

Instrucciones de uso

RealStar[®] EBV PCR Kit 2.0

03/2019 ES

RealStar[®]

EBV PCR Kit 2.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
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)



132013



96



03 2019



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.....	9
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	11
7.	Advertencias y precauciones	11
8.	Procedimiento	13
8.1	Preparación de las muestras	13
8.2	Configuración de Master Mix	14
8.3	Configuración de reacción	16
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	17
9.1	Configuración.....	17
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	17
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	17
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	22
11.2	Especificidad analítica.....	23
11.3	Rango lineal	24
11.4	Exactitud	25
12.	Limitaciones	26
13.	Control de calidad.....	27
14.	Asistencia técnica.....	27
15.	Bibliografía	27
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	28
17.	Explicación de los símbolos	29

1. Uso indicado

El kit RealStar® EBV PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la cuantificación de ADN específico de Virus de Epstein-Barr (VEB).

2. Componentes del kit

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

* El RealStar® EBV PCR Kit 2.0 contiene estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes (ver capítulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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

El virus de Epstein-Barr (VEB, HHV-4) es un virus omnipresente del ser humano *de la familia* de los Herpesvirus. Forma parte de la subfamilia *de los Gammaherpesvirinae* Y pertenece al género *Linfocriptovirus*. [1, 2] El genoma del virión maduro consiste en un ADN lineal de doble cadena con aproximadamente 170 kbp que se conoce por presentarse en forma circular y episomática cuando las células se están infectando de manera latente. [3, 4]

La transmisión se produce principalmente en la zona amigdalina, pero también puede ocurrir mediante transfusión de sangre, o trasplante de un órgano o tejido, hecho que conlleva una infección del huésped permanente. [4, 5] En caso de contraer la infección durante la niñez, esta no suele presentar síntomas. Sin embargo, en la adolescencia puede derivar en enfermedades, como por ejemplo, mononucleosis infecciosa (MI). Los síntomas que suelen presentar estos pacientes son edema de párpado o hinchazón facial, además de que pueden desarrollar hepatitis. En algunos casos aislados, la infección aguda puede evolucionar en una infección de VEB crónicamente activa con un índice alto de morbilidad y mortalidad. [4]

A causa de su potencial oncogénico, el VEB se asocia con varios tipos de cáncer, incluidos los linfomas de Hodkin y no Hodkin, y el linfoma de no Burkitt. Las infecciones con VEB implican un alto riesgo de receptores de trasplante negativos frente al VEB, ya que podrían desarrollar una enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELP). [5]

Las pruebas serológicas siguen siendo un método muy utilizado para la detección del VEB en pacientes inmunocompetentes, aunque manifiesta un grado elevado de variabilidad. [6] Este método no suele ser apto para pacientes inmunodeprimidos, como los receptores de trasplante, ya que para ellos se requiere una supervisión continua de la carga viral. En su lugar, se aplica PCR en tiempo real, dado que se trata de un método específico preciso y altamente sensible. [5]

[1] Young LS (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogén 22: 5108-5121

- [2] Davison AJ (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143: 52-69.
- [3] Niedobitek G, Meru N, Delecluse H-J (2001). Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J ExpPathol*. 82: 149-170.
- [4] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH (2011). Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. *ClinMicrobiolRev*. 24: 193-209.
- [5] Gequelin LCF, Riediger IN, Nakatani SM, Biondo AW, Bonfirm CM (2011). Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. *RevBrasHematolHemoter*. 33: 383-388.
- [6] Hess RD (2004). Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J ClinMicrobiol*. 42: 3381-3387.

6. Descripción del producto

El kit RealStar® EBV PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la cuantificación de ADN específico de Virus de Epstein-Barr (VEB).

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 VEB se marcan con el fluoróforo FAM™. 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 VEB y el 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® EBV PCR Kit 2.0 se compone de:

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

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 VEB y del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ADN específico de VEB. Estos estándares de cuantificación se calibraron según el primer estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud en relación con el virus Epstein-Barr para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NASBA) (código NIBSC: 09/260). Los estándares de cuantificación pueden utilizarse de forma individual como controles positivos, o de forma conjunta para generar una **curva estándar** que pueda servir para determinar la concentración de ADN específico de VEB en una muestra.

Los estándares de cuantificación contienen las siguientes concentraciones:

Concentración de estándar	de cuantificación [UI/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

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 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 inicial para el RealStar® EBV PCR Kit 2.0.

La calidad del ADN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento de todo el sistema de pruebas. Se recomienda garantizar que el sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos 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® EBV PCR Kit 2.0 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 RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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
Control interno (IC)	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 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

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica adecuada de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica adecuado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (estándar de cuantificación, control positivo o negativo).

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

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo (CP) y uno negativo por serie.
- ▶ Para la cuantificación, deben utilizarse todos los estándares de cuantificación (de QS1 a QS4).
- ▶ 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 centrifuga 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® EBV PCR Kit 2.0 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 de detector	Reporter	Quencher
ADN específico de VEB	VEB	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 detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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™	JOE™
Control positivo (CP)	+	+/-*
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 (R^2). 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™	JOE™	
+	+*	ADN específico de VEB
-	+	No se ha detectado ADN específico de VEB. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de VEB.
-	-	Fallo de reactivo o inhibición de PCR. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas 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™. Una carga alta

de ADN de VEB en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

10.2.2 Análisis cuantitativo

El kit RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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.

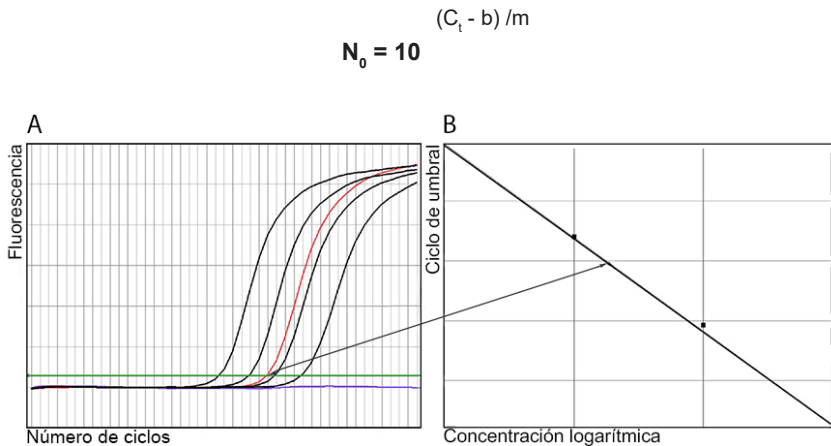


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) mostradas en el análisis de gráfico de amplificación [A] y de curva estándar [B]

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:

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

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se realizó mediante ADN extraído del primer estándar internacional de la OMS en relación con el virus Epstein-Barr para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NASBA) (código NIBSC: 09/260).

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se define como la concentración (UI/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de VEB que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de ADN de VEB cuantificado.

Tabla 1: Los resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de VEB.

Conc. entrada [UI/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,6000	24	24	100
10,0000	24	24	100

Conc. entrada [UI/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,1600	24	24	100
1,0000	24	20	83,3
0,3160	24	10	41,7
0,1000	24	1	4,2
0,0100	24	0	0
0,0010	24	0	0
0,0001	24	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de VEB, la sensibilidad analítica es de 1,59 UI/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 1,04 - 3,37 UI/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de patógenos relacionados con el VEB que es probable que estén presentes en la misma matriz de la muestra o que causen síntomas similares a los de la infección con VEB.

El RealStar® EBV PCR Kit 2.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Adenovirus
- Virus BK
- Citomegalovirus
- 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 6A
- Herpesvirus humano 6B
- Virus de inmunodeficiencia humano 1

- Virus JC
- Virus de la varicela-zóster
- Parvovirus B19

11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se evaluó mediante el análisis de series de dilución de ADN específico de VEB utilizando concentraciones que oscilaran entre 1,00E+08 UI/μl y 5,00E+00 UI/μl. Se analizaron, al menos, cuatro replicados por dilución.

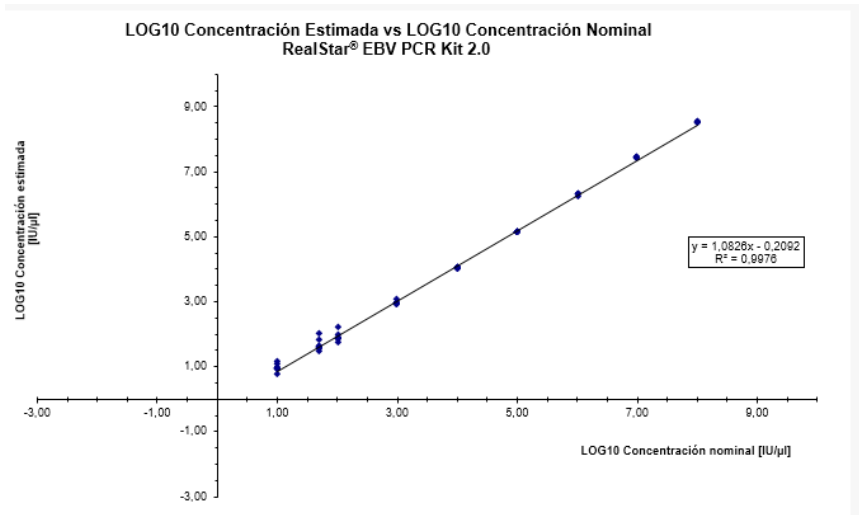


Figura 2: Regresión lineal de las series de dilución analizadas del ADN específico de VEB.

El rango lineal del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 se determinó en un rango de 1,00E+08 UI/μl a 1,00E+01 UI/μl.

11.4 Exactitud

La precisión para el RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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 VEB (log₁₀ transformado) y en el valor de ciclo de umbral (C_t) en términos del Internal Control (control interno). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 2: Datos de precisión para la detección de ADN específico de VEB.

VEB	Conc. promedio log ₁₀ [UI/μl]	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	1,88	0,04	2,30
Variabilidad intertest	1,80	0,09	5,21
Variabilidad interlote	1,82	0,07	3,92
Variabilidad total	1,78	0,08	4,44

Tabla 3: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	27,12	0,12	0,44
Variabilidad intertest	27,04	0,13	0,47
Variabilidad interlote	26,89	0,09	0,33
Variabilidad total	26,97	0,15	0,55

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- 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*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta prueba de valoración 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 prueba de valoración 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 PCR (p. ej., heparina) puede provocar subcuantificación, falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de VEB cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar subcuantificación o fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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 EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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 RealStar® EBV PCR Kit 2.0 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 2019; 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:

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

