

GeneProof Hepatitis B Virus (HBV) PCR Kit



Producto médico para diagnóstico *in vitro*

Este kit ha sido fabricado de conformidad con la Directiva EC 98/79/EC como producto médico para diagnóstico *in vitro* y ha sido diseñado para su uso profesional en laboratorios clínicos y de investigación especializados.

CONTENIDO DEL KIT

Versión ISEX

CI suministrado en un tubo separado

Control de extracción y de inhibición de la PCR

REF	HBV/ISEX/025 25 rxn	HBV/ISEX/050 50 rxn	HBV/ISEX/100 100 rxn
MasterMix			
HBV	1 x750 µl	2 x750 µl	4 x750 µl
Calibrator A			
HBV 10 ⁴ IU/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator B			
HBV 10 ³ IU/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator C			
HBV 10 ² IU/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator D			
HBV 10 ¹ IU/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Internal Control			
HBV	1x1000 µl	1x1000 µl	2x1000 µl

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

El kit debe ser transportado a una temperatura de -20°C o inferior. El kit permanece estable al menos hasta la fecha de caducidad impresa en el paquete, si la temperatura de almacenamiento se mantiene (-20 ± 5°C). Los componentes son estables durante un máximo de 5 ciclos repetidos de congelación/descongelación después del primer uso de un vial en concreto. Los componentes del kit deben usarse antes de la fecha de caducidad ó 21 días después del primer uso de un vial concreto (lo que suceda primero).

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Secuencia Diana	Secuencia de ADN conservada del marco de lectura abierto X (ORF _x)
Especificidad Analítica	Genotipos de HBV A-H, mutantes pre-core HBV (HBeAg negativo), 100%
Sensibilidad Analítica (LoD) (con una probabilidad del 95 %)	Alcanza hasta 36.9792 IU/ml (en HBV NIBSC 05/148 usando GeneProof pathogen Free DNA Isolation Kit), 64.067 IU/ml (en HBV NIBSC 10/266 usando croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System), 13.9 IU/ml (en HVC NIBSC 10/266 usando extracción manual SpinStar Viral Nucleic Acid Kit 1.0 con SpinStar Pretreatment Solution)
Especificidad Diagnóstica	100% (CI _{95%} : 99.06% - 100%)
Sensibilidad Diagnóstica	100% (CI _{95%} : 95.90% - 100%)
Rango Linear	10 ¹⁰ - 10 ² IU/ml con precisión de ± 0.5 log
Rango Dinámico	10 ¹⁰ - 36.9792 IU/ml (usando GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit), 10 ¹⁰ - 64.067 IU/ml (usando croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System)
Unidades de Reporte	IU/µl
Trazabilidad metrológica	HBV NIBSC 10/266 (4th WHO International Standard)
Tipos de muestras validadas	plasma, suero
Control de calidad	regularmente testado por los paneles de evaluación de calidad externos QCMD e Instand e.V.
Estatuto regulador	CE ₁₀₂₃ IVD

El sistema de gestión de calidad está certificado de conformidad con los requisitos de la norma ČSN EN ISO 13485 ed.2:2016

INTERFERENCIAS

La prueba de interferencia se realizó utilizando plasma y suero negativos con un nivel establecido de marcadores bioquímicos que pueden ser posibles interferencias endógenas. El plasma y el suero negativos se enriquecieron con control positivo de HBV a 3x LoD. Niveles elevados de bilirrubina (342 µmol/L), albúmina (60 g/L), hemoglobina (2 g/L), urea (42,9 mmol/L), ácido úrico (1,4 mmol/L) y D-glucosa (55 mmol/L) en muestras se han analizado en presencia y ausencia de ADN de HBV. La evaluación y la configuración de los valores patológicos para las pruebas de interferencia se realizaron de acuerdo con las directrices CLSI EP7-A2. La prueba ha sido validada para su uso con plasma humano recogido en EDTA, heparina y citrato como sustancias anticoagulantes.

La validación se realizó según la directiva 2009/108/EC sobre muestras positivas y negativas. Las muestras positivas se prepararon añadiendo control positivo de HBV a 3x LoD.

PLASMA

Sustancia testada	Nivel testado	Interferencia observada	Sustancia testada	Nivel testado	Interferencia observada
Albúmina	60 g/L	Ninguna	Hemoglobina	2 g/L	Parcial
Bilirrubina	342 µmol/L	Ninguna	Urea	42.9 mmol/L	Parcial
Glucosa	55 mmol/L	Ninguna	Ácido úrico	1.4 mmol/L	Parcial

SUERO

Sustancia testada	Nivel testado	Interferencia observada	Sustancia testada	Nivel testado	Interferencia observada
Albúmina	60 g/L	Ninguna	Hemoglobina	2 g/L	Ninguna
Bilirrubina	342 µmol/L	Parcial	Urea	42.9 mmol/L	Parcial
Glucosa	55 mmol/L	Ninguna	Ácido úrico	1.4 mmol/L	Parcial

La prueba de interferentes endógenos mostró interferencia parcial del GeneProof Hepatitis B Virus (HBV) PCR Kit con una concentración alta (patológica) de hemoglobina, urea y ácido úrico en muestras de plasma. Se observó inhibición parcial con alta concentración (patológica) de bilirrubina, urea y ácido úrico en muestras de suero.

PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La detección del HBV consiste en la amplificación de una secuencia específica de ADN conservada de un marco de lectura abierto X (ORF_x) y en la medición del aumento de fluorescencia. La presencia de HBV está indicada por el crecimiento de fluorescencia del fluoróforo FAM. En el kit de PCR se incluye un Control Interno / *Internal Control* (CI), que controla la posible inhibición de la PCR y la calidad del proceso de extracción de ADN (versión ISEX). La amplificación positiva del CI se detecta en el canal de fluorescencia del fluoróforo HEX. El kit de detección utiliza la tecnología "hot start", minimizando reacciones inespecíficas y asegurando la máxima sensibilidad. La MasterMix lista para usar contiene uracil-ADN-glicosilasa (UDG) que elimina la posible contaminación de la PCR con productos de amplificación. El kit está diseñado para diagnósticos *in vitro* y proporciona la detección cualitativa y cuantitativa.

Versión ISEX

El control interno / *Internal Control* se proporciona como un elemento independiente dentro del paquete. Esta versión del kit de PCR permite tanto el control de la inhibición de la PCR como el control de la eficiencia del proceso de extracción de ácidos nucleicos.

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El muestreo de plasma y suero debe realizarse en viales estériles sin ningún medio de transporte. El material debe transportarse al laboratorio a una temperatura entre +2°C y +8°C en 24 horas. En caso de un almacenamiento más prolongado, mantenga todas las muestras congeladas a temperaturas inferiores a -20°C.

PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos debe realizarse mediante kits de extracción disponibles en el mercado, de acuerdo con los protocolos para la extracción de material clínico en particular. El fabricante recomienda los siguientes kits de extracción:

GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit

croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit

Cuando se utilizan las versiones ISEX de los kits de PCR, el CI (Internal Control) debe agregarse directamente a la muestra al comienzo del proceso de aislamiento de modo que al final 1 µl del volumen de elución resultante contenga 0,1 µl del CI:

Volumen de Elución	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Internal Control	2.5 µl	5 µl	10 µl	20 µl

PREPARACIÓN DE LA PCR

1. Agite suavemente y centrifugue brevemente los viales MasterMix y Calibradores (Calibrators).

2. Añada 30 µl de MasterMix en viales de PCR.

3. Añada 10 µl de la muestra de ácido nucleico aislada ó 10 µl de calibrador / *Calibrator* en los viales de PCR individuales y mézclelos pipeteando. El volumen total de la mezcla de reacción será de 40 µl. *Es necesario mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C durante la preparación de la PCR. En cada prueba debe utilizarse el aislado de control de aislamiento negativo con control interno / Internal Control. El material clínico negativo, el agua o el tampón se pueden utilizar como control de aislamiento negativo.*

El cliente debe utilizar su propio control negativo. Los 4 calibradores (Calibrators) deben utilizarse para establecer la curva estándar para la detección cuantitativa.

4. Cierre los viales, centrifugue brevemente, insértelo en el dispositivo y deje que se amplifiquen según el siguiente perfil de PCR.

Tenga mucho cuidado al manipular los calibradores (Calibrators) o el material clínico; ¡una manipulación incorrecta podría provocar contaminación y el consiguiente deterioro de los componentes del kit! El fabricante no se hace responsable del deterioro del kit debido a una manipulación incorrecta.

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Paso	Temperatura	Tiempo	Dato Recopilado	Ciclos
Hold	37 °C	2 min		1
Hold	95 °C	10 min		1
	95 °C	5 s		
PCR	60 °C	40 s	FAM + HEX	45
	72 °C	20 s		

INSTRUMENTOS

Hepatitis B Virus (HBV) PCR Kit está diseñado para su uso con dispositivos en tiempo real de varios fabricantes:

croBEE Real-Time PCR System

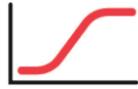
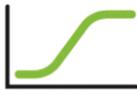
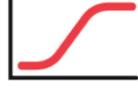
Applied Biosystems 7300 / 7500 Real-Time PCR System
AriaMx Real-Time PCR System
CFX Connect™ / CFX96™/ Dx Real-Time PCR Detection System
DT lite Real-Time PCR System
LightCycler® 2.0 / 480

LineGene 9600 / 9600 Plus
Mic qPCR Cyclers
QuantStudio™ 3/5 Real-Time PCR System
Rotor-Gene 3000 / 6000 / Q
SLAN® Real-Time PCR System
StepOne™/StepOne Plus™ Real-Time PCR System

Canales Requeridos: FAM, HEX

Los kits de diagnóstico GeneProof se verifican continuamente con varios tipos de dispositivos. La lista actualizada está disponible en www.geneproof.com o solicite la lista en support@geneproof.com

EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Canal FAM	Canal HEX	Resultado	Interpretación
		Válido	HBV positivo
		Válido	HBV positivo
		Válido	HBV negativo
		Inválido	

EVALUACIÓN DE DETECCIÓN CUANTITATIVA

Use la siguiente fórmula para calcular la concentración de virus en UI/ml teniendo en cuenta el volumen de material que ingresa a la extracción:

$$IU/ml = \frac{SC \times EV}{IV}$$

SC – Concentración de la Muestra (IU/μl)

EV – Volumen de Elución (μl)

IV – Volumen de Aislamiento (ml)

Puede usar la calculadora para la conversión de la concentración de patógenos en www.geneproof.com para facilitar el cálculo.

ADVERTENCIA

En el paquete se incluye una única instrucción de uso válida para un kit concreto o se puede solicitar al fabricante para un lote en particular. Utilice solo la combinación de componentes del kit de PCR específico. El kit debe eliminarse después de su uso de acuerdo con la normativa legal vigente teniendo en cuenta que el kit no contiene componentes peligrosos, infecciosos o tóxicos que estarían sujetos a normas especiales de seguridad, y los materiales de embalaje están hechos de papel y polipropileno. Si tiene alguna pregunta, comuníquese con nuestro Servicio de atención al cliente.

Servicio de Atención al Cliente y Soporte Técnico

Tel.: +420 730 176 222

Email: support@geneproof.com

Pedidos

Tel.: +420 543 211 679

Email: sales@geneproof.com



GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119 / Dolní Heršpice / CZ-619 00 Brno / +420 543 211 679 / info@geneproof.com

Version: IFU_0007_A03_1.0, Vigente desde: 15. 3. 2021

