

Instrucciones de uso

RealStar[®] *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0

01/2017 ES

RealStar®

alpha Herpesvirus 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)



081013



96



01 2017



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

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.....	10
7. Advertencias y precauciones	11
8. Procedimiento	12
8.1 Preparación de las muestras	12
8.2 Preparación de la Master Mix	13
8.3 Preparación de la reacción	15
9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....	16
9.1 Configuración	16
9.2 Detectores de fluorescencia	16
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	17
10. Análisis de datos.....	17
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas	20
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas	21
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas	21
10.2 Interpretación de los resultados	22
10.2.1 Análisis cualitativo.....	22

11. Evaluación de rendimiento	23
11.1 Sensibilidad analítica	23
11.2 Especificidad analítica.....	25
11.3 Precisión	26
12. Limitaciones	27
13. Control de calidad.....	28
14. Servicio técnico.....	28
15. Bibliografía	29
16. Marcas comerciales e información legal	29
17. Explicación de los símbolos	30

1. Uso indicado

El RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y diferenciación del ADN específico de virus del herpes simple 1 (VHS-1), virus del herpes simple 2 (VHS-2) y virus varicela-zóster (VVZ).

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen[μ l/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control VZV	1	250
Amarillo	Positive Control HSV-1	1	250
Naranja	Positive Control HSV-2	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® *alpha* Herpesvirus 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)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados
- 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

La familia *Herpesviridae* (sinónimo: herpesvirus) es una gran familia de virus de ADN que provocan enfermedades en animales, incluidos los humanos. Todos los *herpesviridae* constan de genomas de ADN bicatenarios lineales relativamente grandes. Los *herpesviridae* son de replicación nuclear: la replicación del ADN viral y la transcripción de genes virales se producen dentro del núcleo de las células infectadas. Conforme a las diferencias en la patogenicidad, las células huéspedes y las características de replicación, los *herpesviridae* se subdividen en tres grupos: *alphaherpesviridae*, *betaherpesviridae* y *gammaherpesviridae*. Los *alphaherpesviridae* (alfaherpesvirus) se caracterizan por ciclos reproductivos cortos, una rápida destrucción de las células huéspedes y la capacidad de replicar en gran variedad de tejidos huéspedes. Una característica fundamental de estos virus es la capacidad de establecer una infección latente vitalicia en el sistema nervioso periférico de sus huéspedes. Los virus humanos patogénicos *herpes simple 1* (VHS-1), *herpes simple 2* (VHS-2), y *varicela-zóster* (VVZ) pertenecen a los alfa herpesvirus.

6. Descripción del producto

El RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y diferenciación del ADN específico de virus del herpes simple 1 (VHS-1), virus del herpes simple 2 (VHS-2) y virus varicela-zóster (VVZ). 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 ADN de VHS-1 están marcadas con el fluorocromo ROX™, las sondas específicas para el ADN de VHS-2 se marcan con un fluoróforo Cy®5 y las sondas específicas para el ADN de VVZ están marcadas con el fluorocromo FAM™. 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 del VHS-1, VHS-2 y VVZ, así como del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de tres 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® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Tres Controles positivos:
 - Control positivo VHS-1
 - Control positivo VHS-2
 - Control positivo VVZ
- 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, el ADN específico de VHS-2, el ADN específico de VVZ, y el Control interno en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® *alpha* Herpesvirus 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)

6.2 Tipos de muestras

Se han validado los siguientes tipos de muestras con el *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 de RealStar®:

- 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 *alpha* Herpesvirus 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 está 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 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 traslade 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® *alpha* Herpesvirus 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)
- QIAasymphony® (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® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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	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 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 del control (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que se utilicen cada control positivo y al menos uno negativo por serie.
- ▶ 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® alpha Herpesvirus 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:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ADN específico de VHS-1	VHS-1	ROX™	(Ninguno)
ADN específico de VHS-2	VHS-2	Cy®5	(Ninguno)
ADN específico de VVZ	VVZ	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:

	Fase	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Retención	1	-	95	10:00
Amplificación	Ciclo	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 sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® alpha Herpesvirus 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).

Análisis de datos utilizando el ABI Prism® 7500 SDS o 7500 Fast SDS (Applied Biosystems), el m2000rt (Abbott Diagnostics), el VERSANT® kPCR System (Siemens Healthcare) o el Mx3005P™ QPCR System (Stratagene):

Utilizando uno de estos sistemas de PCR en tiempo real, no habrá diafonía entre los diferentes canales de detección si se ha instalado una calibración válida de los colorantes puros (archivo de componentes de espectros puros) y el fondo (archivo de componentes de fondo). Por tanto, se mostrará una señal específica de ADN de **VVZ** únicamente en el canal de detección FAM™, se mostrará una señal específica de ADN de **VHS-1** únicamente en el canal de detección ROX™, se mostrará una señal específica de ADN de **VHS-2** únicamente en el canal de detección Cy®5 y las señales de Control interno se mostrarán únicamente en el canal de detección JOE™ (ver Figura 1).

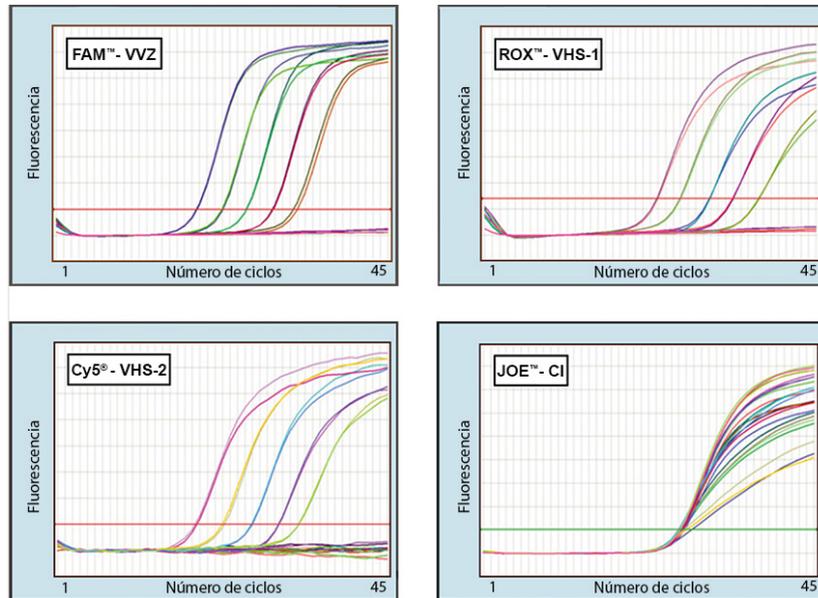


Figura 1: Series de dilución de ADN específico de VVZ, VHS-1 y VHS-2 que van de 1 copia/μl a 1,00E+04 copias/μl. Las muestras se analizaron utilizando el *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 de RealStar® en un ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). Las muestras positivas de ADN de VVZ generan señales en el canal de detección FAM™, las muestras positivas de ADN de VHS-1 generan señales en el canal de detección ROX™ y las muestras positivas de ADN de VHS-2 generan señales en el canal de detección Cy®5. El Control interno genera señales en el canal de detección JOE™.

Análisis de datos utilizando el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN):

Al utilizar el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN), podría haber una ligera diafonía entre el canal de detección naranja (ROX™) y el rojo (Cy®5). Por tanto, se mostrará una señal específica de ADN de VVZ en el canal de detección verde (FAM™), se mostrará una señal específica de ADN de VHS-2 en el canal de detección rojo (Cy®5) y se mostrarán señales específicas de Control interno en el canal de detección amarillo (JOE™) (ver Figura 2). Pero una señal específica de ADN de VHS-1 podría no solo mostrarse en el canal de detección naranja (ROX™), sino producir también una señal más débil de diafonía en el canal de detección rojo (Cy®5). Esta señal de diafonía siempre será más débil (una fluorescencia más baja) que una señal producida por una muestra específica de ADN de VHS-2. Por lo tanto, le recomendamos encarecidamente que analice las muestras comparándolas con los controles positivos de VVZ, VHS-1 y VHS-2 (ver Figura 2). Si tiene alguna pregunta sobre el análisis de datos en un Rotor-Gene Instrument, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico.

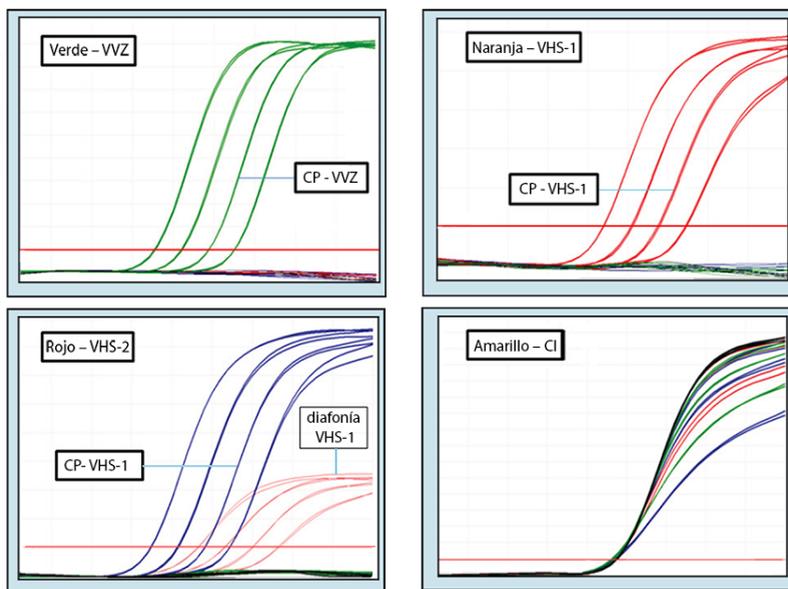


Figura 2: Series de dilución de ADN específico de VVZ, VHS-1 y VHS-2, que van de 10 copias/μl a 1,00E+04 copias/μl. Las muestras se analizaron utilizando el RealStar®alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 en un Rotor-Gene® 6000 Instrument (Corbett-Research). Las muestras positivas de ADN de VVZ generan señales únicamente en el canal de detección verde (FAM™), las muestras positivas de ADN de VHS-2 generan señales únicamente en el canal de detección rojo (Cy®5) y el Control interno genera señales únicamente en el canal de detección amarillo (JOE™). Las muestras positivas de ADN de VHS-1 podrían generar señales no solo en el canal de detección naranja (ROX™), sino también señales más débiles de diafonía en el canal de detección rojo (Cy®5). Estas señales de diafonía siempre serán más débiles (una fluorescencia más baja) que una señal producida por una muestra específica de ADN de VHS-2.

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Para que una serie de pruebas diagnósticas sea **válida**, deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección			
	ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™
Control positivo VHS-1	+	- ¹	-	+/-*
Control positivo VHS-2	-	+	-	+/-*
Control positivo VVZ	-	-	+	+/-*
Control negativo	-	-	-	+

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

¹ Pueden mostrarse señales de diafonía en el canal de detección rojo (Cy®5) si se utilizan un Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o un Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas 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.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección				Interpretación del resultado
ROX™	Cy [®] 5	FAM™	JOE™	
+	- ¹	-	+*	Se ha detectado ADN específico de VHS-1.
-	+	-	+*	Se ha detectado ADN específico de VHS-2.
-	-	+	+*	Se ha detectado ADN específico de VVZ.
-	-	-	+	No se ha detectado ADN específico de VHS-1, de VHS-2 ni de VVZ. La muestra no contiene cantidades detectables de estos ADN específicos.
-	-	-	-	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 ROX™, en el canal de detección Cy[®]5 o en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ADN en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

¹ Pueden mostrarse señales de diafonía en el canal de detección rojo (Cy[®]5) si se utilizan un Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o un Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 se realizó utilizando ADN específico de VVZ (cepa de VVZ ELLEN; número ATCC®: VR-1367) y ADN específico de VHS-1 (número ATCC®: VR-1493) y ADN específico de VHS-2 (número ATCC®: VR-540).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias por µl del eluido) de moléculas de ADN específico de VVZ o VHS-1 o VHS-2 que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de ADN cuantificado de VVZ, VHS-1 y 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. [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	8	67
0,032	12	2	17
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. [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10,000	12	12	100
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	10	83
0,100	12	3	25
0,032	12	1	8
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0

Tabla 3: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ADN de VVZ

Conc. [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,162	17	17	100
1,000	18	18	100
0,316	18	18	100
0,100	18	17	94
0,032	18	7	39
0,010	18	6	33
0,003	18	1	6
0,001	12	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de VVZ, la sensibilidad analítica es de 0,2 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,1 - 1,5 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de VHS-1, la sensibilidad analítica es de 0,46 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,23 - 1,8 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de VHS-2, la sensibilidad analítica es de 1,00 copia/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,5 - 4,1 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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, VHS-2 and VVZ.

La especificidad analítica del RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros herpesvirus o de otros patógenos significativos en pacientes inmunocomprometidos.

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

- Virus BK
- Citomegalovirus
- Virus de Epstein-Barr
- Virus JC
- Herpesvirus humano 6A
- Herpesvirus humano 6B
- Herpesvirus humano 7
- Herpesvirus humano 8
- Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- Parvovirus humano B19
- Virus de la hepatitis B
- Virus de la hepatitis C

11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® alpha Herpesvirus 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, VHS-2 y VVZ, 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 4: Datos de precisión para la detección específica del ADN de VHS-1

VHS-1	Conc. media (copias/μl)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	96,0	4,7	4,9
Variabilidad intertest	96,2	5,8	6,0
Variabilidad interlote	96,0	4,8	5,0
Variabilidad total	96,1	5,5	5,7

Tabla 5: Datos de precisión para la detección específica del ADN de VHS-2

VHS-2	Conc. media (copias/μl)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	91,5	7,3	7,9
Variabilidad intertest	95,3	7,8	8,2
Variabilidad interlote	89,9	8,2	9,1
Variabilidad total	92,9	8,7	9,4

Tabla 6: Datos de precisión para la detección específica del ADN de VVZ

VVZ	Conc. media (copias/μl)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	86,3	4,0	4,6
Variabilidad intertest	92,8	8,2	8,9
Variabilidad interlote	89,4	4,2	4,7
Variabilidad total	92,6	6,8	7,3

Tabla 7: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio (C_t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	24,55	0,02	0,10
Variabilidad intertest	24,55	0,05	0,19
Variabilidad interlote	24,58	0,06	0,24
Variabilidad total	24,57	0,06	0,23

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 falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de VVZ, VHS-1 o VHS-2 cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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 y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.ª edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G. and Steven M. Opal. Infectious Diseases, tercera edición. 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); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIA Symphony® (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® *alpha* Herpesvirus 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

	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Batch code
	Cap color
	Product number
	Content
	Number
	Component
	Global trade identification number
	Consult instructions for use
	Contains sufficient for “n” tests/reactions (rxns)
	Temperature limit
	Use-by date
	Manufacturer
	Caution
	Note
	Version

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

