

Instrucciones de uso

RealStar[®] HSV PCR Kit 1.0

06/2017 ES

RealStar®

HSV 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)



061013



96



06 2017



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

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	6
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5.	Información general.....	8
6.	Descripción del producto.....	8
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
6.2	Tipos de muestras.....	11
7.	Advertencias y precauciones	11
8.	Procedimiento	13
8.1	Preparación de las muestras	13
8.2	Preparación de la Master Mix	14
8.3	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	22
11.1	Sensibilidad analítica	23
11.2	Especificidad analítica.....	24
11.3	Rango lineal	25
11.4	Precisión	28
12.	Limitaciones	29
13.	Control de calidad.....	30
14.	Servicio técnico.....	30
15.	Bibliografía	30
16.	Marcas comerciales e información legal	31
17.	Explicación de los símbolos	32

1. Uso indicado

El RealStar® HSV PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación simultáneas del ADN específico de Virus del herpes simple 1 (VHS-1) e Virus del herpes simple 2 (VHS-2).

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	HSV-1 QS1-4*	4	250
Naranja	HSV-2 QS1-4*	4	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

* El RealStar® HSV PCR Kit 1.0 contiene VHS-1 y VHS-2 estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes (ver capítulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® HSV 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 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)
- Appropriate nucleic acid extraction system or kit (see chapter 8.1 Sample Preparation)
- 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.



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 *virus del herpes simple 1* (VHS-1) y el *virus del herpes simple 2* (VHS-2) pertenecen a la familia *Herpesviridae* y, junto con el *virus varicela-zóster* (VVZ), se clasifican como *alphaherpesviridae*. El VHS-1 y el VHS-2 tienen un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 150 kpb. El VHS-1 y el VHS-2 comparten más del 80 % de la identidad nucleótida dentro de su región de codificación de proteínas.

Las infecciones por el virus herpes simple se producen en todo el mundo, sin distribución estacional. El virus se transmite por contacto directo con el virus presente en secreciones. La prevalencia de la infección por VHS-1 aumenta gradualmente desde la niñez, llegando al 80 % o más en años posteriores, mientras que la seroprevalencia de VHS-2 permanece baja hasta la adolescencia. Casi todas las infecciones primarias por VHS-1 se adquieren como infecciones subclínicas o no reconocidas. Las infecciones primarias por VHS-2 se presentan clásicamente en forma de herpes genital. La infección primaria por VHS-1 o VHS-2 va seguida del establecimiento de la latencia en los ganglios de la raíz dorsal. Periódicamente, el virus se reactiva y viaja por el axón del nervio a zonas orales o genitales, provocando la liberación del virus infeccioso y, en algunos casos, la formación de lesiones. Aunque suelen ser asintomáticas, las infecciones por VHS pueden provocar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, como herpes oral, herpes genital, herpes neonatal, encefalitis y herpes ocular.

6. Descripción del producto

El RealStar® HSV PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación simultáneas del ADN específico de Virus del herpes simple 1 (VHS-1) e Virus del herpes simple 2 (VHS-2).

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 VHS-1 están marcadas con el fluorocromo FAM™, mientras que las sondas específicas para el ADN de VHS-2 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 VHS-1 y VHS-2, 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® HSV PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno (IC)
- Dos conjuntos estándares de cuantificación
 - Cuatro VHS-1 (QS1-QS4)
 - Cuatro VHS-2 (QS1-QS4)
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación mediante la PCR y la detección del ADN específico de VHS-1, ADN específico de VHS-2, y el Control interno en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico de VHS-1 y VHS-2. 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 VHS-1 y/o de ADN específico de VHS-2 en una muestra.

Los estándares de cuantificación tienen las siguientes concentraciones:

Estándar Cuantificación	Concentración [copias/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® HSV 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 HSV PCR Kit 1.0 de RealStar®:

- Plasma EDTA humano
- Frotis con bastoncillos de lesión cutánea y mucocutánea humana
- Fluido cerebroespinal humano

Si se aplica un procedimiento adecuado de extracción de ácido nucleico, pueden utilizarse tipos de muestras adicionales junto con el HSV 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 (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 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material inicial para el RealStar® HSV 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® HSV 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.



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® HSV 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
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.

8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 20 μ l 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 μ l de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 μ l de los controles (estándar de cuantificación, control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 μ l
Muestra o control	10 μ l
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 de cada uno (VHS-1 y VHS-2) (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

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® HSV 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:

Settings	
Volumen de reacción	30 µl
Ramp Rate	Default
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ADN específico de VHS-1	VHS-1	FAM™	(Ninguno)
ADN específico de VHS-2	VHS-2	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 Repeticiones	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® HSV 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 VHS-1	+	-	+/-*
Control positivo VHS-2	-	+	+/-*
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 (R²). 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™	
+	-	+*	Se ha detectado ADN específico de VHS-1
-	+	+*	Se ha detectado ADN específico de VHS-2
-	-	+	No se ha detectado ADN específico de VHS-1 ni de VHS-2. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de VHS-1 ni de VHS-2.
-	-	-	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 VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® HSV PCR Kit 1.0 incluye cuatro estándares de cuantificación (QS) de VHS-1 y cuatro de VHS-2. 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.

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

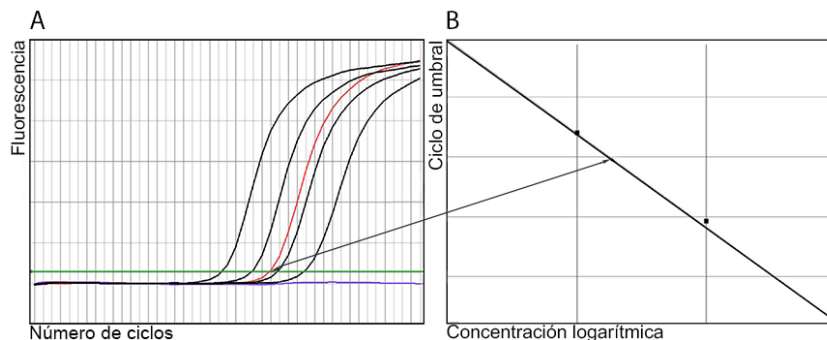


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [A] y un análisis de curva estándar [B]

NOTA



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

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

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

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 se realizó utilizando ADN cuantificado VHS-1 (número ATCC®: VR-1493) and VHS-2 specific ADN (número ATCC®: VR-540).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de VHS-1 o VHS-2 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 VHS-1 y de ADN de VHS-2..

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

Conc. de entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3.162	12	12	100
1.000	12	12	100
0.316	12	11	92
0.100	12	9	75
0.032	12	6	50
0.010	12	2	17
0.003	12	0	0
0.001	12	0	0

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

Conc. de entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3.162	18	18	100
1.000	18	18	100
0.316	18	11	61
0.100	18	7	39
0.032	18	3	17
0.010	18	1	6
0.003	18	0	0
0.001	18	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de VHS-1, la sensibilidad analítica es de 0.33 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0.16 – 1.3 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de VHS-2, la sensibilidad analítica es de 1.2 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0.7 – 3.5 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® HSV 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 VHS-1 y VHS-2.

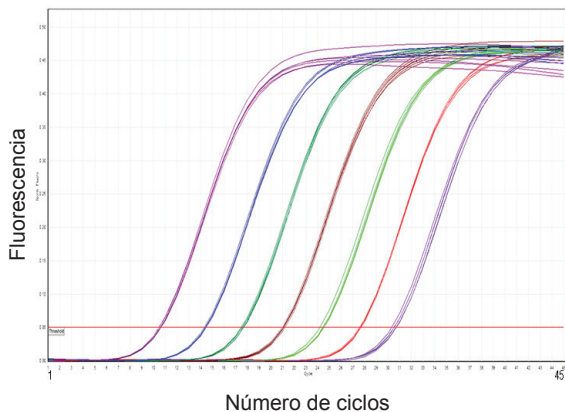
El RealStar® HSV PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus BK
- Cytomegalovirus
- Virus de Epstein-Barr (VEB)
- Virus de la hepatitis B (VHB)
- Virus de la hepatitis C (VHC)
- Herpesvirus humano 6A
- Herpesvirus humano 6B
- Herpesvirus humano 7
- Herpesvirus humano 8
- Human immunodeficiency virus 1
- Virus JC
- Virus varicela-zóster

11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN específico de VHS-1 y VHS-2, utilizando concentraciones que oscilan entre $1E+07$ - $1E+00$ copias/ μ l (VHS-1) y entre $1E+06$ to $1E+00$ copias/ μ l (VHS-2). Se analizaron al menos seis replicados por dilución.

A



B

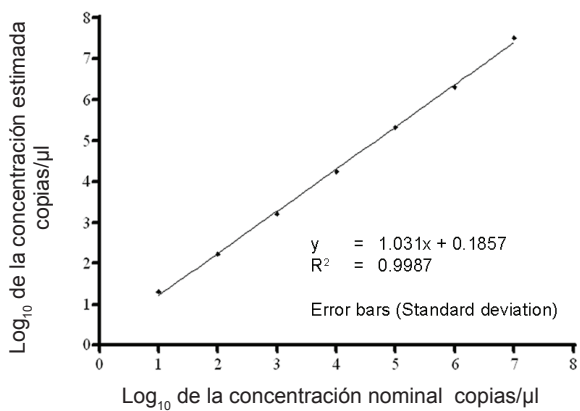


Figura 2: Curvas de amplificación [A] y regresión lineal [B] de una serie de diluciones analizadas de ADN específico de VHS-1

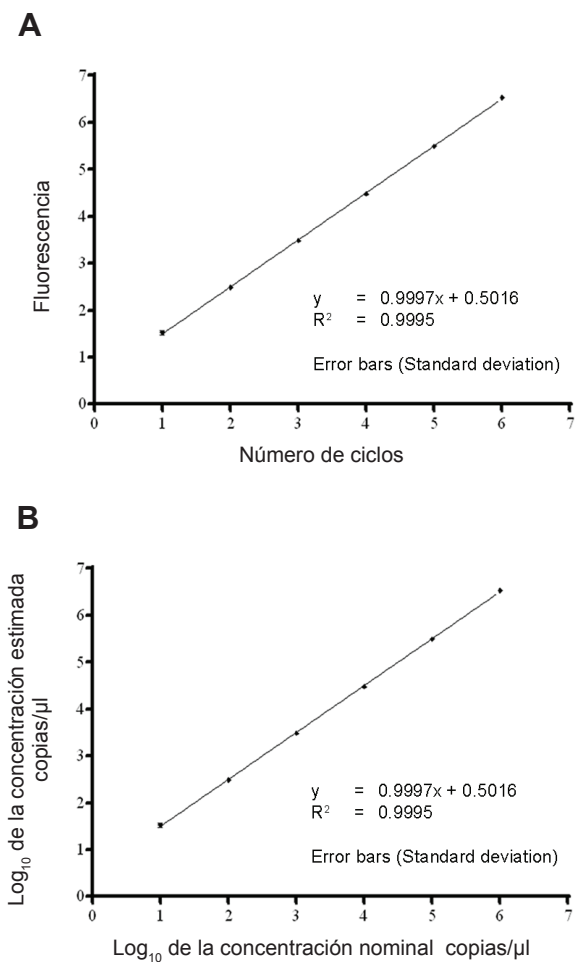


Figura 3: Amplification curves [A] and linear regression [B] of an analysed dilution series of VHS-2 specific ADN

El rango lineal del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 para ADN específico de VHS-1 se extiende más allá de un intervalo de al menos **seite** órdenes de magnitud y para ADN específico de VHS-2, más allá de un intervalo de al menos **seis** órdenes de magnitud.

11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® HSV 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 el análisis de cuantificación de concentraciones definidas de ADN específico de VHS-1 y VHS-2 y en valores del ciclo de umbral de (C_T) en términos del Control interno. Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote

Tabla 3: Precision data for the detection of VHS-1 and VHS-2 specific ADN

VHS-1 and VHS-2		Concentração Média [copias/ μ l]	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	VHS-1	91.00	5.30	5.90
	VHS-2	108.00	5.90	5.50
Variabilidad intertest	VHS-1	94.20	5.30	5.70
	VHS-2	99.20	9.40	9.40
Variabilidad interlote	VHS-1	90.30	5.10	5.60
	VHS-2	102.50	9.50	9.30
Variabilidad total	VHS-1	92.70	5.50	6.00
	VHS-2	99.60	9.00	9.10

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

Control interno	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	24.00	0.10	0.43
Variabilidad intertest	23.80	0.30	1.27
Variabilidad interlote	24.00	0.14	0.59
Variabilidad total	23.90	0.25	1.03

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 VHS-1y VHS-2 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® HSV 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® HSV 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® HSV 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.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

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

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

