

Instrucciones de uso

RealStar[®] CMV PCR Kit 1.2

08/2017 ES

RealStar[®]

CMV PCR Kit 1.2

Para utilizar con

SmartCycler[®] II (Cepheid)

LightCycler[®] 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)



021212



48



08 2017



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

Contenido

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

10.2.1	Análisis cualitativo.....	20
10.2.2	Análisis cuantitativo.....	20
11.	Evaluación de rendimiento	22
11.1	Sensibilidad analítica	22
11.1.1	Sensibilidad analítica excluyendo la extracción de ácidos nucleicos.....	22
11.1.2	Sensibilidad analítica de las muestras de plasma con EDTA	24
11.2	Especificidad analítica.....	27
11.3	Rango lineal	28
11.4	Precisión	30
11.5	Evaluación del diagnóstico.....	30
12.	Limitaciones	33
13.	Control de calidad.....	34
14.	Servicio técnico.....	34
15.	Literature.....	35
16.	Marcas comerciales e información legal	35
17.	Explicación de los símbolos	37

1. Uso indicado

El RealStar® CMV 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 Citomegalovirus (CMV) en plasma EDTA humano.

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® CMV 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® CMV 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 8.2 Preparación de las muestras)
- 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)

NOTE



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

El *citomegalovirus humano* (CMV) es miembro de la familia *Herpesviridae* y pertenece a la subfamilia *Betaherpesvirinae*. El virus consta de una cápside icosaédrica con un genoma de ADN lineal bicatenario, de aproximadamente 230 kpb, un integumento circundante y una cápsula exterior.

El CMV tiene distribución mundial e infecta a humanos de todas las edades, sin patrones estacionales o epidémicos de transmisión. La seroprevalencia del CMV aumenta con la edad, en todas las poblaciones y va del 40 al 100 %. De forma parecida a lo que sucede con otros herpesvirus, la infección primaria por CMV tiene como resultado el establecimiento de una infección persistente o latente. La reactivación del virus puede producirse como respuesta a diferentes estímulos, particularmente la inmunosupresión. La gran mayoría de infecciones por CMV son asintomáticas o subclínicas, pero las infecciones congénitas y las infecciones en pacientes inmunocomprometidos pueden ser sintomáticas y graves. En huéspedes inmunocomprometidos, como receptores de trasplantes, pacientes con VIH o con cáncer, una infección o una reactivación de CMV puede convertirse en una enfermedad diseminada potencialmente letal.

6. Descripción del producto

El RealStar® CMV 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 Citomegalovirus (CMV) en plasma EDTA humano.

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 CMV 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 CMV 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® CMV 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 CMV, y el Control interno en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico de CMV. Estos estándares de cuantificación se han calibrado con el 1^{er} estándar internacional de la OMS para Cytomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162). 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 CMV 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® CMV PCR Kit 1.2 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

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

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 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

La sangre debe extraerse mediante sistemas de recogida de sangre con EDTA estándar y disponibles comercialmente (p. ej., de Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner o equivalente). Los tubos deberán mezclarse justo después de la recogida de las muestras. Las muestras de sangre deberán transportarse refrigeradas (2-8 °C). El transporte deberá realizarse de acuerdo con la legislación local o nacional relativa al transporte de material biológico.

Para la generación de plasma con EDTA, es necesario centrifugar la sangre total con EDTA en un plazo de 24 horas a partir de la recogida y de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante del sistema de recogida. El plasma con EDTA no deben almacenarse a 2-8 °C durante más de 14 días (Abdul-Ali et al. 2011).

8.2 Preparación de las muestras

El ADN extraído de plasma humano con EDTA es el material de base del RealStar® CMV PCR Kit 1.2.

La calidad del ADN extraído tiene una elevada repercusión en el rendimiento de todo el sistema de pruebas. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real.

Se validó el siguiente método de extracción de ácidos nucleicos para su uso con el RealStar® CMV PCR Kit 1.2:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

Para incrementar la sensibilidad del sistema, el protocolo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) puede modificarse según las especificaciones indicadas

en la tabla 4: Adaptaciones del protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)(véase el capítulo 11.1.2 Sensibilidad analítica para muestras de plasma con EDTA).

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).

8.3 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® CMV 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
Volumen de Master Mix	16 µl	192 µl

- ▶ 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
Volumen de Master Mix	15 µl	180 µl

CAUTION

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.

8.4 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
Volumen total	25 µl

- ▶ 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® CMV 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 CMV	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	Ciclo Repeticiones	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Ninguna	1	-	95	02:00
Amplificación	Cuantificación	45	Ninguna	95	00:05
			Solo	60	00:30
			Ninguna	72	00:10
Enfriamiento	Ninguna	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® CMV 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
Pendiente	-3,00 / -3,74
Eficiencia de PCR	85% / 115%
R al cuadrado (R ²)	> 0,98

NOTE



No todos los parámetros son mostrados por el software de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real. Para obtener información detallada, consulte el manual 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 CMV
-	+	No se ha detectado ADN específico de CMV. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de CMV.
-	-	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 no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™/F1/530. Una carga alta de ADN de CMV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

Se puede esperar un resultado positivo específico de CMV con un índice positivo del 95% si la muestra analizada contiene al menos 80,71 UI de CMV por ml de plasma con EDTA [intervalo de confianza del 95%: 44,90 – 230,86 UI/ml].

Al igual que con cualquier prueba de diagnóstico, los resultados obtenidos con la RealStar® CMV PCR Kit 1.2 deben interpretarse teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® CMV 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.

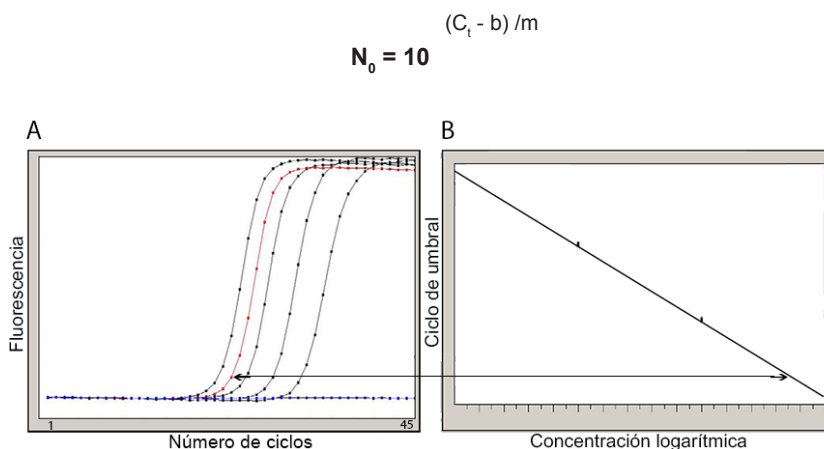


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [A] y un análisis de curva estándar [B]

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 analítico del RealStar® CMV PCR Kit 1.2 se realizó utilizando ADN específico de CMV. Los estándares de cuantificación se han calibrado con el 1^{er} estándar internacional de la OMS para citomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección o LD) del RealStar® CMV PCR Kit 1.2 se define como la concentración de moléculas de ADN de CMV que pueden detectarse con un índice positivo del 95%. La sensibilidad analítica se determinó con y sin un método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado.

11.1.1 Sensibilidad analítica excluyendo la extracción de ácidos nucleicos

Se preparó una serie de dilución de ADN de CMV desde 3,1623 UI/μl hasta un valor nominal de 0,0003 UI/μl y se analizó con el RealStar® CMV PCR Kit 1.2 en combinación con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

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

Las pruebas se realizaron en dos días con al menos ocho réplicas por concentración cada vez. Los resultados se determinaron mediante análisis probit:

Tabla 1: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

Conc. [UI/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	13	81
0,1000	16	7	44
0,0316	16	3	19
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tabla 2: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica [SmartCycler® II (Cepheid)]

Conc. [UI/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,1623	16	16	100
1,0000	16	16	100
0,3162	16	14	88
0,2081	16	13	81
0,1000	32	8	25
0,0658	16	1	6
0,0316	16	1	6
0,0100	16	0	0
0,0032	16	0	0
0,0010	16	0	0
0,0003	16	0	0

Tabla 3: Sensibilidad analítica determinada mediante análisis Probit utilizando diferentes instrumentos de PCR en tiempo real

Instrumento de PCR en tiempo real	Límite de detección [95%]	Intervalo de confianza [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	0,62 UI/μl	0,35 - 1,75 UI/μl
SmartCycler® II	0,42 UI/μl	0,30 - 0,83 UI/μl

11.1.2 Sensibilidad analítica de las muestras de plasma con EDTA

La sensibilidad analítica de un método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado para muestras de plasma con EDTA se determinó utilizando una serie de dilución del 1^{er} estándar internacional de la OMS para Cytomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162) desde 1000 UI/ml hasta un valor nominal de 0,32 UI/ml en plasma con EDTA negativo para CMV.

En dos días, ocho alícuotas por concentración cada vez fueron sometidas a la extracción de ácidos nucleicos utilizando el QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN). El protocolo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) se adaptó de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 4: Adaptaciones del protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

	QIAGEN Protocol [μl]	Adaptacion [μl]
Muestra	200	400
Poteasa	25	50
Tampón de lisis (AL)	200	400
Etanol ¹ (abs.)	250	500
Tampón de lavado (AW1)	500	700
Tampón de lavado (AW2)	500	700
Etanol ² (abs.)	500	700

¹ agregado a la mezcla de tampón de muestra / lisis

² Pasa de lavado 3

Cada eluido se analizó mediante el RealStar® CMV PCR Kit 1.2 en combinación con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

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

Los resultados fueron determinados por análisis prohibit.

Tabla 5: Resultados de PCR usados para calcular la sensibilidad analítica de la muestra de plasma con EDTA [LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments (Roche)]

Conc. [UI/ml]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	14	88
10,00	16	6	38
3,16	16	5	31
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tabla 6: Resultados de PCR usados para calcular la sensibilidad analítica de la muestra de plasma con EDTA [SmartCycler® II (Cepheid)]

Conc. [UI/ml]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1000,00	16	16	100
316,23	16	16	100
100,00	16	16	100
31,62	16	12	75
10,00	16	5	31
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0

Tabla 7: Sensibilidad analítica de las muestras de plasma con EDTA determinada mediante análisis probit utilizando diferentes instrumentos de PCR en tiempo real

Instrumento de PCR en tiempo real	Límite de detección [95%]	Intervalo de confianza [95%]
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	58,52 UI/ml	32,38 - 168,38 UI/ml
SmartCycler® II	80,71 UI/ml	44,90 - 230,86 UI/ml

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® CMV 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 CMV.

Se analizaron más de 100 muestras diferentes de EDTA plasma negativas con el RealStar® CMV PCR Kit 1.2. Ninguna de ellas mostró una señal específica positiva en CMV, pero todas mostraron una señal positiva en Control interno. En adición, la especificidad analítica del RealStar® CMV PCR Kit 1.2 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros herpesvirus o de otros patógenos significativos en pacientes inmunocomprometidos.

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

- Virus BK
- Virus de Epstein-Barr
- Virus de la Hepatitis A
- Virus de la Hepatitis B
- Virus de la Hepatitis C
- Virus del herpes simple 1
- Virus del herpes simple 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
- Parvovirus humano B19
- Virus JC
- Virus simio 40
- Virus de la varicela zoster

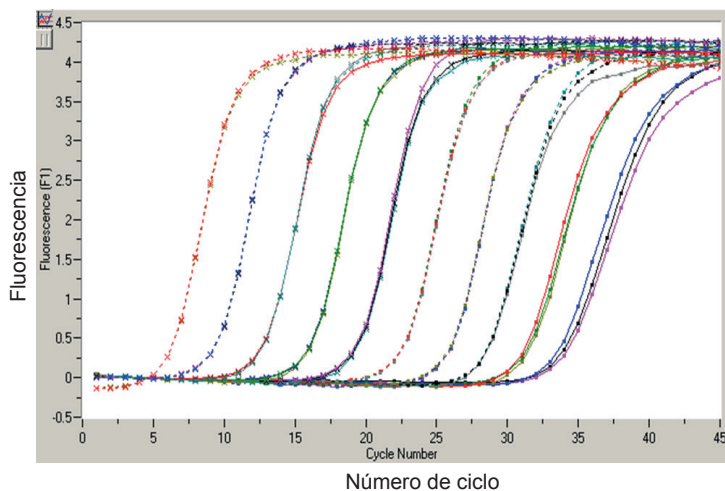
11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® CMV PCR Kit 1.2 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN específico de CMV (utilizando concentraciones que van de 1,00E+09 - 1,00E+00 UI/μl) utilizando los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

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

Cada concentración se analizó en cuatro réplicas por instrumento de PCR en tiempo real.

A



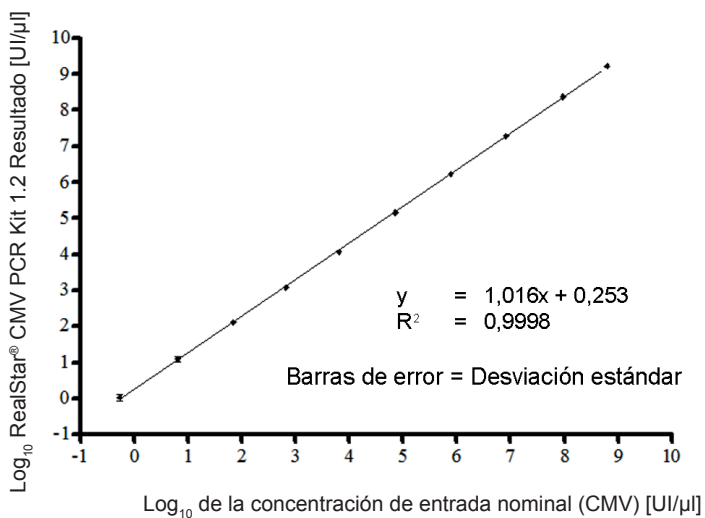
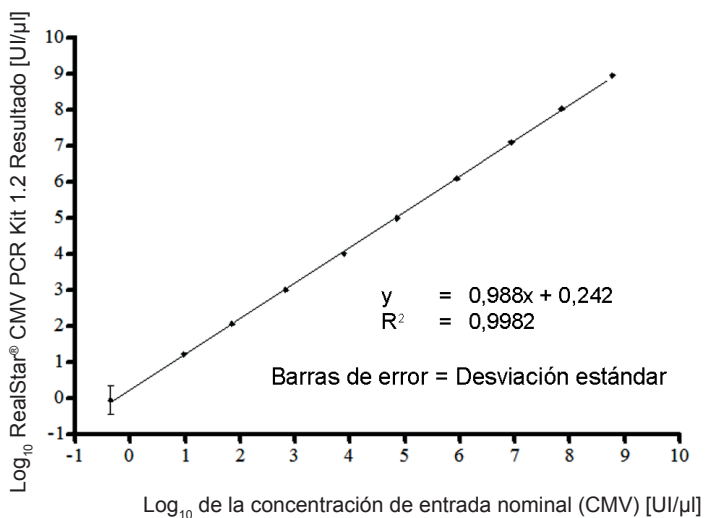
B**C**

Figura 2: Curvas de amplificación en una LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [A] y regresión lineal de la serie de diluciones analizadas en un LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) [B] y en un SmartCycler® II (Cepheid) [C]

El rango lineal del RealStar® CMV PCR Kit 1.2 se extiende más allá de un intervalo de al menos nueve órdenes de magnitud, que van desde 1,00E+01 - 1,00E+09 UI/μl.

11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® CMV 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 un control de alto positivo (150 UI/μl) en el valor del ciclo de umbral (C_t) en términos de un control de bajo positivo (1,5 UI/μl) y del control interno (IC). Se analizaron al menos ocho réplicas por muestra.

Tabla 8: Precisión en términos de coeficiente de variación de la variabilidad total utilizando diferentes instrumentos de PCR en tiempo real

Instrumento de PCR en tiempo real	Variabilidad total / Coeficiente de variación [%]		
	Alto control positivo	Bajo control positivo	Controle interno
LightCycler® 1.2/1.5/2.0 Instruments	11,56	2,13	0,32
SmartCycler® II	8,35	2,71	0,75

11.5 Evaluación del diagnóstico

El kit RealStar® CMV PCR 1.2 se evaluó en un estudio comparativo con el kit RealStar® CMV PCR Kit 1.0 marcado con CE-IVD (altona Diagnostics).

Se analizaron los eluidos de 200 muestras de plasma EDTA enviadas para la prueba CMV de rutina en paralelo con el kit RealStar® CMV PCR 1.0 en un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) y con el RealStar® CMV PCR Kit 1.2 en un SmartCycler® II (Cepheid) así como en un LightCycler® 1.5 Instrument (Roche).

Tabla 9: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica [LightCycler® 1.5 Instrument (Roche)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	5*	117

* Todas las muestras discrepantes tenían una concentración de CMV alrededor del LoD de ambos ensayos.

La sensibilidad de diagnóstico y la especificidad del kit RealStar® CMV PCR 1.2 en una LightCycler® 1.5 Instrument (Roche) comparado con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 en un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) fue 89,7% y 95,9%, respectivamente.

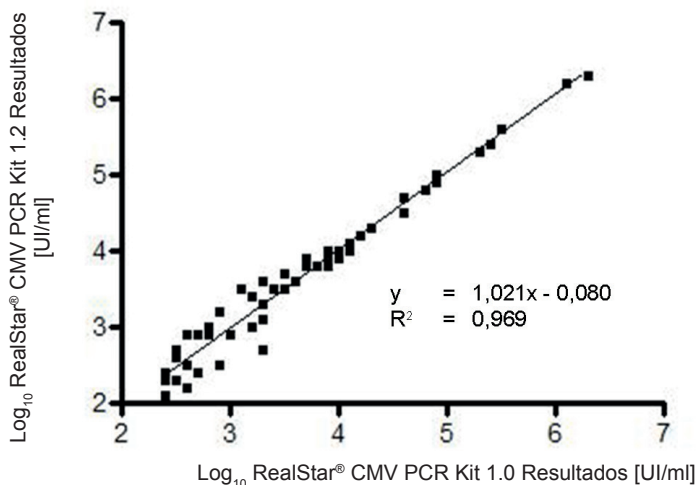
Tabla 10: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica [SmartCycler® II (Cepheid)]

		RealStar® CMV PCR Kit 1.2	
		+	-
RealStar® CMV PCR Kit 1.0	+	70	8*
	-	6*	116

* Todas las muestras discrepantes tenían una concentración de CMV alrededor del LoD de ambos ensayos.

La sensibilidad de diagnóstico y la especificidad del kit RealStar® CMV PCR 1.2 en una SmartCycler® II (Cepheid) en comparación con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 en un ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) fue 89,7% y 95,1%, respectivamente.

A



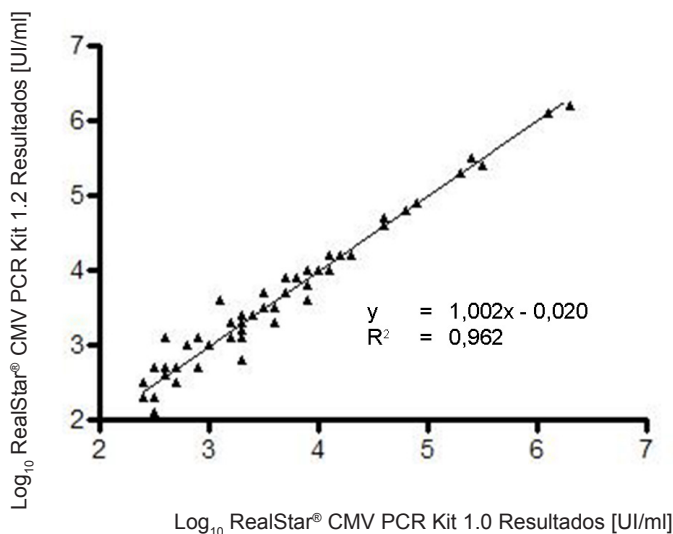
B

Figura 3: Correlación de los resultados de cuantificación del CMV entre el kit RealStar® CMV PCR 1.2 utilizado en un instrumento LightCycler® 1.5 (Roche) [A] y en un SmartCycler® II (Cepheid) [B] y el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 usado en una ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) (n=55).

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 CMV 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® CMV 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® CMV 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

Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

15. Literature

- [1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.
- [2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.
- [3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.
- [4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.
- [5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); QIAamp®, MinElute® (QIAGEN).

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® CMV 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.

© 2017 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

www.altona-diagnostics.com

