

Instrucciones de uso

RealStar[®] HHV-6 PCR Kit 1.0

09/2018 ES

i Importante !
Aviso de cambio

Aviso de cambio

Tenga en cuenta que este ensayo presenta
los resultados en unidades
internacionales (UI).

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

E-mail: support@altona-diagnostics.com

Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

RealStar[®]

HHV-6 PCR Kit 1.0

Para utilizar con

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)



311013



96



09 2018



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..... | 11 |
| 6.2 | Tipos de muestras..... | 11 |
| 7. | Advertencias y precauciones | 12 |
| 8. | Procedimiento | 13 |
| 8.1 | Preparación de las muestras | 14 |
| 8.2 | Preparación de la Master Mix | 15 |
| 8.3 | Preparación de la reacción | 17 |
| 9. | Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real..... | 18 |
| 9.1 | Configuración | 18 |
| 9.2 | Detectores de fluorescencia..... | 18 |
| 9.3 | Perfil de temperatura y detección de fluorescencia | 18 |
| 10. | Análisis de datos..... | 19 |
| 10.1 | Validez de las series de pruebas diagnósticas | 19 |
| 10.1.1 | Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)..... | 19 |
| 10.1.2 | Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)..... | 20 |
| 10.1.3 | Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)..... | 20 |
| 10.1.4 | Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)..... | 20 |
| 10.2 | Interpretación de los resultados | 20 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 10.2.1 | Análisis cualitativo..... | 21 |
| 10.2.2 | Análisis cuantitativo..... | 21 |
| 11. | Evaluación de rendimiento | 23 |
| 11.1 | Sensibilidad analítica | 24 |
| 11.2 | Especificidad analítica..... | 25 |
| 11.3 | Rango lineal | 27 |
| 11.4 | Precisión | 28 |
| 11.5 | Evaluación del diagnóstico..... | 29 |
| 12. | Limitaciones | 29 |
| 13. | Control de calidad..... | 30 |
| 14. | Servicio técnico..... | 31 |
| 15. | Bibliografía | 31 |
| 16. | Marcas comerciales e información legal | 31 |
| 17. | Explicación de los símbolos | 33 |

1. Uso indicado

El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección, diferenciación y cuantificación del ADN específico de Herpesvirus humano 6A (HHV-6A) e Herpesvirus humano 6B (HHV-6B).

2. Componentes del kit

| Color tapa | Componente | Número de viales | Volumen [µl/vial] |
|------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Azul | Master A | 8 | 60 |
| Violeta | Master B | 8 | 180 |
| Verde | Internal Control | 1 | 1000 |
| Rojo | QS1-4* | 4 | 250 |
| Blanco | Water (PCR grade) | 1 | 500 |

* El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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

- 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
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- 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.

NOTA



Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

El *herpesvirus 6 humano* (HHV-6, por sus siglas en inglés) es la descripción global para los dos subtipos íntimamente relacionados HHV-6A y HHV-6B. La infección primaria con HHV-6 suele darse antes de los dos años de edad y el virus permanecerá latente en el cuerpo. Síntomas: fiebre infantil, diarrea y sarpullido de exantema súbito (más conocido como roséola). La primera infección puede causar, de forma infrecuente, convulsiones febriles, encefalitis o convulsiones intratables.

El HHV-6 puede reactivarse a lo largo de la vida. La reactivación se asocia a muchas manifestaciones clínicas que pueden producirse en diferentes partes del cuerpo, como el cerebro, los pulmones, el corazón, los riñones y el tracto gastrointestinal. Aunque es rara, la reactivación del HHV-6 en el cerebro puede provocar disfunción cognitiva, discapacidad permanente y la muerte.

Mientras que el HHV-6B puede causar problemas en pacientes inmunocomprometidos y en niños de los EE. UU., Japón y Europa, el HHV-6A se da predominantemente en África. Este último es, además, más frecuente en pacientes con enfermedades neurológicas crónicas como enfermedades neuroinflamatorias, entre las que se encuentran la esclerosis múltiple (EM) y la rubeoencefalitis.

6. Descripción del producto

El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección, diferenciación y cuantificación del ADN específico de Herpesvirus humano 6A (HHV-6A) e Herpesvirus humano 6B (HHV-6B).

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 HHV-6A están marcadas con el fluorocromo FAM™, mientras que las sondas específicas para el ADN de HHV-6B están marcadas con un fluorocromo que muestra similares características de Cy®5. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ADN específico de HHV-6A y HHV-6B, así como 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno (IC)
- Cuatro estándares de cuantificación (QS1-4)
- 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 HHV-6A, ADN específico de HHV-6B, y el Control interno en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico del HHV-6A y HHV-6B. El estándar de cuantificación para el ADN específico del HHV-6B se ha calibrado con el 1.er estándar internacional de la OMS sobre el ADN del virus del herpes humano 6B (HHV-6B) para ensayos basados en NAT sobre técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 15/266) [1].

Para calibrar el material positivo específico del HHV-6A del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0, se ha utilizado un ensayo de detección de ácido nucleico sin hacer diferenciación entre el HHV-6A y HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). La calibración se ha realizado con análisis paralelo con el material positivo específico del HHV-6A y el 1.er estándar internacional de la OMS sobre el ADN del virus del herpes humano 6B (HHV-6B) (código NIBSC: 15/266). La calibración se ha confirmado mediante el RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0.

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 HHV-6A y HHV-6B.

- [1] Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report 217; WHO/BS/2017.2321.

Los estándares de cuantificación tienen las siguientes concentraciones:

| Estándar Cuantificación | Concentración [UI/μl] | |
|-------------------------|--------------------------|----------|
| | HHV-6A | HHV-6B |
| QS1 | 1,00E+04 | 1,00E+04 |
| QS2 | 1,00E+03 | 1,00E+03 |
| QS3 | 1,00E+02 | 1,00E+02 |
| QS4 | 1,00E+01 | 1,00E+01 |

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipos de muestras

Se han validado los siguientes tipos de muestras con el HHV-6 PCR Kit 1.0 de RealStar®:

- Plasma EDTA humano
- Sangre total humana

Si se aplica un procedimiento adecuado de extracción de ácido nucleico, pueden utilizarse tipos de muestras adicionales junto con el HHV-6 PCR Kit 1.0 de RealStar®. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico debe validarla el usuario.

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 (ADNasas/ARNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de ADNasas/ARNasas 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.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- 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 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® HHV-6 PCR Kit 1.0.

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)
- 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 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 | 15 µl | 180 µl |
| Internal Control (Control interno) | 1 µl | 12 µl |
| Volumen de Master Mix | 21 µl | 252 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 | 15 µl | 180 µl |
| Volumen de Master Mix | 20 µl | 240 µl |

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 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ 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 | 20 µl |
| Muestra o control | 10 µl |
| Volumen total | 30 µl |

- ▶ Asegúrese de que se utilicen cada control positivo (QS) y al menos uno negativo por serie.
- ▶ Para la cuantificación, deben utilizarse todos los estándares de cuantificación (HHV-6A y HHV-6B) (de QS1 a QS4).
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.

- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

| Configuraciones | |
|---------------------|----------------|
| Volumen de reacción | 30 µl |
| Ramp Rate | Predeterminado |
| Referencia pasiva | ROX™ |

9.2 Detectores de fluorescencia

- ▶ Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

| Objetivo | Nombre de detector | Reporter | Quencher |
|------------------------------------|--------------------|----------|-----------|
| ADN específico de HHV-6A | HHV-6A | FAM™ | (Ninguno) |
| ADN específico de HHV-6B | HHV-6B | Cy®5 | (Ninguno) |
| Internal Control (Control interno) | IC | JOE™ | (Ninguno) |

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

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

| | Fase | Ciclo Repite | Obtención | Temperatura [°C] | Tiempo [min:sec] |
|-------------------|-----------|--------------|-----------|------------------|------------------|
| Desnaturalización | Retención | 1 | - | 95 | 10:00 |
| Amplificación | Ciclo | 45 | - | 95 | 00:15 |
| | | | sí | 58 | 01:00 |

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® HHV-6 PCR Kit 1.0 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™ | Cy ⁵ | JOE™ |
| Control positivo (QS) | + | + | +/-* |
| Control negativo | - | - | + |

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ 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™ | Cy®5 | JOE™ | |
| + | + ¹ | +* | Se ha detectado ADN específico de HHV-6A y HHV-6B. |
| + | - ¹ | +* | Se ha detectado ADN específico de HHV-6A. |
| - | + | +* | Se ha detectado ADN específico de HHV-6B. |
| - | - | + | No se ha detectado ADN específico de HHV-6A ni de HHV-6B. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de HHV-6A ni de HHV-6B. |
| - | - | - | 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 JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™ o en el canal de detección Cy®5. Una carga alta de ADN de HHV-6A y/o HHV-6B en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

¹ Como resultado de la aparición de nuevas secuencias, la reactividad cruzada del sistema de detección para el HHV-6B con algunas cepas del HHV-6A no puede descartarse. Estas cepas se detectarán con señales débiles en el canal de detección para el HHV-6B (Cy®5) aparte de detectarse en el canal de detección para el HHV-6A (FAM™).

10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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.

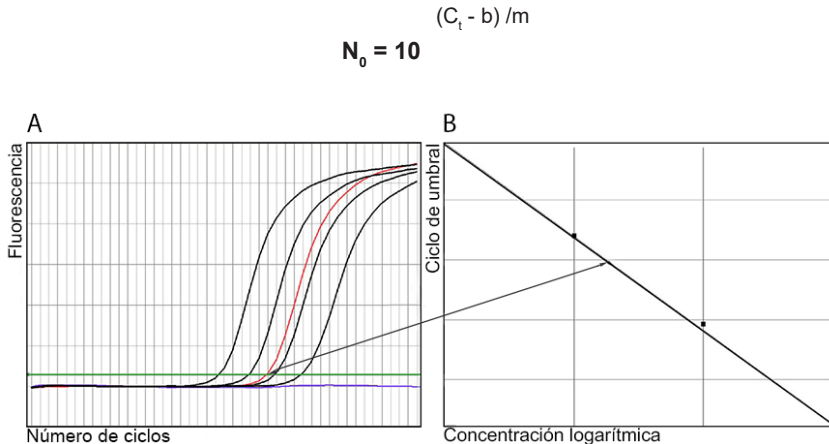


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [A] y un análisis de curva estándar [B]

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

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

NOTE

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

11. Evaluación de rendimiento

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/ μ l del eluido) de moléculas de ADN específico de HHV-6A o HHV-6B 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 HHV-6A y de ADN de HHV-6B.

Tabla 1: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de HHV-6A

| Conc. de entrada [copias/ μ l] | Número de replicados | Número de positivos | Índice de éxito [%] |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 10,000 | 30 | 30 | 100 |
| 3,162 | 30 | 30 | 100 |
| 1,500 | 30 | 30 | 100 |
| 1,000 | 30 | 28 | 93 |
| 0,500 | 30 | 23 | 77 |
| 0,316 | 30 | 17 | 57 |
| 0,100 | 30 | 13 | 43 |
| 0,032 | 30 | 4 | 13 |
| 0,010 | 30 | 2 | 7 |
| 0,003 | 30 | 0 | 0 |
| 0,001 | 30 | 0 | 0 |

Tabla 2: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de HHV-6AB

| Conc. de entrada [copias/μl] | Número de replicados | Número de positivos | Índice de éxito [%] |
|------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 10,000 | 24 | 24 | 100 |
| 3,162 | 24 | 24 | 100 |
| 1,500 | 24 | 23 | 95 |
| 1,000 | 28 | 26 | 93 |
| 0,500 | 24 | 21 | 88 |
| 0,316 | 24 | 13 | 54 |
| 0,100 | 24 | 8 | 33 |
| 0,032 | 24 | 4 | 17 |
| 0,010 | 24 | 0 | 0 |
| 0,003 | 24 | 0 | 0 |
| 0,001 | 24 | 0 | 0 |

La sensibilidad analítica del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de HHV-6A, la sensibilidad analítica es 1,49 copias/μl eluate [95% de intervalo de confianza (CI): 0,98 – 2,63 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de HHV-6B, la sensibilidad analítica es 1,35 copias/μl eluate [95% de intervalo de confianza (CI): 0,89 – 2,47 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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 HHV-6A y HHV-6B.

El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus BK
- Citomegalovirus
- Epstein-Barr virus
- Virus de la Hepatitis A
- Virus de la Hepatitis B
- Virus de la Hepatitis C
- Herpes simplex virus 1
- Herpes simplex virus 2
- Virus del herpes humano 7
- Virus del herpes humano 8
- Human parvovirus B19
- Virus JC
- Virus de la varicela zoster

11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN específico de HHV-6A y HHV-6B utilizando concentraciones que van de 1E+08 a 1E+00 copias/μl. Se analizaron al menos seis replicados por dilución.

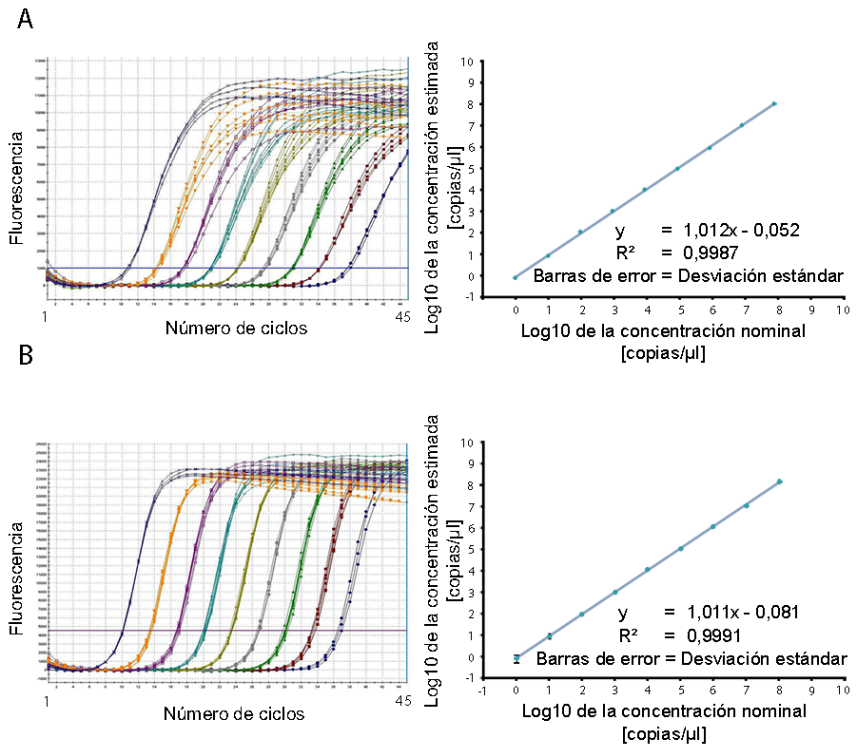


Figura 2: Curvas de amplificación y regresión lineal de una serie de diluciones analizadas de ADN específico de HHV-6A **[A]** y HHV-6B **[B]**

El rango lineal del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 para ADN específico de HHV-6A y HHV-6B se extiende en ambos casos más allá de un intervalo de al menos **ocho** órdenes de magnitud.

11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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.

Tabla 3: Datos de precisión para la detección del HHV-6A y HHV-6B específico de ADN

| HHV-6A and HHV-6B | | Concentración Média [copias/ μ l] | Desviación estándar | Coefficiente de variación [%] |
|------------------------|--------|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Variabilidad intratest | HHV-6A | 133,00 | 9,70 | 5,21 |
| | HHV-6B | 160,88 | 10,34 | 4,19 |
| Variabilidad intertest | HHV-6A | 137,00 | 9,68 | 7,05 |
| | HHV-6B | 160,63 | 8,42 | 5,24 |
| Variabilidad interlote | HHV-6A | 136,00 | 9,61 | 7,06 |
| | HHV-6B | 158,36 | 10,04 | 6,34 |
| Variabilidad total | HHV-6A | 138,00 | 9,22 | 6,67 |
| | HHV-6B | 159,03 | 8,96 | 5,64 |

Tabla 4: Datos de precisión para la detección del Control interno

| Internal Control | Ciclo de umbral medio (C_t) | Desviación estándar | Coefficiente de variación [%] |
|------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Variabilidad intratest | 27,80 | 0,05 | 0,10 |
| Variabilidad intertest | 27,40 | 0,22 | 0,81 |
| Variabilidad interlote | 27,50 | 0,34 | 1,25 |
| Variabilidad total | 27,50 | 0,28 | 1,02 |

11.5 Evaluación del diagnóstico

La sensibilidad y la especificidad del diagnóstico del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se evalúan constantemente analizando muestras de referencia y muestras de diagnóstico probadas previamente con un método de referencia.

Tabla 5: Resultados de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0

| | | RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 | | |
|----------------------|------------|-----------------------------|------------|---|
| | | HHV-6A (+) | HHV-6B (+) | - |
| Método de referencia | HHV-6A (+) | 8 | 0 | 0 |
| | HHV-6B (+) | 0 | 19 | 0 |
| | - | 0 | 0 | 3 |

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 HHV-6Ay HHV-6B 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 diagnostica, los resultados del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 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. 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® HHV-6 PCR Kit 1.0 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:

Notas:

