

## Instrucciones de uso

# RealStar<sup>®</sup> BKV PCR Kit 1.2

02/2018 ES

**i Importante !**  
**Aviso de cambio**

# **Aviso de cambio**

---

Por favor tenga en cuenta que este producto proporciona resultados en unidades internacionales (UI).

**Para mayor información,  
póngase en contacto con nosotros**

**E-mail: [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)**

**Teléfono: +49-(0)40-5480676-0**

# RealStar<sup>®</sup>

## BKV PCR Kit 1.2

Para utilizar con

LightCycler<sup>®</sup> 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)

SmartCycler<sup>®</sup> II (Cepheid)



031212



48



02 2018



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Contenido

<b>1.</b>	<b>Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Almacenamiento .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Información general.....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descripción del producto.....</b>	<b>8</b>
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
<b>7.</b>	<b>Advertencias y precauciones .....</b>	<b>10</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimiento .....</b>	<b>12</b>
8.1	Preparación de las muestras .....	12
8.2	Preparación de la Master Mix .....	13
8.3	Preparación de la reacción .....	15
<b>9.</b>	<b>Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>15</b>
9.1	Configuración.....	16
9.2	Detectores de fluorescencia.....	16
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	17
<b>10.</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>17</b>
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	17
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.1.3	Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa).....	18
10.1.4	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa).....	19
10.2	Interpretación de los resultados .....	19
10.2.1	Análisis cualitativo.....	20

10.2.2	Análisis cuantitativo.....	20
<b>11.</b>	<b>Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>22</b>
11.1	Sensibilidad analítica .....	22
11.2	Especificidad analítica.....	23
11.3	Rango lineal .....	24
11.4	Precisión .....	25
<b>12.</b>	<b>Limitaciones .....</b>	<b>26</b>
<b>13.</b>	<b>Control de calidad.....</b>	<b>27</b>
<b>14.</b>	<b>Servicio técnico.....</b>	<b>27</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>28</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas comerciales e información legal .....</b>	<b>28</b>
<b>17.</b>	<b>Explicación de los símbolos .....</b>	<b>29</b>

## 1. Uso indicado

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación del ADN específico de virus BK (BKV).

## 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	4	60
Violeta	Master B	4	120
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	QS1-4	4	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

\* El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 contiene estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes (ver capítulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

## 3. Almacenamiento

- El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.

- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

#### 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1. Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (ver capítulo 8.1 Preparación de la Master Mix)
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Minicentrífuga con rotor para tubos de reacción Cepheid
- Agitador vortex
- Capilares LightCycler® con el material de cierre correspondiente
- Tubos de reacción Cepheid para el SmartCycler® II
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

#### NOTA



***Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.***

## 5. Información general

La familia *Polyomaviridae* está compuesta por, al menos 16 miembros, que infectan a diferentes especies de mamíferos. Dos de ellos, el *poliomavirus BK* (virus BK o BKV, por sus siglas en inglés) y el *poliomavirus JC* (virus JC o JCV, por sus siglas en inglés) establecen infecciones ubicuas en humanos de todo el mundo.

Los poliomavirus son virus pequeños icosaédricos no encapsulados con un genoma de ADN bicatenario superenrollado de unos 5000 pares de bases (pb). Los poliomavirus humanos comparten aproximadamente el 70 % de la identidad secuencial con el *virus Simian 40* (SV40, por sus siglas en inglés). A pesar de esta alta homología secuencial, los poliomavirus muestran una gama restringida de huéspedes con distinto comportamiento biológico y diferente patogénesis de enfermedades.

Las infecciones primarias por BKV suelen producirse en la primera infancia y suelen ser subclínicas, con la subsiguiente persistencia vitalicia. Las células epiteliales del riñón, el uréter y la vejiga se han identificado como los tipos de células que suelen resultar infectadas de forma predominante por el BKV. Mientras que las infecciones por poliomavirus permanecen asintomáticas en individuos inmunocompetentes, la reactivación de BKV o JCV, en asociación con la inmunosupresión, puede causar enfermedades graves. La reactivación del BKV es muy común en pacientes trasplantados de médula ósea y riñones, resultando en cistitis hemorrágicas (CH) y nefropatías asociadas a poliomavirus (NAPV), respectivamente.

## 6. Descripción del producto

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación del ADN específico de virus BK (BKV).

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (Control interno) para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.



La tecnología de PCR utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección del ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Las sondas específicas para el ADN de BKV están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el Control interno está marcada con un fluorocromo que muestra similares características de Cy®3.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ADN específico de BKV y del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de dos procesos en un solo tubo:

- Amplificación de PCR del ADN diana y del Control interno
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno (IC)
- Cuatro estándares de cuantificación (QS1 - QS4)
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación mediante la PCR y la detección del ADN específico de BKV, y el Control interno en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico de BKV. Estos estándares de cuantificación se han calibrado con el estándar internacional de la OMS BK Virus para técnicas de amplificación de

ácido nucleico (código NIBSC: 14/212). Los estándares de cuantificación pueden utilizarse individualmente como controles positivos, o de manera conjunta para generar una **curva estándar**, que puede utilizarse para determinar la concentración de ADN específico de BKV en una muestra.

Los estándares de cuantificación tienen las siguientes concentraciones:

Estándar Cuantificación	Concentración [UI/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)
- SmartCycler® II (Cepheid)

## 7. Advertencias y precauciones

*Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.*

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
  - Integridad
  - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetaje correcto

- Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los translade de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- Pueden utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No abra los tubos o capilares de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación por amplicones.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después de la PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad.

- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material inicial para el RealStar® BKV PCR Kit 1.2.

La calidad del ADN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® BKV PCR Kit 1.2 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

**PRECAUCIÓN**

*Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.*

**PRECAUCIÓN**

*El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.*

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

## 8.2 Preparación de la Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse completamente, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 contiene un Control interno heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de PCR.

- Si se utiliza el Control interno como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Internal Control (Control interno)	1 µl	12 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>16 µl</b>	<b>192 µl</b>

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

### PRECAUCIÓN



*Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.*

### PRECAUCIÓN



*Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.*

### 8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 15 µl de la Master Mix en cada capilar o tubo de reacción LightCycler® para el SmartCycler® II.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (estándar de cuantificación, control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	15 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que al menos un Positivo (QS) y al menos uno negativo por serie.
- ▶ Para la cuantificación, deben utilizarse todos los estándares de cuantificación (de QS1 a QS4).
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre los capilares o los tubos utilizando las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue los capilares o los tubos de reacción LightCycler® del SmartCycler® II utilizando una centrifuga adecuada durante 30 segundos a aproximadamente 400 x g (~2000 rpm).

## 9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

## 9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuraciones	
Volumen de reacción	25 µl*
Ramp Rate	Predeterminado

\* El volumen de reacción debe definirse como 20 µl, si se utiliza un LightCycler® 2.0 Instrument (Roche).

## 9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	LightCycler® 1.2/1.5	LightCycler® 2.0	SmartCycler® II
ADN específico de BKV	F1	530	FAM™
Internal Control (Control interno)	F2	610	Cy®3

### PRECAUCIÓN



*Para conseguir un análisis preciso con los LightCycler® Instruments, puede ser necesario disponer de un archivo de compensación de colores. Póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para recibir ayuda.*

### PRECAUCIÓN



*Al utilizar el LightCycler® 2.0 Instrument, solo deben utilizarse los canales de detección 530 y 610 para la compensación de colores.*



### 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Modo de análisis	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:sec]
Desnaturali- zación	Ninguno	1	-	95	02:00
Amplificación	Cuantifica- ción	45	Ninguno	95	00:05
			Único	60	00:30
			Ninguno	72	00:10
Refrigeración	Ninguno	1	-	40	00:30

## 10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® BKV PCR Kit 1.2 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

## 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

### 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610
Control positivo (QS)	+	+/-*
Control negativo	-	+

\* La presencia o ausencia de una señal en el canal Cy®3/F2/610 no es relevante para la validez de la prueba.

### 10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

### 10.1.3 Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cuantitativa** es **válida** si se cumplen todas las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas cualitativa **válida** [ver capítulo 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)]. Los resultados de **cuantificación** son **válidos** si la **curva estándar** generada alcanza el siguiente valor de parámetro de control:

Parámetro de control	Valor válido
R al cuadrado ( $R^2$ )	$\geq 0,98$

**NOTA**

*No todos los instrumentos de PCR en tiempo real muestran el valor R al cuadrado ( $R^2$ ). Para ver información detallada, consulte el manual de usuario del instrumento respectivo.*

#### 10.1.4 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cuantitativa** es **no válida**(i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **cuantitativa**.

En caso de que obtenga una serie de pruebas diagnósticas **no válida** , repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™/F1/530	Cy®3/F2/610	
+	+*	Se ha detectado ADN específico de BKV
-	+	No se ha detectado ADN específico de BKV. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de BKV.
-	-	Inhibición de la PCR o fallo del reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

\* La detección del Control interno en el canal de detección Cy®3/F2/610 no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™/F1/530. Una carga alta de ADN de BKV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

### 10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 incluye cuatro estándares de cuantificación (QS). Para generar una **curva estándar** para el análisis cuantitativo, deben definirse como **estándares** con desviaciones adecuadas (ver capítulo 6. Descripción del producto). Utilizando **estándares** de concentraciones conocidas, puede generarse una curva estándar de análisis cuantitativo.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

$C_t$  = Ciclo de umbral  
 $m$  = Pendiente  
 $N_0$  = Concentración inicial  
 $b$  = Intersección

Partiendo de la curva estándar, pueden cuantificarse muestras positivas de concentraciones desconocidas.

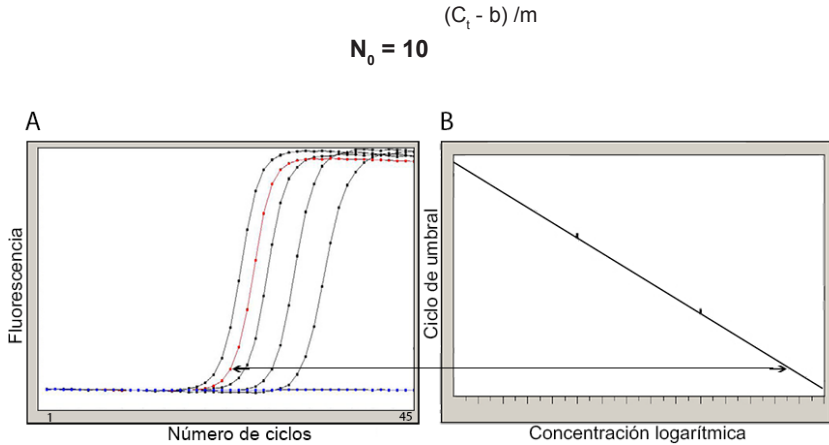


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [A] y un análisis de curva estándar [B]

**NOTE**



**La concentración de la muestra («Sample») se muestra en UI/μl y hace referencia a la concentración en el eluido.**

Para determinar la carga **viral de la muestra original**, debe aplicarse la siguiente fórmula:

$$\text{Carga viral (muestra) [UI/ml]} = \frac{\text{Volumen (Eluido) [\mu l]} \cdot \text{Carga viral (Eluido) [UI/\mu l]}}{\text{Entrada de muestra [ml]}}$$

## **11. Evaluación de rendimiento**

La evaluación de rendimiento del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se realizó utilizando ADN específico de BKV cuantificado aislado de la cepa BKV Dunlop (número ATCC®: 45025).

### **11.1 Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de BKV que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de ADN de BKV cuantificado.

Tabla 1: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de BKV

Conc. de entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	12	100
0,100	12	11	92
0,032	12	3	25
0,010	12	1	8
0,003	12	1	8

La sensibilidad analítica del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de BKV, la sensibilidad analítica es 0,222 copias/μl [95% de intervalo de confianza (CI): 0,115 - 0,844 copias/μl]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de BKV.

La especificidad analítica del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros poliomavirus ou outros agentes patogénicos significantes em doentes inmunocomprometidos.

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Citomegalovirus
- Virus de Epstein-Barr
- Virus de la Hepatitis A
- Virus de la Hepatitis B
- Virus de la Hepatitis C
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Virus del herpes humano 6A
- Virus del herpes humano 6B
- Virus del herpes humano 7
- Virus del herpes humano 8
- Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- Virus JC
- Virus simio 40
- Virus de la varicela zoster

### 11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN de virus BK cepa Dunlop utilizando concentraciones que van de 1,00E+09 a 1,00E+00 copias/μl. Cada dilución se analizó en tres replicados.



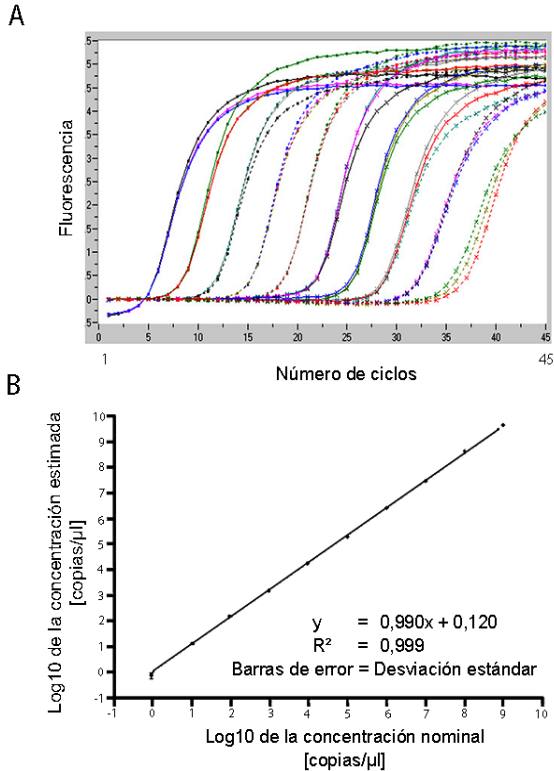


Figura 2: Amplification curves [A] and linear regression [B] of an analysed dilution series of DNA from BK virus strain Dunlop

El rango lineal del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se extiende más allá de un intervalo de al menos **nueve** órdenes de magnitud.

## 11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. Los datos se basan en el análisis de cuantificación de concentraciones definidas de ADN específico de BKV y en valores del ciclo de umbral de ( $C_t$ ) en términos del Control interno. Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 2: Datos de precisión para la detección específica del ADN de BKV

BKV	Concentração Média [copias/ $\mu$ l]	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	171,33	6,99	4,08
Variabilidad intertest	166,25	10,92	6,57
Variabilidad interlote	171,96	7,03	4,09
Variabilidad total	168,36	10,20	6,06

Tabla 3: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	26,23	0,05	0,18
Variabilidad intertest	26,23	0,07	0,26
Variabilidad interlote	26,24	0,04	0,14
Variabilidad total	26,24	0,06	0,22

## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la PCR (p.ej. heparina) puede provocar subcuantificación, falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de BKV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar subcuantificación y/o fallos al detectar la presencia del patógeno
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

### **13. Control de calidad**

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® BKV PCR Kit 1.2 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

### **14. Servicio técnico**

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**Teléfono:** +49-(0)40-5480676-0

## 15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

## 16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® BKV PCR Kit 1.2 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA

No disponible en todos los países.

© 2018 Altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

## 17. Explicación de los símbolos

Símbolos	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

**Notas:**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

