

Instrucciones de uso

RealStar[®] HHV-6 PCR Kit 1.0

09/2018 ES

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	8
5.	Información general.....	9
6.	Descripción del producto.....	9
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	12
6.2	Tipos de muestras.....	12
7.	Advertencias y precauciones	13
8.	Procedimiento	14
8.1	Preparación de las muestras	14
8.2	Configuración de Master Mix	15
8.3	Configuración de reacción	17
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	18
9.1	Configuración	18
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	18
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	19
10.	Análisis de datos.....	19
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	20
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	20
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).....	21
10.2	Interpretación de los resultados	21

10.2.1	Análisis cualitativo.....	21
10.2.2	Análisis cuantitativo.....	22
11.	Evaluación de rendimiento	24
11.1	Sensibilidad analítica	24
11.2	Especificidad analítica.....	25
11.3	Rango lineal	26
11.4	Exactitud	29
11.5	Evaluación del diagnóstico.....	30
12.	Limitaciones	31
13.	Control de calidad.....	32
14.	Asistencia técnica.....	32
15.	Bibliografía	32
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	33
17.	Explicación de los símbolos	34

1. Uso indicado

El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección, diferenciación y cuantificación de ADN específico de Herpesvirus humano 6A (HHV-6A) y 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 kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 incluye estándares de cuantificación de HHV-6A y de HHV-6B en cuatro concentraciones distintas (consulte el Capítulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control Interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían 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 de la prueba de valoración. 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 (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de escritorio 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 filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (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

Herpesvirus humano 6 (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. Entre los síntomas se encuentran 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 ramba encefalitis.

6. Descripción del producto

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

La prueba incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (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.

La sonda específica para el ADN de HHV-6A se marca con el fluoróforo FAM™, mientras que las sondas específicas para ADN de HHV-6B se marcan con el fluoróforo Cy®5. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela del ADN específico de HHV-6A y HHV-6B, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de dos procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

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

El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4*
- Water (PCR grade)

* El RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 contiene estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes

Master A y Master B contienen todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación con mediación de PCR y la detección de ADN específico de HHV-6A, ADN específico de HHV-6B y del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación (QS, por sus siglas en inglés) contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico de HHV-6A y HHV-6B. El estándar de cuantificación para ADN específico de HHV-6B se calibró frente al 1er estándar internacional de la OMS para el ADN del virus del herpes humano 6B (HHV-6B) para ensayos basados en la técnica de amplificación de ácido nucleico o NAT (código NIBSC: 15/266) [1].

Para calibrar el material positivo específico de HHV-6A del kit 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 mediante un análisis paralelo con el material positivo específico del HHV-6A y el 1er estándar internacional de la OMS para el ADN del virus del herpes humano 6B (HHV-6B) (código NIBSC: 15/266). La calibración se ha confirmado mediante el kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0.

Los estándares de cuantificación se pueden utilizar de forma individual como controles positivos o juntos para generar una **curva estándar**, que se puede utilizar para determinar la concentración de ADN específico de HHV-6A o de HHV-6B en la muestra.

- [1] Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris y el 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. Informe ECBS 217 de la OMS; OMS/BS/2017.2321.

Los estándares de cuantificación tienen las siguientes concentraciones:

Cuantificación Estándar	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

Cuantificación Estándar	Concentración [UI/μl]	
	HHV-6A	HHV-6B
QS4	1,00E+01	1,00E+01

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos 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

Los siguientes tipos de muestras se han validado con el kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0:

- Plasma humano con EDTA
- Sangre entera humana

Si se aplica un procedimiento apropiado de extracción de ácido nucleico, se pueden utilizar tipos de muestras adicionales junto con el kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0. 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 lo siguiente en el producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Marcado correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se encuentra limitado al 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 seguros de laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin polvo, 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 polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas y segregadas 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 mueva 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 realizarse pruebas a controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las leyes locales, estatales o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del 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 haya vencido.
- Descarte muestras y residuos de productos conforme a las regulaciones locales de seguridad.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material de partida para el kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0.

La calidad del ADN afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología 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 ser apropiados otros sistemas y kits de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el kit 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 soluciones amortiguadoras 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 soluciones amortiguadoras 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 en 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 las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Configuración de Master Mix

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

El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 contiene un control interno (IC) 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 IC como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure el 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
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC 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 Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl de IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix (gen GPC Master Mix y gen L 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
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Configuración de reacción

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ 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 utiliza todos los controles positivos (QS) y al menos un control negativo por Master Mix y serie.

- ▶ Para la cuantificación, deben utilizarse todos los estándares de cuantificación (de QS1 a QS4) de cada uno (HHV-6A y HHV-6B).
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas 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 película 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 microtítulos durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- ▶ Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Desactivador fluorescente
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 adquisición de colorantes:

	Etapa	Ciclo Repeticiones	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Desnaturalización	Retención	1	-	95	10:00
Amplificación	Ciclos	45	-	95	0:15
			sí	58	1:00

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 detalladas sobre el análisis de los datos generados con el kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

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 [HHV-6A y HHV-6B]	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

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 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 PCR en tiempo real muestran en valor R al cuadrado (R²). Para obtener 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 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

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™	Cy ⁵	JOE™	
-	-	+	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 PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* La detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección FAM™ ni Cy⁵. Una carga alta de ADN de HHV-6A y/o de HHV-6B en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

¹ A causa de nuevas secuencias de datos, la reactividad cruzada del sistema de detección específico de HHV-6B con algunas cepas de HHV-6A no puede descartarse. Estas cepas derivarán en una señal débil en el canal de detección de HHV-6B (Cy⁵) además de la señal en el canal de detección de HHV-6A (FAM™).

10.2.2 Análisis cuantitativo

El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 incluye cuatro estándares de cuantificación (QS). Para generar una **curva estándar** para el análisis cuantitativo, se tienen que definir como **estándares** con las concentraciones adecuadas (consulte el capítulo 6. Descripción del producto). Mediante el uso de **estándares** de concentraciones conocidas, se puede generar una curva estándar para el análisis cuantitativo.

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

C_t = Ciclo de umbral
 m = Pendiente
 N_0 = Concentración inicial
 b = Intercepto

Se puede cuantificar a partir de muestras positivas con curva estándar de concentraciones desconocidas.

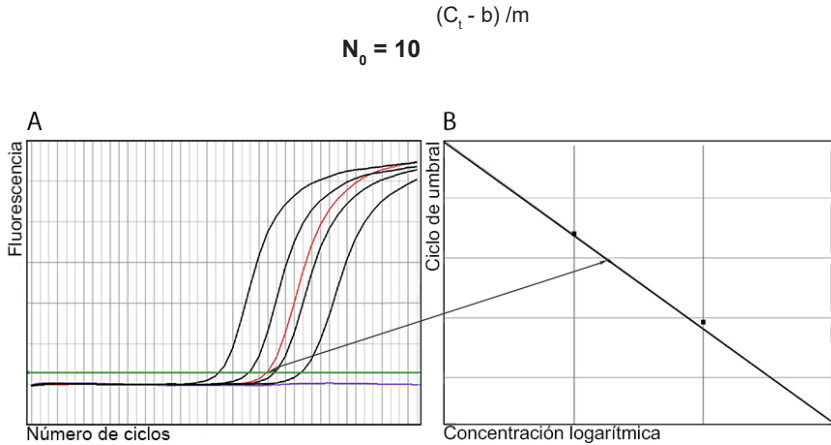


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) mostradas en el análisis de gráfico de amplificación [A] y de curva estándar [B]

NOTA



La concentración de «muestra» se indica en UI/μl y se refiere a la concentración en el eluido.

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

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

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se llevó a cabo utilizando ADN específico de HHV-6A cuantificado (cepa GS) y ADN específico de HHV-6B (cepa Z-29).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de HHV-6A o de HHV-6B que se pueden detectar con un índice de positividad del 95 %. La sensibilidad analítica se determina mediante el análisis de la serie de diluciones del ADN de HHV-6A y del ADN de HHV-6B cuantificado.

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

Concentración [copias/μl]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	30	30	100
3,162	30	30	100
1,5	30	30	100
1,000	30	28	93
0,5	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 de ADN específico de HHV-6B

Concentración [copias/μl]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,5	24	23	95
1,000	28	26	93
0,5	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 kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

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

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se garantiza mediante la selección minuciosa de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante el análisis de comparación de

secuencias con las secuencias disponibles públicamente para garantizar la detección de todos los genotipos relevantes de HHV-6A y HHV-6B.

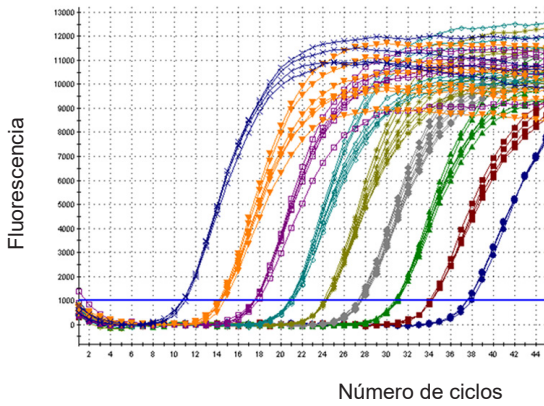
El kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus BK
- Citomegalovirus
- 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
- Herpesvirus humano 7
- Herpesvirus humano 8
- Parvovirus humano B19
- Virus JC
- Virus varicela-zóster

11.3 Rango lineal

El rango lineal del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmica de ADN específico de HHV-6A y HHV-6B, utilizando concentraciones que iban desde 1E+08 hasta 1E+00 copias/μl. Se analizaron al menos seis repeticiones por dilución

A



B

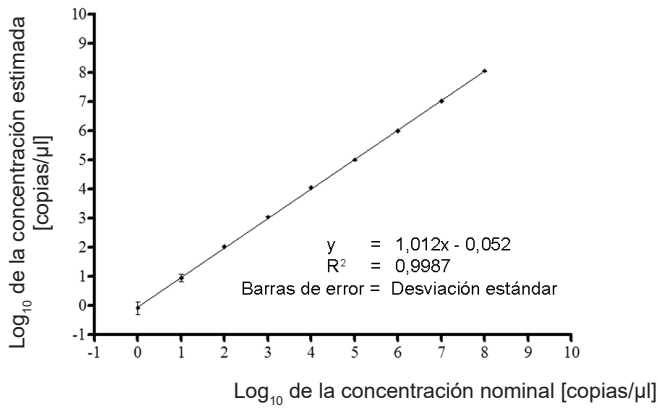


Figura 2: Curvas de amplificación **[A]** y regresión lineal **[B]** de una serie de diluciones analizada de ADN específico de HHV-6A

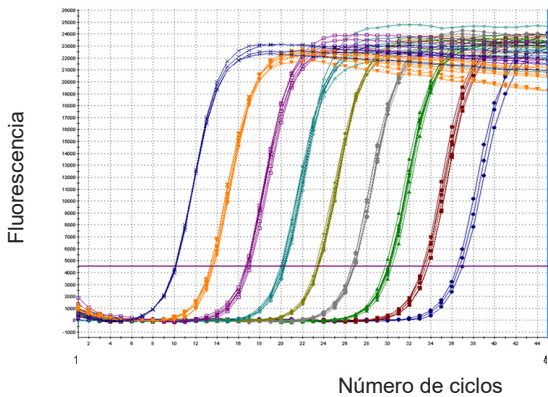
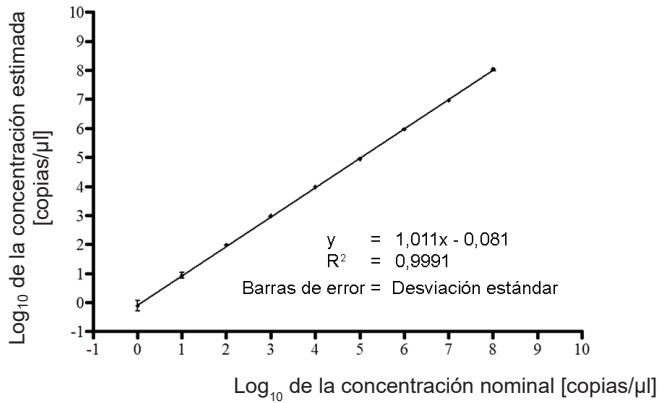
A**B**

Figura 3: Curvas de amplificación **[A]** y regresión lineal **[B]** de una serie de diluciones analizada de ADN específico de HHV-6B

El rango lineal del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 para el ADN específico de HHV-6A y HHV-6B va más allá de un intervalo de, al menos, **ocho** órdenes de magnitud.

11.4 Exactitud

La precisión para el kit 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.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. Los datos se basan en análisis de cuantificación de concentraciones definidas de ADN específico de HHV-6A y HHV-6B y en el valor del ciclo de umbral (C_t) en términos de Internal Control (control interno). Se analizaron al menos seis repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

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

HHV-6A y HHV-6B		Concentración promedio [copias/ μ l]	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	HHV-6A	133,00	9,70	5,21
	HHV-6B	160,88	10,34	4,19
Variabilidad interensayo	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 Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral promedio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	27,80	0,05	0,10
Variabilidad interensayo	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 diagnóstica y la especificidad del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se evalúa periódicamente analizando muestras de referencia y diagnóstico previamente analizadas con métodos de referencia.

Tabla 5: Resultados de la evaluación de la sensibilidad diagnóstica y la especificidad del kit 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 especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo 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 este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una baja cuantificación, falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del HHV-6A y del HHV-6B cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una baja cuantificación o fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier test diagnóstico, los resultados del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- A causa de nuevas secuencias de datos, la reactividad cruzada del sistema de detección específico de HHV-6B con algunas cepas de HHV-6A no puede descartarse. Dichas cepas darán como resultado una débil señal en el canal de detección de HHV-6B (Cy^{®5}), además de la señal en el canal de detección de HHV-6A (FAM[™]).

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte 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 y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.^a edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

16. Marcas comerciales y aviso 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 kit 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 de Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© altona Diagnostics GmbH 2018; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	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:

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

