altona DIAGNOSTICS

Instrucciones de uso

RealStar®
CMV PCR Kit 1.0

09/2023 ES

RealStar®

RealStar®

CMV PCR Kit 1.0

Para utilizar con

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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

CE 0483

IVD

REF 021013

Σ 96

09 2023

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

MAN-021010-ES-S03

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 ... 11

8. Procedimiento ... 12

8.1 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras ... 12

8.2 Preparación de las muestras ... 13

8.3 Preparación de la Master Mix ... 14

8.4 Preparación de la reacción ... 16

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real ... 17

9.1 Configuración ... 17

9.2 Detectores de fluorescencia ... 17

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia ... 18

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) ... 19

10.1.3 Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa) ... 19

10.1.4 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa) ... 20

10.2 Interpretación de los resultados ... 20

10.2.1 Análisis cualitativo 20
10.2.2 Análisis cuantitativo 21

11. Evaluación de rendimiento 23
11.1 Sensibilidad analítica 23
11.1.1 Sensibilidad analítica excluyendo la extracción de ácidos nucleicos 23
11.1.2 Sensibilidad analítica de las muestras de plasma con EDTA 25
11.1.3 Sensibilidad analítica de las muestras de sangre total con EDTA 27
11.2 Especificidad analítica 28
11.3 Rango lineal 29
11.4 Precisión 31
11.5 Evaluación del diagnóstico 32
11.5.1 Tipo de muestra: plasma con EDTA 32
11.5.2 Tipo de muestra: sangre total con EDTA 34

12. Limitaciones 35

13. Control de calidad 36

14. Servicio técnico 37

15. Bibliografía 37

16. Marcas comerciales e información legal 38

17. Explicación de los símbolos 39

1. Uso indicado

El RealStar® CMV PCR Kit 1.0 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 y EDTA sangre completa.

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® CMV PCR Kit 1.0 contiene estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes (ver capitulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® CMV PCR Kit 1.0 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 °C 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 poducto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.

- El almacenamiento entre +2 °C 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
- 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	
i	***Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.***
i	***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 *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 1.0 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 y EDTA sangre completa.

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 (IC) está marcada con el fluorocromo JOE™.

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 1.0 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 do 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 1er 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 de 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 1.0 fue validado para plasma EDTA en combinación con el QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

El RealStar® CMV PCR Kit 1.0 fue validado para EDTA plasma y EDTA sangre completa en combinación con el VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare) con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

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.
- 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 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 y la sangre total 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, o de la sangre humana total con EDTA, es el material de base del RealStar® CMV PCR Kit 1.0.

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.

Para **plasma con EDTA** se validó el siguiente método de extracción de ácidos nucleicos para su uso con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP en combinación con el VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

Para incrementar la sensibilidad del sistema, el protocolo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) puede modificarse según las especificaciones indicadas en la tabla 3: Adaptaciones del protocolo QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) (véase el capítulo 11.1.2 Sensibilidad analítica de las 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.

Para **sangre total con EDTA** se validó el siguiente método de extracción de ácidos nucleicos para su uso con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- VERSANT® kPCR Molecular System SP en combinación con el VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

En el caso de las muestras de sangre total con EDTA, el protocolo de preparación de muestras para los reactivos VERSANT® Sample Preparation 1.2 (SMN 10629800 y 10629801) debe modificarse de la siguiente forma: Las muestras con sangre total con EDTA deben mezclarse con solución amortiguadora PRE en la proporción 1:1 (350 µl + 350 µl) en lugar de hacerlo en la proporción indicada en las instrucciones de uso.

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 ihnibidor de la PCR en tiempo real.***
⚠	***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 1.0 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.***
⚠	***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 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 al menos se utilicen un control positivo (QS) y 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 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 1 000 x g (~3 000 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 1.0 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	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia

► Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ADN específico de CMV	CMV	FAM™	(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:

	Modo de análisis	Ciclo Repeticiones	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Mantener	1	-	95	10:00
Amplificación	Ciclismo	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® CMV 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™	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)	> 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 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.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
+	+*	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 JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™. 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 meno 265 UI de CMV por ml de plasma con EDTA [intervalo de confianza del 95 %: 50 - 2278 UI/ml] y 835 UI de CMV por ml de sangre total con EDTA [intervalo de confianza del 90 %: 614 - 1274 UI/ml].

Al igual que con cualquier prueba de diagnóstico, los resultados obtenidos con la RealStar® CMV PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® CMV 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.

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

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.

$$\mathbf{N_0 = 10^{(C_t - b)/m}}$$

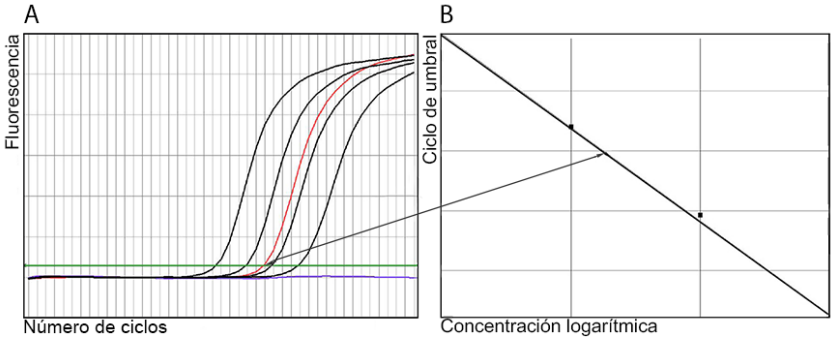


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [**A**] y un análisis de curva estándar [**B**]

NOTA

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:

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

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación del rendimiento analítico sin un método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado se llevó a cabo utilizando ADN específico de CMV cuantificado. La evaluación de rendimiento analítico con métodos de extracción de ácidos nucleicos seleccionados se realizó utilizando el 1er estándar internacional de la OMS para Cytomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección o LoD) del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 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 1,21 UI/µl hasta un valor nominal de 0,0004 UI/µl y se analizó con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 en combinación con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

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 [Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)]

Conc. [UI/µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1,2100	16	16	100
0,3826	16	16	100
0,1210	16	13	81
0,0383	16	4	25
0,0121	16	2	13
0,0038	16	0	0
0,0012	16	0	0
0,0004	16	0	0

Tabla 2: Sensibilidad analítica determinada mediante análisis probit utilizando diferentes instrumentos de PCR en tiempo real

Real-time PCR Instrument	Límite de detección [95%]	Intervalo de confianza [95%]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	0,668 UI/µl	0,323 - 2,258 UI/µl
Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex	0,249 UI/µl	0,160 - 0,644 UI/µl
LightCycler® 480 Instrument II	0,238 UI/µl	0,149 - 0,624 UI/µl
Mx 3005P™ QPCR System	0,257 UI/µl	0,150 - 0,704 UI/µl
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	0,943 UI/µl	0,083 - 16,884 UI/µl
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	0,702 UI/µl	0,396 - 1,985 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 1er estándar internacional de la OMS para Cytomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162) desde 316 UI/ml hasta un valor nominal de 0,03 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 3: 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 1.0 en combinación con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Los resultados fueron determinados por análisis probit.

Tabla 4: Resultados de PCR usados para calcular la sensibilidad analítica de la muestra de plasma con EDTA [LightCycler® 480 Instrument II (Roche)]

Conc. [UI/ml]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
316,23	16	16	100
100,00	16	15	94
31,62	16	13	81
10,00	16	6	38
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0
0,10	16	0	0
0,03	16	0	0

Tabla 5: 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 %]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	92,10 UI/ml	46,94 - 288,29 UI/ml
Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex	106,29 UI/ml	51,05 - 356,08 UI/ml
LightCycler® 480 Instrument II	91,38 UI/ml	49,16 - 271,13 UI/ml
Mx 3005P™ QPCR System	85,14 UI/ml	45,09 - 256,13 UI/ml
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	116,32 UI/ml	59,67 - 357,43 UI/ml
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	264,98 UI/ml	49,54 - 2278,24 UI/ml

11.1.3 Sensibilidad analítica de las muestras de sangre total con EDTA

La sensibilidad analítica de un método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado para muestras de sangre total con EDTA se determinó utilizando una serie de dilución del 1er estándar internacional de la OMS para Cytomegalovirus para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código NIBSC: 09/162) desde 10 000 UI/ml hasta un valor nominal de 20 UI/ml en sangre total con EDTA negativo en CMV.

En tres análisis independientes, ocho alícuotas por concentración cada vez fueron sometidas a la extracción de ácidos nucleicos utilizando el VERSANT® kPCR Molecular System SP en combinación con el VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare).

Los resultados fueron determinados por análisis probit.

Tabla 6: Resultados de PCR usados para calcular la sensibilidad analítica de la muestra de EDTA sangre total [VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)]

Conc. [UI/ml]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10 000	24	24	100
3 162	24	24	100
1 500	24	24	100
1 000	24	24	100
750	24	22	92
500	24	20	83
250	24	16	67
100	24	10	42
20	22	1	5

Tabla 7: Sensibilidad analítica de las muestras de sangre total con EDTA determinado por el análisis probit usando el the VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)

Instrumento de PCR en tiempo real	Límite de detección [95 %]	Intervalo de confianza [90 %]
VERSANT® kPCR Molecular System AD	835 UI/ml	614 - 1 274 UI/ml

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® CMV 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 CMV.

Se analizaron más de 100 muestras diferentes de EDTA plasma negativas y más de treinta diferentes de sangre entera con EDTA negativo para CMV con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Ninguana 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 1.0 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros herpesvirus o de otros patógenos significativos en pacientes immunocomprometidos.

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

- Virus del herpes simple 1
- Virus del herpes simple 2
- Virus de la varicela zoster
- Virus de Epstein-Barr
- Virus del herpes humano 6A
- Virus del herpes humano 6B
- Virus del herpes humano 7
- Virus del herpes humano 8
- Parvovirus humano B19
- Virus BK
- Virus JC
- Virus simio 40
- Virus de la Hepatitis A
- Virus de la Hepatitis B
- Virus de la Hepatitis C
- Virus de la inmunodeficiencia humana 1

11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN específico de CMV (utilizando concentraciones que van de 1,21E+09 - 1,21E+00 UI/µl) utilizando los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)

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

Cada concentración se analizó en ocho repeticiones por instrumento de PCR en tiempo real. El rango lineal del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 se extiende más allá de un intervalo de al menos nueve órdenes de magnitud en todos los instrumentos de PCR en tiempo real utilizados.

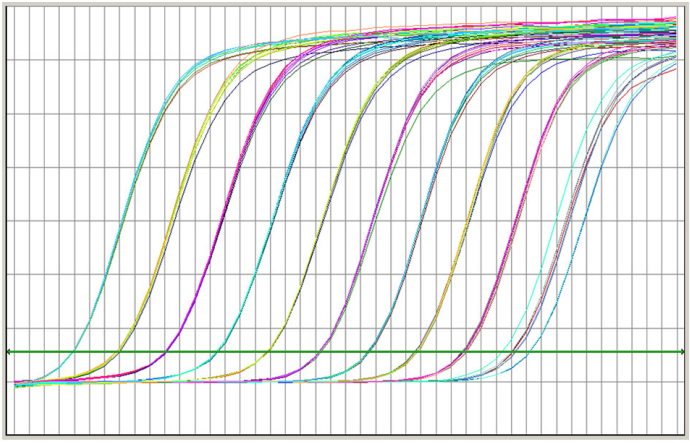
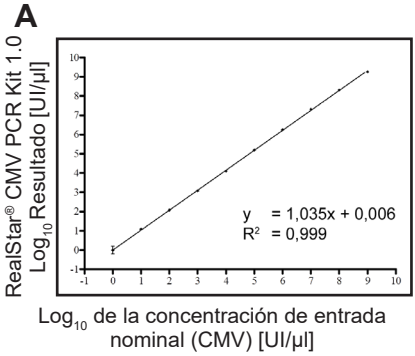
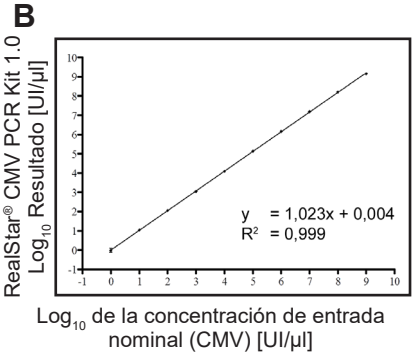


Figura 2: Curvas de amplificación en el ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)





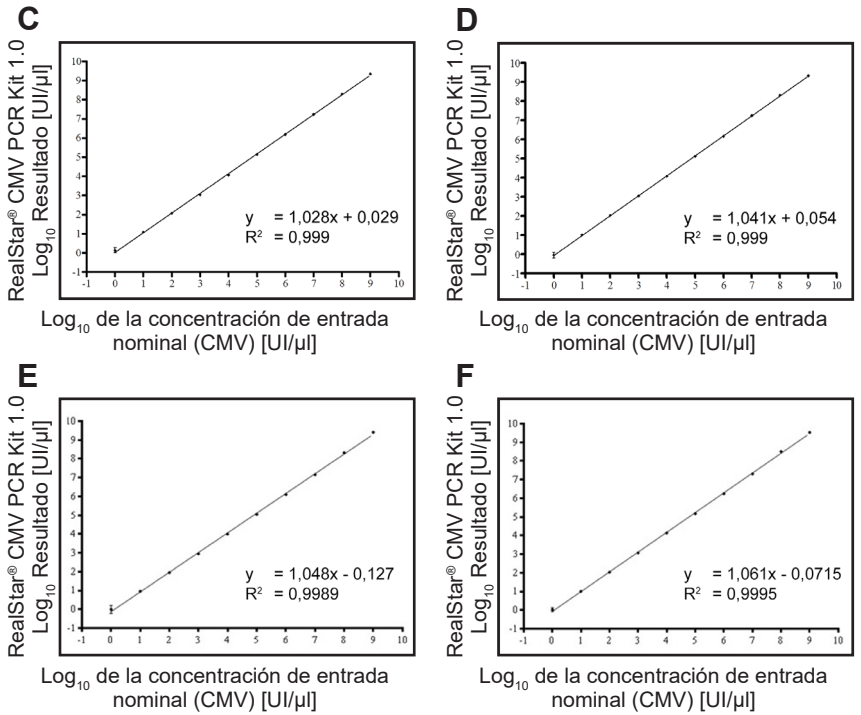


Figura 3: Regresión lineal de la serie de diluciones analizadas en ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) [**A**], el Mx 3005PTM QPCR System (Stratagene) [**B**], el LightCycler® Instrument 480 II (Roche) [**C**], el Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene™ Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) [**D**], el CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**E**] y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**F**].

11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® CMV 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.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de coeficiente de variación y variabilidad total. Los datos se basan en el análisis de cuantificación de un control de alto positivo (121 UI/µl) y en el valor del ciclo de umbral (C_t) en términos de un control de bajo positivo (1,8 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
ABI Prism® 7500 Fast SDS	4,89	1,49	0,91
LightCycler® 480 Instrument II	6,62	1,13	0,12
Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex	10,79	4,20	0,65
Mx 3005P™ QPCR System	19,77	1,22	0,60
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	5,33	1,85	1,74
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	7,28	1,59	3,36

11.5 Evaluación del diagnóstico

11.5.1 Tipo de muestra: plasma con EDTA

El RealStar® CMV PCR Kit 1.0 se evaluó en un estudio comparativo con el Abbott RealTime CMV kit de Abbott Diagnostics, con marcado CE.

124 muestras de plasma con EDTA para el análisis de CMV de rutina se trataron con el sistema de extracción de ácidos nucleicos m2000sp (Abbott Diagnostics) y se analizaron con el Abbott RealTime CMV kit, con marcado CE, en un instrumento m2000rt (Abbott Diagnostics). Los eluidos de ADN se almacenaron a -20 °C y se reanalizaron con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 en un instrumento m2000rt.

Tabla 9: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico

		RealStar® CMV PCR Kit 1.0	
		+	-
Abbott RealTime CMV	+	103	1
	-	0	20

La sensibilidad y especificidad del diagnóstico del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 comparadas con la prueba Abbott RealTime CMV fueron del 99,04 % y del 100 %, respectivamente.

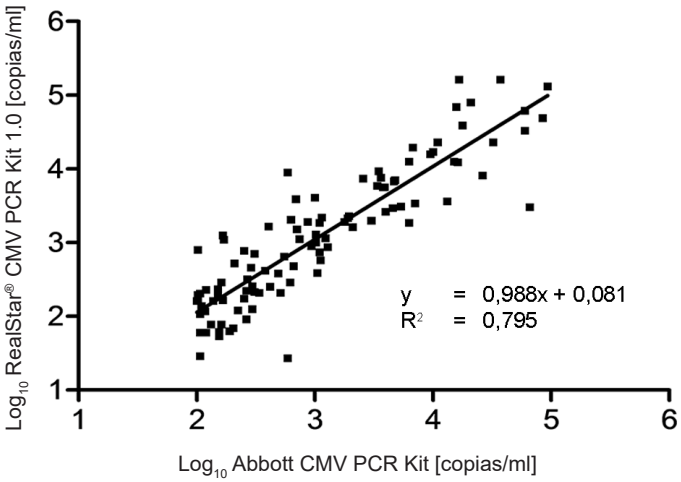


Figura 4: Correlación de los resultados de cuantificación entre el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 y la prueba Abbott RealTime CMV (n=102).

Se observó una buena correlación entre los resultados cuantitativos del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 y los del Abbott RealTime CMV kit. No se identificaron diferencias sistemáticas ni proporcionales entre los dos métodos.

11.5.2 Tipo de muestra: sangre total con EDTA

El RealStar® CMV PCR Kit 1.0 se evaluó en un estudio comparativo con el Q-CMV Real Time Complete Kit de ELITech Molecular Diagnostics, con marcado CE.

Se analizaron en paralelo 90 muestras de sangre total con EDTA positivas en CMV a partir de la monitorización rutinaria del CMV mediante el sistema de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux) con el Q-CMV Real Time Complete Kit, con marcado CE, en el sistema PCR en tiempo real ABI 7300 (Applied Biosystems) y mediante el kPCR Molecular System (Siemens) con el RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Para la correlación cuantitativa, se eliminaron del análisis todas las muestras con prueba negativa en uno de los ensayos o en ambos, así como dos valores atípicos. En los posteriores análisis se utilizaron los resultados de las 71 muestras restantes. La correlación cuantitativa de los resultados se determinó mediante el análisis de regresión de Passing-Bablok.

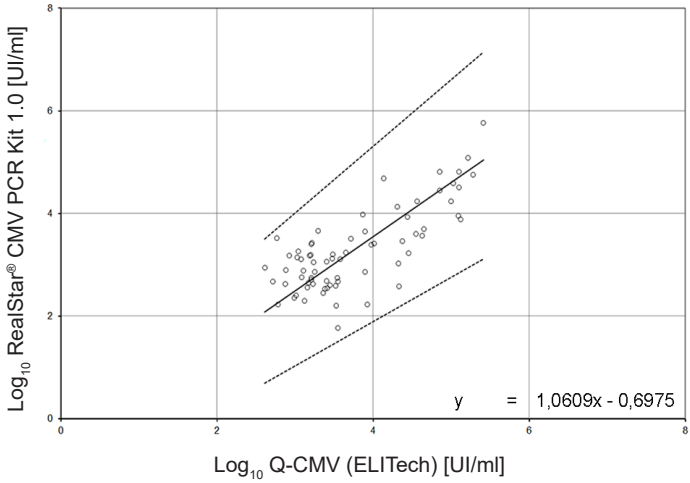


Figura 5: Correlación de los resultados de cuantificación entre el RealStar® CMV PCR Kit 1.0 y el Q-CMV Real Time Complete Kit de ELITech Molecular Diagnostics

Se observó una buena correlación entre los resultados cuantitativos del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 y los del Q-CMV Real Time Complete Kit. No se identificaron diferencias sistemáticas ni proporcionales entre los dos métodos.

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 diagnostica, los resultados del RealStar® CMV 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 EN ISO 13485 de altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® CMV 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

[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 & Willkins, 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 & Willkins, 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); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Mx 3005P™ (Stratagene); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute® (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® CMV 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.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

Símbolos	Explicación
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
LOT	Código de lote
CAP	Color del tapón
REF	Número de producto
CONT	Contenido
NUM	Número
COMP	Componente
GTIN	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:

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