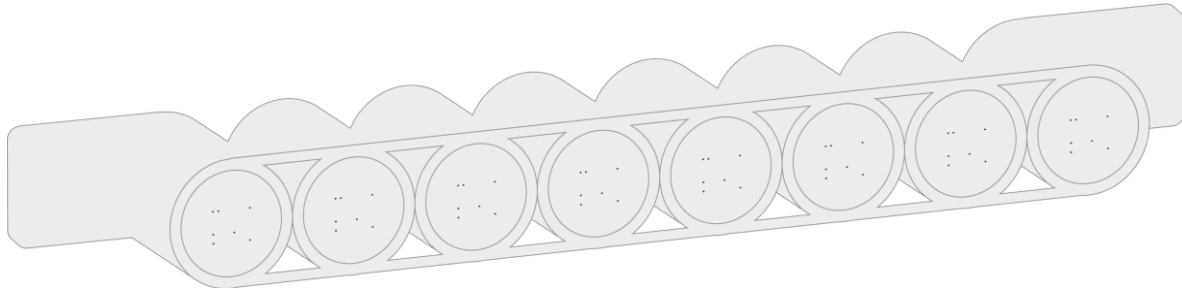


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

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, inmobilizadas 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).

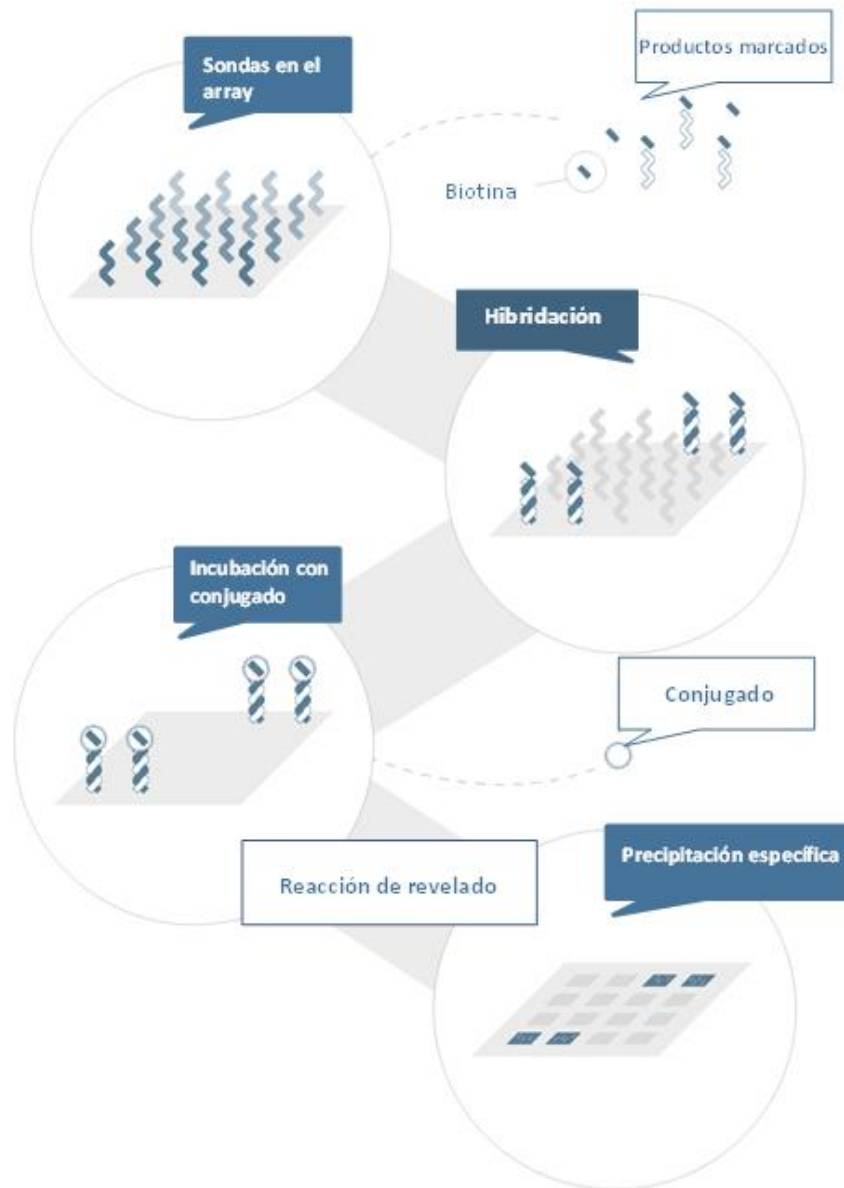


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una 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 **Pneumo CLART bacteria**[®] 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 amplificación

Envío y almacenaje a -20°C.

- PK (Proteinasa K 10X). Conservar a 4°C una vez descongelada. No usar si ha transcurrido más de un mes tras su descongelación.
- Tubos de amplificación. Los tubos de amplificación se envían listos para su uso. Cada tubo de amplificación contiene 45 µL de mezcla de reacción. Sólo se debe descongelar el número exacto de tubos que se vaya a emplear. Los tubos restantes deben mantenerse a -20°C.

Nota: Las cajas de tubos 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.

3.2. 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 todas las bacterias 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.**

3.3 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.

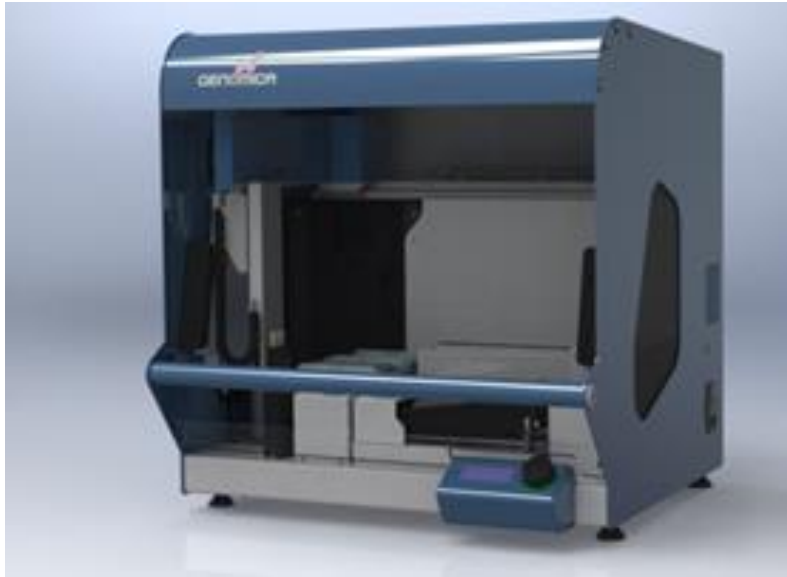


Figura 4. autoclart®

- **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.

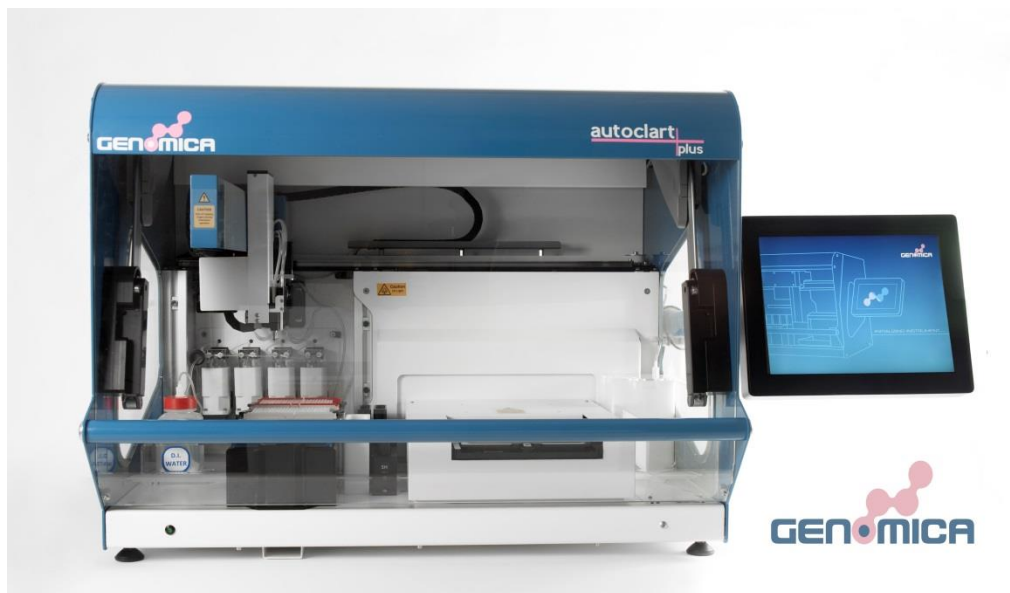


Figura 5. autoclart® plus

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 0.2 mL.
- Suero salino (0.9% NaCl).

4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Termociclador.
- Cabina de seguridad biológica.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 μL , 20-200 μL y 200-1000 μL 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 56°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío.

5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Léase detenidamente para evitar contaminaciones.

1. La técnica *Pneumo CLART bacteria*[®] 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 ADN 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.

6. MUESTRAS

El kit ***Pneumo CLART bacteria***[®] ha sido diseñado y validado para el análisis de material genético extraído a partir de los siguientes tipos de muestras respiratorias: esputos, lavados/exudados/aspirados nasofaríngeos, lavado broncoalveolar (BAL), broncoaspirados (BAS).

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

Conservar las muestras a 4°C siempre que se vayan a procesar en un tiempo inferior a 12h. En caso contrario se deben almacenar congeladas a -20 °C.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

El kit ***Pneumo CLART bacteria***[®] ha sido validado empleando el protocolo que se muestra más abajo, el cual constituye el Protocolo de Trabajo.

7.1. Extracción automática de ADN, en NucliSENS BioMérieux easyMag.

Como método de extracción se ha empleado el sistema de Extracción automática NucliSENS BioMérieux easyMag.

Si se utilizara un sistema de extracción distinto, podrían producirse pequeñas diferencias en el resultado. En cualquier caso, se debería partir de un mismo volumen de muestra, y emplear un volumen de elución en el rango de 20-30 µl.

GENOMICA ha validado únicamente la extracción automática descrita más abajo, por lo que pueden obtenerse pequeñas diferencias en el resultado si se emplean otros métodos distintos.

7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción y la adición del material extraído al tubo de amplificación.

- La mayoría de las bacterias que detecta el kit ***Pneumo CLART bacteria***[®] se encuentran presentes en la superficie de la piel. Con el fin de evitar contaminaciones por dichos microorganismos, se deben aplicar las siguientes recomendaciones: Desinfectar la piel de las manos y antebrazos con gel desinfectante o etanol al 70%; Cubrir la superficie desinfectada con guantes de puño largo; Los guantes deben colocarse sin tocar con los dedos más que el borde de los mismos; Evitar tocar la piel o el pelo mientras se están manipulando las muestras. En caso de hacerlo, cambiar de guantes.
- Limpiar las superficies de trabajo de la cabina de extracciones con lejía diluida al 10%.
- Encender el flujo laminar 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.

7.1.2. Protocolo de extracción automática de ADN en equipo NucliSENS BioMérieux easyMag

- Por cada serie de muestras a analizar, incluir un control negativo de extracción (suero salino 0.9%) para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación y visualización; lo que daría lugar a un falso positivo.

- Para muestras líquidas transferir 200µl de muestra a un tubo de 1,5ml. Para muestras más densas añadir 1ml de suero salino, dar un vórtex y transferir 200µl de muestra a un tubo de 1,5ml.
- Añadir 50µl de PK.
- Incubar 30 min. a 56°C con agitación o en su defecto dando un vórtex cada 10 min.
- Transferir 250µl de muestra al extractor. Realizar en el equipo NucliSENS BioMérieux easyMag una lisis interna y extracción, siguiendo la guía de usuario del equipo para el protocolo “Generic”. Identificar en el programa un volumen de elución de 25 µl.

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.
- Añadir el ADN siempre en cabina. Durante el proceso mantener los tubos separados y en hielo.
- Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando el bloque haya sobrepasado la temperatura de 90°C, mientras tanto mantener en hielo. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación.

7.2.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar en hielo el número necesario de tubos según el número de muestras a procesar. No emplear 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 5 µl de ADN extraído a cada uno de los tubos de amplificación. Resuspender varias veces con la pipeta. Mantener los tubos a 4°C.
4. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	95°C 15 min
45 ciclos	95°C 30 seg 59°C 60 seg 72°C 60 seg
1 ciclo	72°C 10 min
4°C continuo hasta retirada del tubo	

5. Iniciar el programa y colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando la temperatura del bloque haya superado los 90°C.

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 56°C durante al menos 1 hora.
3. SH cristaliza a temperatura ambiente, por lo que antes de su uso ha de calentarse a 56°C hasta la desaparición de los cristales
4. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.
5. Durante la preparación de las muestras para la visualización, han de usarse puntas con filtro diferentes para cada pocillo y cambiarse cada vez que se añada un reactivo.
6. En caso de emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, descontaminar con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
7. 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.

8. 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.
9. No dejar secar el pocillo totalmente.
10. Evitar generar espuma al añadir reactivos.
11. 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.
2. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.
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. 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

56°C, 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.

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 56°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 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: Se ha de preparar la Solución CJ diluida 15 minutos antes del fin de la hibridación, y mantener en hielo. Para ello, 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 cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación 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: **“Pneumo CLART bacteria”**
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.

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 **7,5 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. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95°C durante 8 minutos. Sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo. Importante: Desnaturalizar los productos de PCR antes de preparar los reactivos de visualización en el autoclart®
15. **SH.** Añadir el volumen de SH (atemperada a 56°C durante al menos 60 minutos) que aparece en la pantalla.

ADVERTENCIA: Es imprescindible añadir la SH en este punto, si se añade antes puede suceder que disminuya demasiado la temperatura de la solución de hibridación con la consecuente bajada de intensidad de las sondas pudiendo dar lugar a la aparición de falsos negativos.

16. 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 cuándo el usuario abra la puerta del equipo.
17. Para añadir las muestras, sacar los **CSs** del autoclart® y añadir **5 µl** de producto amplificado desnaturalizado 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.
18. 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®. Leer de manera inmediata.

19. 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 tres formas, dependiendo de las necesidades del cliente. Para más información ver más abajo y también el Manual de usuario del autoclart® plus.

A) Con adición automática de la muestra. Exclusivo para placas.

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 “**Pneumo CLART bacteria**” 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 automática 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 10 µl y de 1000 µl para dispensar los reactivos.

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 la placa en el termociclador cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar los tubos durante **10 minutos**. Sacar la placa de la incubación a 95°C y colocarla 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 **7.5µl** 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. Colocar la placa de amplificación en el autoclart® plus.
14. Cerrar la puerta y pulsar “inicio” para comenzar.
15. Cuando ha terminado el proceso de visualización y lectura el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

B) 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 “**Pneumo CLART bacteria**” 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/ placa en el termociclador, e incubar a 95°C durante 10 minutos. Sacar los tubos/ placa 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 **7.5µl** 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 cuándo 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 **7.5 µl** de producto amplificado desnaturalizado 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.

C) 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 “**Pneumo CLART bacteria**” 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 dos columnas: La columna de la izquierda mostrará las especies que se detectan con el kit.; La de la derecha, los resultados analíticos.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debida a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del microorganismos (hemoglobina, sales, etc.). Con el kit **Pneumo CLART bacteria**® se han eliminado estos falsos negativos añadiendo dos controles internos en cada tubo de reacción:

- Un control interno de ADN genómico, indicativo de la eficiencia de la reacción de amplificación.
- Un control de extracción para detectar falsos negativos debido a fallos en la extracción.

En toda tanda de análisis que se procese se debe incluir un control negativo de extracción, para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación o visualización, lo que daría lugar a un falso positivo.

Cada tubo de reacción contiene los siguientes oligos:

- Un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de la β -globina humana. Éste es el control de extracción de ADN genómico o control del ADN del paciente.
- Un par de oligonucleótidos que amplifican un plásmido modificado incluido en el tubo de amplificación y que se usa como control de amplificación de la reacción de PCR.
- Oligonucleótidos específicos de las dianas indicadas para los patógenos a detectar.

Los tubos de amplificación se han diseñado para favorecer la amplificación de las dianas indicadas para los patógenos a detectar frente a la de los controles. Además, la amplificación del control de extracción está favorecida frente al control de la reacción de amplificación.

Los distintos resultados que se pueden obtener con el Kit son **Positivo, Negativo y No concluyente**.

En la Tabla 1, a continuación, se recogen las posibles interpretaciones de un resultado No concluyente, así como las soluciones correspondientes:

Resultado	Explicación	Solución: Repetir...
NO- CONCLUYENTE	Con control de No ADN. Se produce un fallo durante la extracción.	<ul style="list-style-type: none"> • ...desde la extracción.
	Con control de PCR Inhibida. Se produce un fallo en la amplificación y/o la extracción.	<ul style="list-style-type: none"> • ...desde la extracción.
	Con control Conforme. 2 casos: <ul style="list-style-type: none"> • Réplicas de una sonda muy distintas entre sí. • La intensidad de la señal de absorbancia no normalizada se encuentra en el límite de detección de la técnica, cuyo rango está establecido por el software para cada tipo de microorganismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • ...desde la visualización.

Tabla 1.

9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

9.1. Control de interferencias conocidas

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos a una calidad inadecuada del material genético extraído (por insuficiente cantidad de muestra, degradación del ADN, almacenaje incorrecto o pérdida de material genético durante la extracción), o a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras a procesar (alcohol, sales, etc.). Con el kit **Pneumo CLART bacteria®** se han eliminado falsos negativos añadiendo a los tubos controles internos de amplificación, que son indicativos de la eficiencia de la reacción de amplificación.

Para evitar estas interferencias, además, deben seguirse las indicaciones que aparecen en las secciones 5, 6 y 7 de este Manual.

9.2. Especificaciones técnicas

9.2.1. Parámetros analíticos

Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se determina mediante amplificación de diluciones seriadas de ADN de plásmidos recombinantes para cada uno de los microorganismos detectados en el kit. Cada uno de los plásmidos lleva como inserto uno de los fragmentos de amplificación correspondiente a uno de los microorganismos detectados por el kit. El fragmento de amplificación incluye la secuencia complementaria a la sonda de detección correspondiente. La visualización se realizó en CSs. Los resultados se muestran en la Tabla 2:

CLON	Copias/ 5 µL
<i>Moraxella catharralis</i>	10 ²
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10 ²
<i>Haemophilus influenzae</i>	10 ²
mec A	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ²
<i>Bordetella pertussis</i>	10 ²
<i>Bordetella parapertussis</i>	10 ²
<i>Bordetella holmesii</i>	10 ²
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10 ²

Tabla 2. 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 todos los plásmidos recombinantes, observándose que no se produce detección inespecífica de otros microorganismos diferentes al que se quiere determinar. Por tanto, se considera que la técnica alcanza una especificidad analítica del 100%.

9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Sensibilidad diagnóstica.

Para determinar los parámetros diagnósticos del kit, se realizó una evaluación comparativa de la técnica ***Pneumo CLART bacteria***[®] con las técnicas de referencia cultivo y PCR. Para esta evaluación se colaboró con los centros siguientes:

- Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, España.
- Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España.

A partir de 267 muestras respiratorias, se extrajo el material genético y se analizó la presencia de cada una de las bacterias que se detectan con el kit.

Para cada muestra se asume como verdadero el resultado concordante entre la técnica de referencia y ***Pneumo CLART bacteria***[®]. En el caso de existir discordancias entre ambas técnicas, se resolvieron de la siguiente manera:

- Resultado positivo por la técnica de referencia y negativo por ***Pneumo CLART bacteria***[®]: Se consideró correcto el dato de la técnica de referencia y, por lo tanto, falso negativo de ***Pneumo CLART bacteria***[®].
- Resultado negativo por la de referencia y positivo por ***Pneumo CLART bacteria***[®]: se analizó la discrepancia mediante Nested-PCR específica y secuenciación. El resultado obtenido es el que se consideró como verdadero.

Resultados obtenidos:

(N= 267) ¹	Gold standard	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	63	89,7±2,4	99,75±0,25	99,1±0,9	96,9±0,7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	89	89,3±1,7	98,6±0,3	96,9±0,6	94,9±0,8
<i>Haemophilus sp./H. influenzae</i>	187	96,8±0,5	100	100	93,1±1,1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	77	98,7±1,3	100	100	99,5±0,5
<i>Bordetella pertussis</i>	10	100	100	100	100
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	100	100	100	100

¹175 Espudos, 12 Aspirados nasofaríngeos, 6 BAL (Lavado bronquial), 69 BAS (Aspirado bronquial), 4 Exudados nasofaríngeos, 1 Secreción respiratoria.

Tabla 3. Parámetros diagnósticos de sensibilidad y especificidad para el kit *Pneumo CLART bacteria*®.

NOTA: Debido a la baja prevalencia de los microorganismos *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella holmesii* y *Bordetella bronchiseptica*, no se ha contado con muestras positivas para ellos. Por lo tanto, no se ha podido identificar la sensibilidad diagnóstica del kit para estos patógenos. En todos los casos se ha evaluado la sensibilidad analítica mediante plásmidos recombinantes y ADN de cepas de colección (colección DSMZ).

Especificidad diagnóstica.

La técnica se ha validado con muestras tanto negativas como positivas para otros microorganismos no contemplados en el kit, y los resultados demuestran que no hay reacción cruzada con los mismos.

Repetibilidad y reproducibilidad diagnóstica por tipo de muestra.

La reproducibilidad y repetibilidad diagnóstica se han establecido con muestras procesadas desde el paso de extracción de la muestra, hasta el de visualización en CS.

Los valores obtenidos son los siguientes:

	% homología
Repetibilidad (n=58)	93.7
Reproducibilidad (n=53)	88.7

10. REFERENCIAS

Verdasca, N., A. Coelho, F. Ribeira, A. Pista.: "Detection of VPH ADN from cervical samples in a group of portuguese women: comparison of two VPH genotyping assays". 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.

Mejlhede N., Bonde J., Fomsgaard A.: "High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women". APMIS 117:108-114, September 2008.

Fagan, E.J., Moore C., Jenkins C., Rossouw A., Cubie H.A, James V.: "External quality assessment for molecular detection of human papillomaviruses". Journal of Clinical Virology 48: 251-254, May 2010.

Pista, A., Freire de Oliveira C., Lopes C., and Cunha M. J., on behalf of the CLEOPATRE Portugal Study Group: "Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal - The CLEOPATRE Portugal Study". Int J Gynecol Cancer 2011;21: 1150Y1158

Kaspersen MD., Larsen PB., Ingerslev HJ., Fedder J., Petersen GB., Bonde J., Höllsberg P.: "Identification of Multiple HPV Types on Spermatozoa from Human Sperm Donors". PLOS ONE, Vol. 6, Issue 3, March 2011.

Casalnego JS., Benchaib M., Le Bail Carval K., Piaton E., Mathevet P., Mekki Y. : "Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities". International Journal of Gynecology and Obstetrics. Vol 114 Issue 2: 116-119. August 2011.

Rebolj M., Lynge E., Bonde J.: "Human papillomavirus testing and genotyping in cervical screening". Expert Review Anticancer Ther. 11(7), 1023-1031 (2011).

Chranioti A., Spathis A., Aga E., Merustoudis C. Pappas A., Panayiotides I. and Karakitsos P. "Comparison of two commercially available methods for HPV Genotyping: CLART HPV2 and Linear Arrays HPV Genotyping Test". Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. Volume 34, number 5, October 2012.

Garbugliaa A. R., Piselli P., Lapaa D., Sias C., Del Nonnoc F., Baiocchinic A., Cimagliab C., Agrestab A. and Capobianchia M. R. "Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy". Journal of Clinical Virology. JCV-2429 (2012).

Goldman B., Rebolj M., Rygaard C., Preisler S., Ejegod DM, Lyngea E., and Jesper Bonde. "Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark". Vaccine 2013 Mar 15;31 (12): 1604-9.

Pista, A., Freire de Oliveira C., Lopes C., and Cunha M. J., on behalf of the CLEOPATRE Portugal Study Group. "Human Papillomavirus Type Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Cervical Cancer in Portugal A CLEOPATRE II Study". International Journal of Gynecological Cancer & Volume 23, Number 3, March 2013

Bonde J., Rebolj M., Ejegod DM., Preisler S., Lynge E., Rygaard C.: "HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART® HPV2 Human Papillomavirus genotype microarray system". BMC Infectious Diseases 2014, 14:413.

Smelov V., Elfström KM., Johansson A LV., Ecklund C., Naucner P., Arnheim-Dahlström L., Dillner J.: "Long-term HPV type-specific risks of high-grade cervical intraepithelial lesions: A 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial". Int. J. Cancer: 136, 1171–1180 (2015).

Ejegod DM., Rebolj M., Bonde J.: "Comparison of analytical and clinical performance of CLART HPV2 genotyping assay to Linear Array and Hybrid Capture 2: a split-sample study". DOI 10.1186/s12885-015-1223-z.