



Pruebas Multiplex LightMix® Modular Gastro Bacteria

1. Uso previsto

Los productos enumerados en la sección 3 están destinados a ser utilizados para la detección de patógenos que causan diarrea (ensayos cualitativos). Pueden ser utilizados para la detección del genoma patógeno por detección simple o multiplex a partir de extractos de ácidos nucleicos obtenidos de muestras de heces acuosas. Los resultados de las pruebas moleculares no deben ser la única base para cualquier decisión terapéutica.

2. Introducción

La diarrea infecciosa puede ser causada por virus, y menos frecuentemente por bacterias o parásitos. Estas instrucciones describen el uso de los kits modulares LightMix® para la detección del genoma de patógenos mediante PCR *multiplex*, utilizando el instrumento LightCycler® 480 II de Roche. Para obtener información de patógenos y resultados de estudios, referirse a la documentación que se incluye con el producto respectivo.

Información general del kit modular LightMix® (ModularDx). Hasta seis canales se pueden utilizar para conseguir el máximo rendimiento, lo que permite la detección de cinco o más agentes patógenos en una sola reacción. El canal 660 (Cy5) está reservado para el Control de Reacción. El panel de prueba puede ser personalizado para las necesidades de pruebas de cada laboratorio; se pueden ejecutar ensayos individuales o los paneles pueden ser contruidos mediante la combinación, omisión o sustitución de los ensayos individuales. Además de la selección del *target*, el laboratorio puede optar por incluir un control interno, como un control de extracción o el Roche Process Control (RPC/DPC) para supervisar todo el proceso desde la extracción hasta la amplificación.

3. Componentes de los kits modulares LightMix® e información para pedidos

				canal
50-0601-96	07979690001	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CE-IVD	500
53-0602-96	07979703001	<i>Campylobacter</i>	CE-IVD	530
58-0603-96	07979827001	<i>Shigella / EIEC</i>	CE-IVD	580
61-0604-96	07979789001	<i>Salmonella</i>	CE-IVD	610
64-0600-96	07979690001	<i>Aeromonas</i>	CE-IVD	640
64-0605-96	07041870001	<i>Plesiomonas</i>		
66-0901-96	07093802001	PhHV	Control de extracción	660
90-0600-01		Control Positivo Gastro		

4. Combinaciones de PCR Multiplex (ejemplos)

Gastro Bacteria Multiplex PCR

La compensación de color 40-0320 es obligatoria para PCR Multiplex

500	530	580	610	640	660
	Campylo				PhHV
	Campylo		Salmo.		PhHV
Yersinia	Campylo	Shigella	Salmo.		PhHV
Yersinia	Campylo	Shigella	Salmo.	Plesiom.	PhHV
Yersinia	Campylo	Shigella	Salmo.	Aeromon.	PhHV

480 II	z 480			
X	X	Duplex		
X	X	Triplex		
X		5plex		
X		6plex		
X		6plex		

5. Almacenamiento del Kit modular LightMix®

Los kits son transportados a temperatura ambiente (no en hielo). Los productos han sido evaluados para que sean estables aún después de tres días almacenados a 60°C (estudio de estabilidad de transporte en clima tropical).

A la llegada almacenar los kits completos a temperatura ambiente o refrigerados (4- 25°C) y protegidos de la luz del día. NO congelar los reactivos liofilizados.

Una vez disueltos controles positivos deben ser almacenados en el congelador.

Una vez disueltos los reactivos se pueden almacenar refrigerados hasta 30 días (para uso diario), para almacenamientos de más tiempo, congelar a -20°C hasta la fecha de caducidad. Evitar ciclos de congelado-descongelado (< 10 ciclos).

Para minimizar el potencial error asociado al uso de tubos marcados por sí mismo, se recomienda no alicuotar reactivos para almacenar en segundos viales.

6. Reactivos adicionales necesarios e información del instrumento

LightCycler® Multiplex DNA Master		Cat.-No. 07 339 585 001
LightCycler® Multiplex RNA Virus Master	(opcional)	Cat.-No. 06 754 155 001
RNA Process Control Kit	(opcional)	Cat.-No. 07 099 592 001
Uracil-DNA Glycosylase (UNG)	(opcional)	Cat.-No. 03 539 806 001
LightCycler® 480 II Instrument		Cat.-No. 05 015 278 001
cobas z 480 Analyzer, UDF software 1.5		Cat.-No. 05 200 881 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white o		Cat.-No. 04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 white		Cat.-No. 04 729 749 001
Color Compensation Kit Hexaplex 40-0320-00		Cat.-No. 06 296 971 001
Albúmina de suero bovino (BSA)	(opcional)	Sigma B4287

7. Precauciones y advertencias

Requerimientos de manipulación

El producto es una herramienta de diagnóstico *in vitro* y por lo tanto debe ser utilizado únicamente por personal cualificado.

Antes de utilizar este producto, lea las instrucciones del operador y de seguridad en el manual del operador del instrumento.

Son necesarias precauciones generales para el manejo de materiales genéricos de laboratorio .

El flujo de trabajo del laboratorio ha de ajustarse a las prácticas estándar. Debido al riesgo de contaminación, la preparación de la PCR y la amplificación de la PCR deben realizarse en zonas separadas físicamente.

No mezclar reactivos de lotes diferentes. No combinar otros ensayos fuera de los descritos en este manual.

No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Utilice la versión del manual suministrada con el kit (etiqueta del kit).

Procedimientos de laboratorio

Todos los materiales de origen humano y los residuos relacionados deben considerarse potencialmente infecciosos. Limpiar bien y tratar todas las superficies de trabajo con desinfectantes autorizados por las autoridades locales.

No comer, beber o fumar en el área de trabajo de laboratorio. No pipetear con la boca.

Usar guantes protectores desechables, batas de laboratorio y protección ocular adecuada durante la manipulación de las muestras y los componentes del kit. Lavarse bien las manos después de manipular las muestras y reactivos . Evitar la contaminación de los reactivos, microbiana o por nucleasas. El uso de puntas estériles desechables es esencial.

Manejo de desechos

Deseche los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con la legislación vigente.

Lectura de resultados e informes

La lectura de resultados incluye el uso general de un software que no ha sido específicamente adaptado para el análisis de estos reactivos. Los resultados "positivo" y "negativo" del software deben ser verificados por el operador para evitar informar resultados falsos.

Los resultados de las pruebas moleculares basados en el genoma indican la presencia de un patógeno. Los resultados de los análisis moleculares no deben ser la única base para una decisión terapéutica. La metodología de PCR es extremadamente sensible y puede reportar más resultados positivos que los métodos clásicos; Los valores de C_p pueden ser de ayuda para clasificar la importancia del patógeno reportado, en particular cuando se detectan infecciones dobles. Los casos de contaminaciones pueden dar lugar a resultados falsos positivos.

8. Antecedentes

8.1. Antecedentes médicos

Las deposiciones diarreas son sueltas y acuosas. La diarrea es muy común, mucha gente experimenta las deposiciones diarreas algunas veces por año; las personas con síndrome de colon irritable, pueden tener episodios de diarrea más frecuentemente.

La diarrea es comúnmente causada por virus, pero menos frecuentemente puede estar asociada a una infección bacteriana (intoxicación alimentaria) o infección parasitaria. Actualmente no hay disponibles terapias antivirales, aunque las infecciones bacterianas y parasitarias pueden ser tratadas; el diagnóstico de la causa de la diarrea puede ayudar al personal sanitario a escoger la terapia adecuada.

La diarrea generalmente no es algo serio, pero los ancianos o niños pequeños pueden sufrir a causa de la deshidratación. Síntomas serios son: presencia de sangre, moco o alimentos sin digerir en las heces, pérdida de peso y fiebre.

La diarrea también puede ser causada por la mala absorción de algunos nutrientes, intolerancia a la lactosa o alergias a ciertos alimentos, diabetes, medicación o terapia con radiación, abuso de alcohol y drogas, o enfermedades del intestino (colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn).

8.2. Metodología y Principios del Ensayo

Durante la etapa de extracción, todas las células y virus contenidos en la muestras son lisados. Los ácidos nucleicos genómicos (ARN y ADN) son extraídos y purificados para la detección utilizando Real-time PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los reactivos de los kits LightCycler® incorporan *dUTP* en los productos de PCR. La Uracil ADN glicosilasa se puede incorporar para evitar arrastrar contaminaciones.

Cada kit contiene un par de *primers* diseñados para amplificar específicamente un fragmento corto del respectivo genoma patógeno; este fragmento de PCR es detectado con una sonda de hidrólisis marcada en ambos extremos, la cual, es degradada por la polimerasa, emitiendo *una* señal luminosa la cual es detectada por el instrumento PCR. El número de ciclo (Cp) es proporcional a la cantidad de material inicial, permitiendo una estimación de la cantidad de patógeno presente en la muestra a calcular.

La sonda de hidrólisis contiene una de las seis posibles etiquetas coloreadas (véase sección 3), lo que permite la detección de hasta seis reacciones *target* diferentes simultáneamente. Una reacción de control en el canal 660 se debe añadir a cada reacción multiplex, para monitorear la lisis (solamente control de proceso de Roche), extracción y amplificación.

9. Especificación y evaluación de datos

La sensibilidad analítica de los kits ModularDx se ha determinado para una reacción y/o Multiplex PCR. Cada lote de reactivos se ha verificado para detectar al menos 10 copias del ácido nucleico *target* por cada 20 µl de reacción en una sola PCR. Los niveles de la señal (normalizados a un instrumento de referencia), los valores de Cp relacionados con la cantidad de *target* y valores cut-off, se imprimen en el Certificado de Análisis - (CoA), incluido en cada kit.

Los datos de la evaluación y los resultados de los estudios clínicos están contenidos en el documento de información técnica que se incluye con el producto. Resumen de los resultados de la evaluación:

Canal	500	530	580	610	640
Patógeno	Yersinia	Campylobac	Shigella	Salmonella	Aeromonas
LOD ^{simple} (copias/rx)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOD ^{multiplex} (copias/rx)	6.1	2	6.9	6.3	1.1
95% CI	4.1 - 27	1.5 - 4	4.4 - 77.1	5.6 - 7.1	0.92 - 1.3
Especificidad	aprobado ¹	aprobado ²	aprobado	aprobado	aprobado
Sensibilidad Diag.	75%	100%	100%	100%	100%
Especificidad Diag.	100%	98%	99.7%	99.7%	74.5%
Prevalencia	0.3%	1.6%	0.3%	1.1%	7.3%
PPV	100%	77%	93.1%	92.6%	23.5%
NPV	99.9%	100%	100%	100%	100%
Variación Intra Ensayo	0.21%	0.14%	0.23%	0.42%	0.61%
Variación Inter Ensayo	0.48%	0.79%	0.86%	1.48%	1.12%
Variación Inter Lote	0.42%	0.57%	0.96%	0.39%	0.87%

n.d. = no determinado Los valores de LOD para reacciones de 10 µl con 5 µl de muestra en una placa de 384 pocillos estaban en el mismo rango.


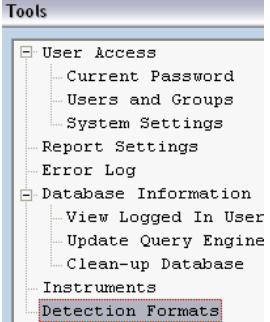
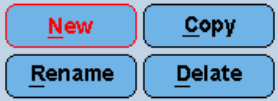
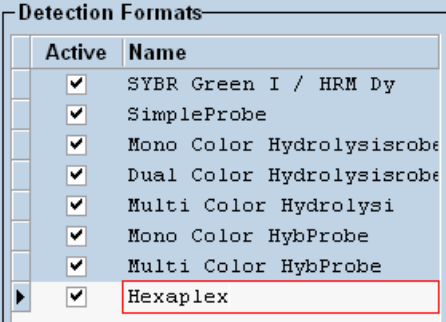
¹ No-enterocolítica (*Y. pseudotuberculosis*, *pestis*, *mollaretii*, *intermedia*) negativo, pero *Y. kristensenii* positivo.

² Detectada *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*, y *C. upsaliensis* pero no especies oral/comensal como *C. fetus*, *C. mucoalis*, *C. spurotorum*, o *C. ureolytica*. *Helicobacter pylori* (*C. pylori*) y *H. pullorium* no son detectadas.

10. Instrucciones de uso

Ver el manual del operador para más detalles. Empezar la programación antes de preparar las soluciones.

10.1. Canales coloreados y compensación de color

1) Abrir herramientas	2) Seleccionar los formatos de detección	3) New	4) Nombre del set Hexaplex
			

Definir filtros de emisión y excitación de los canales 500 , 530 , 580 , 610 , 640 y 660 ; (Canal 500 no está disponible para cobas z 480). Configurar todos los parámetros como se describe a continuación; consulta las instrucciones detalladas en el manual : **LightMix 40-0320 Color Universal de Compensación Hexaplex**

Nombre	500	530	580	610	640	660
LightCycler® 480	450-500	483-533	523-568	523-610	523-640	615-670
LightCycler® 480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
cobas z 480	n.a.	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Quant Factor *	10	10	10	10	10	10
Max Integration Time*	1 sec	1 sec	1 sec	2 sec	3 sec	3 sec

*Se permite la adaptación de los parámetros del instrumento (bajo la responsabilidad del operador)

10.2. Programación instrumentos Roche 480

Para usar con los instrumentos Roche 480, software 1.5 y superiores. Ver el manual del operador para más detalles. Empezar la programación antes de preparar las soluciones

El protocolo consiste en tres pasos::

- 1: Desnaturalización de la muestra y activación de la enzima
- 2: Ciclo: PCR de amplificación
- 3: Enfriamiento del instrumento

Program Step:	UNG ¹	RT Step ²	Denaturation	Cycling			Cooling
Parameter							
Analysis Mode	None	None	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	1	45			1
Target [°C]	40	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	None	Single	None	None

¹opcional si se combina con UNG ²opcional si se combina con 1-Step RT-PCR.
UNG y LC Multiplex RNA Virus Master son mutuamente excluyentes en el mismo pocillo.

10.3. Protocolo Experimental

- **Material de muestra:** Utilice preparaciones de ácidos nucleicos (ej. 'High Pure PCR Template Preparation Kit').
- **Controles positivos:** Cada kit ModularDx se entrega con un único target de control positivo. Estos controles deben ser utilizados sólo en las reacciones individuales. Las mezclas de los controles no se han probado.
- **Controles premezclados:** Alternativamente, usar el Positive Control pre-mezclado 90-0600 que contiene 2, viales. Mix I cubre los canales 500, 580 y 640 y Mix II los canales 530, 610 y opcionalmente el 660.
- **Controles negativos:** Utilice una muestra extraída negativa que contiene el *target* de reacción de control. Si se utiliza agua, añadir proteínas (BSA) antes de la extracción .

10.3.1. Preparación de reactivo de parámetro específico (PSR)

Agregar 50 µl de agua grado PCR a cada vial de reactivo, mezclar la solución (*vortex*) y centrifugar. Para pipeteado robótico el volumen puede ser aumentado hasta 55 µl (las señales disminuirán 10-20%).

► Usar 0.5 µl de reactivo por cada 20 µl de reacción.

10.3.2. Preparación del control positivo

Usar los controles premezclados mezcla I y mezcla II o controles positivos individuales. Un vial contiene reactivos para 32 reacciones.

Agregar 160 µl de agua grado PCR a el vial con la tapa **negra**. Mezclar pipeteando la solución arriba y abajo unas 10 veces: el mezclado con vortex puede generar aerosoles causando contaminación.

► Usar 5 µl de control positivo para una reacción de 20 µl.

10.3.3. Preparación de la mezcla de reacción

El esquema de pipeteo para una sola reacción está disponible en cada kit. La siguiente tabla permite configurar el pipeteo desde ensayos dúplex a Hexaplex de 20 µl. Elija entre PhHV (**azul**) y RPC (**púrpura**). Incluir en cada ensayo un control positivo (para cada target), y al menos un 'No Template Control' (NTC). En un tubo refrigerado, preparar la mezcla de reacción multiplicando los volúmenes de reacción individuales (columna izquierda) por el número de reacciones, incluyendo los controles más una reacción adicional; el volumen de pipeteo mínimo recomendado es de 1 µl; preparar un mínimo de 10 reacciones. Las instrucciones para placas de 96 pocillos se observan en la columna derecha :

Una reacción	Reacción Hexaplex Multiplex Master de Roche	100 reacciones
6.7 µl	Agua, grado-PCR (tapa transparente, proporcionada con el kit Master Roche)	670 µl
0.5 µl	Mezcla de control de reacción PhHV o Agua	50 µl
1.0 µl	Agua o Ensayo de detección RPC (vial 5 Roche)	100 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos (primers / sondas) primer ensayo target	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos segundo ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos tercer ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos cuarto ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos quinto ensayo target o Agua	50 µl
4.0 µl	Roche Master (ver manual Roche)	400 µl
0.2 µl	Agua o UNG (si se combina con ADN)	20 µl
0.1 µl	Agua o Enzima RT (si se combina con ARN)	10 µl
15.0 µl	Volumen de la mezcla de reacción	1500 µl

Una reacción	Reacción Duplex Multiplex DNA Master (example)	100 reacciones
10.0 µl	Agua, grado-PCR (tapa transparente, proporcionada con el kit Master Roche)	1000 µl
0.5 µl	Mezcla de control de reacción PhHV	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos (primers / sondas) primer ensayo target	50 µl
4.0 µl	Roche Master (ver manual Roche)	400 µl
15.0 µl	Volumen de la mezcla de reacción	1500 µl

Mezclar suavemente, centrifugar y **transferir 15 µl** de mezcla master por cada pocillo. Se recomienda llevar a cabo las reacciones de PCR en placa refrigerada.

Agregar 5 µl de muestra o control de ADN a cada pocillo. Sellar la placa y centrifugar. **Start run**

No tocar el filme de cubierta sin guantes . Evitar tiempos de espera prolongados antes de iniciar el instrumento.

11. Lectura de resultados

Realizar el análisis de datos como se describe en el manual del operador. Usar el método “*Second Derivative Maximum*” (Automated (F” max)). El número de ciclo del *Crossing Point* (Cp) de cada muestra se calcula de forma automática. El software del instrumento también informa tentativamente de resultados como positivos (una curva roja en el gráfico de amplificación del software), negativo (verde), o incierto (azul). Repetir el análisis para cada canal de color utilizado: (1) Abrir un nuevo análisis, (2) Poner nombre al análisis después del canal y del patógeno, (3) Aplicar el archivo de compensación de color, (4) Analizar y guardar.

Los ensayos son válidos si los resultados generados para todos los controles son correctos: Los controles positivos son positivos (dentro del rango del Cp), Controles negativos son negativos, y las reacciones de control (en su caso) son positivas.

11.1. Reacción de control – Validación del ensayo

Iniciar el análisis desde el canal 660. Comprobar que las curvas de amplificación sean visibles.

Si las señales de la reacción de control no se observan, el ensayo no es válido y los resultados de los patógenos no se deben utilizar.

- Si se están usando los controles positivos premezclados y la PhHV, se debe observar una curva de amplificación para la mezcla II.
- Si se están usando los controles positivos de un único patógeno y la PhHV, comprobar el control negativo extraído para la presencia de una curva de amplificación PhHV con un valor de Cp en el rango de 27-33.
- Si se está usando el Control de Procesos Roche, comprobar que el control negativo extraído que contiene el control de Roche muestra una curva de amplificación con un rango de Cp como se indica en el manual de Roche.

Nota: En caso de que el control negativo utilizado no contenga el *target* de control (no recomendado), la presencia de señales de reacción de control en las muestras se pueden usar para verificar la funcionalidad del control.

11.2. Resultados de los patógenos

11.2.1. Verificación de los resultados específicos de cada canal

Realizar análisis y revisar para cada canal utilizado, compruebe que el resultado de cada canal es válido:

- *Target* específico **Control Positivo debe ser positivo** y dentro del rango del Cp registrado en la CoA.
- *Target* específico **Control negativo debe ser negativo**.
- *Target* específico controles positivos para otros canales en uso deben ser negativos, lo que indica que la compensación de color está encendida y es funcional.

11.2.2. Muestras *target* positivas y *target* negativas

Identificar las muestras como *target*-positivo, negativo (por debajo del límite de detección) o equívocos:

- Seleccionar los resultados "**positivos**".
- Identificar todas las **muestras** con un valor de Cp dentro del límite definido.
- Identificar las muestras traídas erróneas de falso-positivo mediante inspección visual y corregir; las traídas de falsos-positivos pueden ser generados como resultado de la interpretación errónea de las curvas debido a la línea de base o señales residuales de otro canal, que no haya sido corregido por la compensación de color (comprobar otros canales).
- Documentar todas las muestras "**positivas**" e identificar las muestras con resultados corregidos manualmente.
- Para muestras positivas altas (Cp <24) para un *target* y para las muestras positivas con un resultado negativo de reacción de control, repitiendo la prueba con todos los otros ensayos con único *target*; se recomienda evitar perder resultados positivos bajos en muestras de infección mixta.
- ...Listar todas las muestras con un valor de Cp más alto que el punto de corte como "**dudoso**".
- El punto de corte en el CoA se fija en función del límite de detección establecido (LOD) de cada ensayo. El límite de detección (LOD) describe la cantidad de *target* que se detecta de forma fiable en cada ensayo. Los resultados con un ciclo posterior son más propensos a ser resultados positivos verdaderos, sin embargo están fuera del rango de informe. Es muy recomendable repetir la prueba para las muestras '**dudosas**', preferentemente utilizando un nuevo extracto del mismo o de un nuevo espécimen colectado. Si la inhibición no es un problema, utilice más muestra. Si la prueba no se repite, informe "**No detectable**".
- Seleccionar resultados "**Negativos**".
- Inspeccionar visualmente las curvas negativas, identificar las curvas de amplificación que han sido llamados falsos negativos, corregir el resultado y marcar las muestras en las que los resultados han sido corregidos manualmente. Los llamados falsos negativos son raros.
- Determinar los resultados de las muestras "**negativas**" en relación con los resultados de la reacción de control (véase la sección 11.2.3).

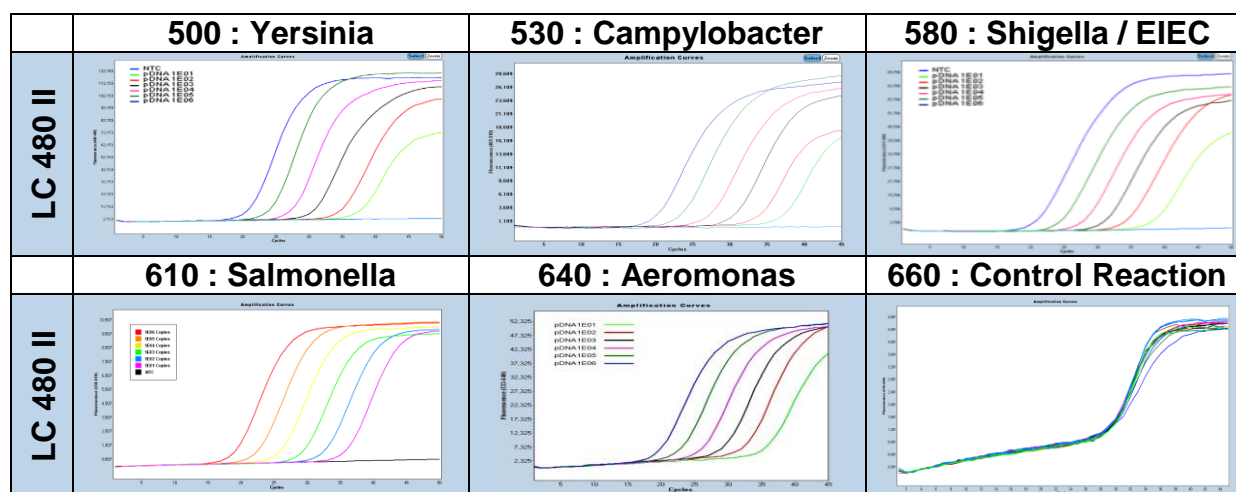
11.2.3. Determinar los verdaderos resultados "negativos"

- Identificar las muestras que son negativas para todos los canales de patógenos
- Comprobar que estas muestras tienen una curva de amplificación presente en la reacción de control (canal 660) .
- Informar de las muestras "negativas" con un resultado positivo para la reacción de control como "no detectable" con el mensaje "por debajo del límite de detección definido" para el patógeno *target* .
- Informar de las muestras "negativas" con un resultado positivo para cualquier otro patógeno como "no detectable".
- Informar de las muestras "negativas" con un resultado negativo para la reacción de control como "inhibido / ha fallado para generar un resultado" y solicitar una nueva muestra si es el caso.

11.2.4. Informe de muestras dudosas

Si repetidos el análisis de resultados para muestras "dudosas" no se logran resolver como "positivas" o "no detectable" deben ser reportados como "potencialmente positivos, por debajo del límite de detección".

Documentar todos los resultados corregidos manualmente e incluir la razón del ajuste.



11.3. Interpretación de los resultados de las muestras:

La reacción de control debe ser visible en todos los pocillos (positivo o pasados), si la muestra negativa es inhibida: repetir el procesamiento de muestras desde la extracción.

Cualquier NTC positivo en los canales target corresponde a una contaminación: NO reportar los resultados, repetir todo el ensayo de amplificación.

500	530	580	610	640	660 Control	500-640 NTC	Resultados
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Detectable	negativo	No bacterias detectables
Cp < corte	negativo	negativo	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	<i>Yersinia</i>
negativo	Cp < corte	negativo	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	<i>Campylobacter</i>
negativo	negativo	Cp < corte	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	<i>Shigella / EIEC</i>
negativo	negativo	negativo	Cp < corte	negativo	irrelevante*	negativo	<i>Salmonella</i>
negativo	negativo	negativo	negativo	Cp < corte	irrelevante*	negativo	<i>Aeromonas</i>
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	irrelevante	Inhibición/fallo Repetir
irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	positivo	Contaminación Repetir

* Muestras positivas altas podrían enmascarar la amplificación de otros *targets* presentes en la muestra . Resultados de *target* positivos combinados con resultados reacción de control negativo puede ser una indicación de inhibición. Se recomienda repetir el análisis con los ensayos de un solo *target* (ver sección 11.2.2) .

12. Limitaciones del ensayo

Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional capacitado en conjunto con la historia clínica del paciente, los signos clínicos y síntomas y factores de riesgo epidemiológico. La interpretación de los resultados del ensayo debe tener en cuenta de la posibilidad de resultados falsos. Los resultados negativos no excluyen la presencia del respectivo patógeno. Los resultados obtenidos no deben ser la única base de un tratamiento del paciente/gestión o decisión de salud pública.

Los resultados falsos positivos pueden ocurrir debido a la contaminación cruzada por los organismos *target*, ácidos nucleicos o producto amplificado. La recogida indebida, almacenamiento o transporte de especímenes pueden dar lugar a resultados falsos negativos. Fallos en el seguimiento de los procedimientos de los ensayos puede dar lugar a resultados falsos negativos. Inhibidores presentes en las muestras pueden conducir a resultados falsos negativos. Mutaciones potenciales dentro de las regiones *target* cubiertas por el primer y/o sondas de la prueba pueden resultar en una falla para detectar la presencia del patógeno.

La prueba no es validada como una prueba cuantitativa para la monitorización del tratamiento.

13. Referencias

14. MSDS

Según la directiva OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] y las directivas de la Unión Europea 67/548/EC y 1999/45/EC cualquiera de los productos que no contengan más del 1% de componentes clasificados como peligrosos o carcinogénicos no requieren una ficha de seguridad (MSDS).

El Producto no es peligroso ni tóxico, y no presenta restricciones IATA. El producto no es de origen humano, animal o vegetal. El producto contiene oligonucleótidos sintéticos (primers) y sondas.

15. Historial de versiones

Notas en **rojo**: eventos que requieren cambios en los procedimientos

V160202	Primera versión	2016-04-20

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany
Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM
Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg

Distributed by Roche - www.lifescience.roche.com



Notice to Purchaser – Patents and Trademarks

The purchase of the present product grants the right to use it in order to perform the amplification and detection of nucleic acid sequences for in-vitro diagnostic purpose on human origin samples. No other kind of license is transferred except the right to use the present product derived from its purchase. Other than expressly stated licenses, TIB MOLBIOL makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.

LIGHTMIX is a trademark of TIB MOLBIOL. LIGHTCYCLER, MAGNA PURE, HIGH PURE and COBAS Z are trademarks of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.