

HSV2 DNA QUANTITATION (QT)



PCR en tiempo real para la cuantificación del genoma de VHS2

4BShopLab

ADN DE VHS2

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

El equipo de PCR en tiempo real para **cuantificación de ADN de VHS2**, con código **HSV2DNAQT.CE**, ha sido desarrollado para la detección cuantitativa de ADN del virus del herpes simple 2 humano en plasma humano y CSF (fluido cerebroespinal) con un control simultáneo de la reacción de extracción/amplificación a través de un **Control Interno (IC)**.

El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time y ABI 7500 Sequence Detection System® (software SDS, versión 1.3.1, Applied Biosystems™*), MX3000P (software MxPro, versión 4.01, Stratagene™***) o CFX96 (Software CFX manager versión 1.7, Biorad™**).

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.

** Biorad es una marca comercial registrada.

***Stratagene es una marca comercial registrada.

B. INTRODUCCIÓN.

El VHS-2 pertenece a la subfamilia Alphaherpesvirinae. Las infecciones del virus del herpes simple (VHS) son muy comunes y la seroprevalencia en adultos varía entre 10 y 25% para VHS-2. La infección de VHS en individuos inmunocompetentes normalmente no causa problemas graves de salud. El VHS-2 suele asociarse con el herpes genital. Se puede producir la reactivación del VHS en el sistema nervioso central y causar un amplio rango de síntomas clínicos, desde meningitis leve (Mollaret) hasta encefalitis grave con una tasa de mortalidad de hasta el 70% en ausencia de terapia. El VHS-1 y VHS-2 se diferencian por su comportamiento en el sistema nervioso central (SNC). El VHS-2 se asocia con meningitis, ya sea durante infecciones primarias o acompañando reactivaciones genitales clínicas y subclínicas. La infección primaria de neonatos o la reactivación del VHS en individuos inmunocomprometidos pueden asociarse a una mayor incidencia de meningitis, encefalitis grave e infecciones oculares peligrosas.

Los genomas de VHS son complejos y contienen dos regiones únicas, denominadas región única larga (UL) y región única corta (US). De los 74 ORF conocidos, la UL contiene 56 genes virales, mientras que la US contiene sólo 12.

Los virus del herpes son conocidos por su capacidad para establecer infecciones incurables de por vida. El tratamiento normalmente incluye medicamentos antivirales de uso general que reducen la infección, pero que no pueden eliminarla por completo. El antiviral más usado es Acyclovir o Valacyclovir. La reducción de la carga viral puede reducir la gravedad de las lesiones asociadas al brote y la cantidad de células infectadas expulsadas por el organismo, disminuyendo la probabilidad de transmisión a otros.

El diagnóstico de VHS en neonatos, así como en niños y adultos, se ha facilitado notablemente por la disponibilidad de herramientas de diagnóstico para la detección y cuantificación del ADN viral. La PCR cuantitativa en tiempo real es un método rápido, sensible y específico para el diagnóstico de la infección por VHS.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El equipo HSV2DNAQT.CE se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicas.

El **ADN de VHS2**, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se amplifica utilizando un sistema de amplificación en tiempo real. El producto amplificado se detecta y se cuantifica comparándolo con la curva estándar, utilizando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para una secuencia genómica única del VHS2.

El Control Interno (IC) heterólogo sirve como control de extracción/amplificación para cada muestra procesada individualmente con el fin de identificar inhibidores de la reacción. Se suministra una curva estándar que permite la determinación de la carga viral.

D. COMPONENTES.

El formato estándar del producto con código HSV2DNAQT.CE contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Contenido	HSV2DNAQT.CE 50 reacciones
A CÓDIGO: : ALL/MM-4 CÓDIGO COLOR: TRANSPARENTE	Mezcla maestra	Nº 1 vial/0.825ml
B CÓDIGO: HSV2/CB CÓDIGO COLOR: AMARILLO	Cebadores/sondas liofilizados	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
C CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: ROJO	Agua grado molecular	Viales n.º 4 / 1,5 ml
NTC CÓDIGO: ALL/NTC CÓDIGO COLOR: BLANCO	Control negativo	Viales n.º 1 / 1,5 ml
STD Estándar de cuantificación (3.5x10 ⁵ copias/µl) CÓDIGO: HSV2/STD CÓDIGO COLOR: ROJO	Estándar cuantitativo líoilizado	Viales n.º 6 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
IC Control Interno CÓDIGO: ALL/IC CÓDIGO COLOR: VERDE	Control interno líoilizado	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	1

Nota importante: A petición, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25, 100, 150 pruebas, como se indica a continuación:

1. Componente A	Vial n.º 1 / 0,4 ml	Viales n.º 2/ 0.825 ml	Viales n.º 3 / 0.825 ml
2. Componente B	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
3. Componente C	Viales n.º 2 / 1,5 ml	Viales n.º 4 / 1,5 ml	Viales n.º 6 / 1,5 ml
4. NTC	Viales n.º 1 / 1,5 ml	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Vial n.º 1 / 1,5 ml
6. IC	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
7. STD	Viales n.º 3	Viales n.º 4	Viales n.º 6
8. Manual instrucc.	n.º 1	n.º 1	n.º 1
Número de pruebas	25	100	150
Código	HSV2DNAQT.CE.25	HSV2DNAQT.CE.100	HSV2DNAQT.CE.150

E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El equipo HSV2DNAQT.CE debe almacenarse a +2...8 °C.

Una vez disueltos, el **Componente B** (código HSV2/CB) y el **Componente IC** (código ALL/IC) se mantienen estables durante 4 meses a -20 °C. Una vez disuelto, el **Componente STD** (código HSV2/STD) se mantiene estable durante 2 semanas a -20 °C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente,

deberían congelarse en alícuotas. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos. Solo se permite descongelar una vez.

F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl < volumen < 1000 µl)
2. Equipo de extracción de ADN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Microcentrífuga
6. Racks para tubos
7. Puntas filtradas estériles con barrera contra aerosoles
8. Microtubos libres de nucleasa
9. Microtubos de 0,2 ml o microplacas PCR recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
10. Guantes desechables, sin polvo
11. Termociclador Real-Time PCR (*)
12. Papel absorbente
13. Vórtex o similar

(*) **Atención:** Se debe realizar de forma rutinaria una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo).

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo sólo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada del laboratorio, guantes sin polvo y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire.
7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.
8. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.
9. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2,8 °C en un refrigerador o en una cámara de refrigeración con control de temperatura.
10. No intercambiar componentes de diferentes lotes. ni tampoco de distintos equipos del mismo lote.
11. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
12. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
13. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
14. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo.
15. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Todas las muestras de sangre/plasma/CSF humanos deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU., y de

conformidad con lo publicado por los Institutos nacionales de la salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Almacenar y extraer las muestras separadas de los demás reactivos y usar un espacio separado para su manipulación
17. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta, indicada en las etiquetas, de agua grado molecular (componente C, código: CC) suministrada con el equipo.
18. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de refrigeración.
19. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.
20. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados para evitar contaminación cruzada.
21. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. Especialmente, los desechos líquidos procedentes de los procedimientos de extracción de muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados antes de su eliminación. No poner en contacto los desechos de la extracción con lejía.
22. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
23. Otros materiales de desecho generados (por ejemplo: puntas usadas para las muestras) deben ser manipulados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el plasma según las técnicas estándar de preparación de muestras para laboratorios de análisis clínicos.
 2. El fluido cerebroespinal (CSF) se extrae asépticamente mediante punción lumbar.
 3. No se ha detectado ninguna influencia en la preparación de la muestra con citrato, EDTA.
- Atención: La heparina (>10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR.
- Las muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante no deben usarse. Por lo tanto, las muestras de pacientes heparinizados no deben usarse.
4. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.
 5. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
 6. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
 7. El plasma y el CSF, si no se usan inmediatamente, deben almacenarse en alícuotas a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la extracción. Las muestras pueden almacenarse a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.
 8. Las muestras de plasma para la extracción de ADN deben recogerse de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio. Las muestras de plasma y CSF deben transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 4 horas, o pueden almacenarse congeladas a -20 °C durante un período máximo de 30 días o a -70 °C para períodos más largos.
 9. Para un almacenamiento óptimo de las muestras, recomendamos dividir las alícuotas (volumen mínimo

300 µl) y almacenarlas a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos.

10. Al utilizar muestras congeladas, descongelar las muestras justo antes de la extracción para evitar posibles casos de degradación de los ácidos nucleicos.

11. Las muestras de sangre periférica para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con las indicaciones del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 3 días. No congelar todas las muestras de sangre periférica para evitar lisis celular y pérdida de título viral.

I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Mezcla maestra:

Componente A. Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar y centrifugar brevemente para recoger el volumen completo.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Cebadores/Sondas:

Componente B:

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente B liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Agua grado molecular:

Componente C. Listo para el uso.

Control negativo:

NTC. Listo para el uso.

Curva estándar:

STD:

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm .
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el STD liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex
- Preparar 4 tubos libres de nucleasa para la preparación de la curva estándar
- Establecer una dilución de serie STD 1:10 en el componente C (código: ALL/C) para obtener los puntos de la curva estándar, como se describe en la siguiente tabla:

Preparación de la curva estándar		
STD	Calibrador 350000 copias/ µl	Volumen de componente C (código: ALL/C) como se indica en la etiqueta del vial
STD 1	35000 copias/ µl	10 µl (STD) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 2	3500 copias/ µl	10 µl (STD 1) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 3	350 copias/µl	10 µl (STD 2) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 4	35 copias/ µl	10 µl (STD 3) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)

Control interno:

IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el IC liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las **micropipetas** deben calibrarse y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%.
2. **Dispositivo de extracción:** El equipo HSV2DNAQT.CE ha sido diseñado para usarse sólo con QIAamp DNA Minikit, código 51306, (QIAGEN) y Nucleospin Blood kit, código: 740951(Macherey-Nagel) y NA Body Fluid Kit, código: D-2021 (Chemagen distribuido por Dia.Pro). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por los fabricantes.
3. **Termocicladores Real-Time.** El equipo HSV2DNAQT.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene), y CFX96RTS, software CFX manager versión 1.7 (Biorad). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los reactivos líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que en la parte inferior de los viales de los

componentes liofilizados haya un agregado bien formado. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.

3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (código: ALL/C) como se describe en la sección correspondiente (I).
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.
5. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores Real-Time.
6. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
7. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
8. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

N.1 Extracción de ADN

La fase de extracción del ADN genómico de VHS2 debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Herramientas para extracción manual

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Plasma/CSF	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/CSF	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

Herramienta para extracción automática en combinación con el instrumento DIA.FASTEX

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Plasma/CSF	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distribuido por Dia.Pro

El aislamiento de ADN solo debe realizarse de acuerdo con el manual de instrucciones (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro).

Nota importante: los siguientes volúmenes deben usarse estrictamente en los procedimientos de extracción:

Descripción	Volumen muestra μl	Volumen elución μl
Nucleospin Blood	200	100
QIAamp DNA mini kit®	200	100
NA Body Fluid Kit	200	100

El ADN obtenido de las muestras, no usado en la serie, debe almacenarse congelado (de -20 °C a -80 °C).

Nota importante: el IC del equipo HSV2DNAQT.CE puede usarse en el procedimiento de aislamiento como control de extracción.

El valor Ct del control interno se usa para evaluar si el procedimiento de extracción de ADN se ha realizado correctamente (véase el apartado Q).

Para esta aplicación

- **Nucleospin Blood y QIAamp DNA mini kit :** añadir 5 μl de IC a la mezcla de tampón de lisis y muestra, y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

- **NA Body Fluid Kit :** añadir 5 μl de IC a la mezcla de tampón de lisis y muestra , y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

N.2 Configuración de la reacción

El equipo HSV2DNAQT.CE ha sido diseñado para usarse solo con ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene), y CFX96, software CFX manager versión 1.7 (Biorad)

N.2.1 Preparación de PCR

Importante: En la sección O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consúltelo antes de leer las instrucciones siguientes.

- Preparar los componentes como se describe en la sección I;
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para la curva estándar (preparada como se describe en la sección I).

Nota importante: Usar sólo tubos ópticos o microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían comprobarse en duplicado, siempre que sea posible;
- Incluir al menos 1 tubo para el NTC (control negativo)
- Preparar la **mezcla de amplificación** para muestras, NTC y curva estándar según la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación

(IC como control de amplificación)

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 μl	150 μl
B	Cebadores/Sondas	2 μl	24 μl
IC	Control Interno	0,5 μl	6 μl
Vol. total		15 μl	180 μl

Nota importante: Si el control interno se añadió durante el procedimiento de aislamiento del ADN, preparar la **mezcla de amplificación** para muestras según la siguiente tabla:

**Preparación de la mezcla de amplificación
(IC como control de extracción/amplificación)**

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 µl	150 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
C	Agua grado molecular	0,5 µl	6 µl
Vol. total		15 µl	180 µl

N.2.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 15 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca
- Añadir 10 µl de las **muestras, NTC y curva estándar** a los tubos de reacción.
- Cerrar bien los tubos de reacción
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm.
- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos ni exponer a la luz (cubrir los tubos).
- Cargar los tubos en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.
- Tras las operaciones de configuración descritas en la sección N3 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

Nota importante: Los componentes liofilizados tras la disolución en componente C (agua grado molecular) no estarán estables más de 3 horas. Mantener en hielo o a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

Al final de la jornada laboral, desechar adecuadamente los materiales sobrantes de los puntos de dilución STD.

El volumen no utilizado de Componente B, STD y de IC puede congelarse a -20 °C y usarse como se indica en el apartado E.

N.3 Programación del instrumento

Para la programación del instrumento, consultar el manual de instrucciones del instrumento proporcionado por los fabricantes.

Nota importante: Para Mx3000P ajustar "Ajuste de ganancia del filtro": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (véase el manual de instrucciones del software MxPro™ QPCR, pág. 41)

N.3.1 Perfil térmico

El perfil térmico se indica en la siguiente tabla:

Fase	Ciclo	Temp.	Tiempo
1	1	50°C	2 min
2	1	95°C	10 min
3	50	95°C	15 s
		60°C (*)	1 min

NOTA IMPORTANTE: (*) fase para la adquisición de datos en tiempo real

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

N.3.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (ABI 7500, BioRad CFX96 y MX3000P Stratagene), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
HSV2	FAM	No fluorescente
Control Interno (IC)	JOE/VIC	No fluorescente
Referencia pasiva	ROX	No presente

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con la configuración correcta siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

O. ESQUEMA DEL ENSAYO.

A continuación se ofrece un ejemplo del esquema de dispensación para análisis cuantitativo:

Microplaca o tubos

	1	2	3
A	STD 1 35000 copias/ µl	Muestra 4	
B	STD 2 3500 copias/ µl	Muestra 5	
C	STD 3 350 copias/ µl	Muestra 6	
D	STD 4 35 copias/ µl	Muestra 7	
E	NTC	Muestra 8	
F	Muestra 1	Muestra 9	
G	Muestra 2	Muestra 10	
H	Muestra 3	Muestra 11	

Legenda: NTC = Control negativo STD 1,2,3,4 = Curva estándar de ADN de VHS2, Muestra 1,2,3,... = Muestras en evaluación.

P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

P.1 Configuración pre-análisis

Antes de iniciar el análisis:

- Ajustar la "línea de base" (nivel fluorescente del fondo) como se indica a continuación:

"Línea de base"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Línea de base automática
STRATAGENE™ MX3000P®	Línea de base adaptable No usar algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00
BIORAD™ CFX96®	Línea de base automática

- Ajustar manualmente el "Threshold" fluorescente FAM/JOE/VIC

"Threshold" fluorescente FAM	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	400

"Threshold" fluorescente JOE/VIC	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	350

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en los calibradores STD cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores Ct son los esperados e indicados en la siguiente tabla:

ABI™ PRISM® 7500 SDS/ STRATAGENE™ MX3000P®	
Comprobar FAM	Exigencia
STD 1	19 < Ct (Threshold Cycle) < 21.5

BIORAD™ CFX96®	
Comprobar FAM	Exigencia
STD 1	20.0 < Ct (Threshold Cycle) < 22.5

Además, los valores de pendiente y R2 se comprueban para verificar la calidad de la serie. Se deben cumplir los siguientes requisitos.

Comprobar FAM	Exigencia
Pendiente	-3,1 < Pendiente < -3,9

Comprobar FAM	Exigencia
Eficiencia	R ² >0,98

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valor Ct positivo/negativo) y la fluorescencia JOE/VIC del control interno para validar la detección de VHS2, como se describe en la siguiente tabla:

VHS2 FAM	JOE/VIC del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	20 < Ct < 40	CORRECTO
	Ct > 40 or indeterminada	CORRECTO*
MUESTRA NEGATIVA	20 < Ct < 40	CORRECTO
	Ct > 40 or indeterminada	INVÁLIDO**

* Una concentración de ADN de VHS2 superior a 1000 copias/μl (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

** En este caso, han aparecido problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de

células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. Es necesario repetir desde la extracción de una muestra nueva.

Para cada muestra positiva detectada por el equipo con código HSV2DNAQT.CE, se puede aplicar una cuantificación de 2,7E+08 a 5.0E-01 copias/μl. Por lo tanto, la carga viral de VHS2 debe expresarse como se indica en la siguiente tabla:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®- BIORAD™ CFX96®	
Datos de la serie de la muestra VHS2 (copias/μl)	Carga viral de VHS2 (copias/μl)
Cantidad > 2,7E+08	Carga viral de VHS2 > 2,7E+08
3.00E-01 ≤ cantidad ≤ 2,7E+08	CUANTIFICACIÓN
Cantidad ≤ 3.0E-01	Carga viral de VHS2 ≤ 3E-01

NOTA IMPORTANTE: Para la cuantificación de las muestras, consultar la sección R

Los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados teniendo en cuenta la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio inherentes al paciente.

Los siguientes resultados son posibles:

Tabla de solución de problemas

	FAM	JOE/VIC	Resultado	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	+	+/-	RESULTADO CORRECTO <u>Positivo</u>	¡IMPORTANTE! Una concentración de ADN de VHS2 superior a 1000 copias/μl (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
MUESTRA desconocida	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento o mal funcionamiento de los instrumentos	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de VHS2 y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo; 7. que el procedimiento de extracción se haya realizado correctamente.
MUESTRA desconocida	-	+	RESULTADO CORRECTO <u>Negativo</u>	
STD	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	¡IMPORTANTE! 1. Una concentración de ADN de VHS2 superior a 1000 copias/μl (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos 2.La señal JOE/VIC negativa solo es correcta cuando el control interno (IC) se utiliza como control de extracción.
STD	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento

			pipeteado o en el procedimiento	de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de VHS2 y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo;
STD	-	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de VHS2 y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente;
NTC	-	+/-	RESULTADO CORRECTO	La señal JOE/VIC negativa solo es correcta cuando el control interno (IC) se utiliza como control de extracción.
NTC	+	+/-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; que el equipo se haya almacenado correctamente.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Al transmitir los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

Si los resultados de la prueba coinciden con los requisitos del **RESULTADO DEL ENSAYO CORRECTO** establecidos anteriormente, pasar a la siguiente sección.

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

R. CUANTIFICACIÓN

Los calibradores STD se tratan como muestras purificadas y se usa el mismo volumen, 10µl. La concentración de los calibradores STD se expresa en copias/µl. La **concentración del genoma viral por ml** para cada muestra del paciente se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resultados (copias/ml)} = \frac{\text{copias/}\mu\text{l (datos de la serie)} \times \text{Volumen muestra de elución (}\mu\text{l)}}{\text{Volumen de extracción de muestras (ml)}}$$

Ejemplo:

$$\text{Resultados (copias/ml)} = \frac{1500 \times 100}{0.2}$$

$$\text{Resultados (copias/ml)} \equiv 7.5 \text{ E}+05$$

S. PRESTACIONES

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS). La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por los laboratorios clínicos de referencia.

S.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se puede expresar como Límite de detección y como **Límite de cuantificación**.

Límite de detección (LOD): es la cantidad mínima de sustancia que puede detectarse por el sistema con una probabilidad establecida.

Para las pruebas NAT se expresa como la concentración mínima del **analito** que, tras probarse en múltiples repeticiones, da un resultado positivo.

El **límite de detección (LOD)** se determina probando diluciones en serie que contienen concentraciones conocidas del analito.

El **LOD** es la concentración mínima de analito que puede detectarse de forma consistente (p. ej., en $\geq 95\%$ de las muestras en condiciones rutinarias del laboratorio).

En el equipo con código HSV2DNAQT.CE, el **LOD** se ha determinado mediante el análisis de 24 réplicas, 8 réplicas en tres series distintas, de la concentración mínima del analito que puede detectarse en el 100% de éstas.

Los resultados son los siguientes:

Límite de detección	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.3 copias/µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0.3 copias/µl
BIORAD™ CFX96®	0.5 copias/µl

Esto significa que existe una probabilidad del 100% de que se detecten 0.3 copias/µl con los instrumentos ABI™PRISM® 7500 SDS, STRATAGENE™ MX3000P® y BIORAD™ CFX96®.

S.1.1 Límite de cuantificación

El **límite de cuantificación** se determinó midiendo la **linealidad**, el **rango dinámico** y la **reproducibilidad**.

La **linealidad** es la medida del grado en que una curva se aproxima a la línea recta. Se expresa con el valor **PENDIENTE**.

El **rango dinámico** es la extensión de concentraciones de analito para la que el valor de salida final (ciclo umbral Ct) del sistema es directamente proporcional a la concentración de analito, con confiabilidad y precisión aceptables.

Los límites del rango dinámico son los límites inferior y superior de cuantificación (**Límite de cuantificación**).

En el equipo con código HSV2DNAQT.CE, se preparó una curva de dilución límite con copias/µl definidas de un plásmido que porta la secuencia viral meta específica. Los puntos de dilución se probaron en el sistema analítico y se determinaron sus Ct (ciclo umbral).

El **límite de cuantificación** superior es $8,43 \log_{10}$ ($2,7 \text{E}+08$ copias/µl) y el límite de cuantificación inferior es $-0,52 \log_{10}$ ($3,00 \text{E}-01$ copias/µl).

S.2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar y cuantificar sólo el marcador meta.

La especificidad analítica del ensayo de ADN de VHS2 se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia meta del genoma con un software adecuado (LionSoft v.1.0 suministrado por Biotools y Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystems Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia meta del genoma han sido controlados por el software "BLAST" para comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos a nivel mundial tiene alguna homología con el VHS2, y por el software "ClustalX" para comparar las secuencias meta del genoma de los distintos genotipos de VHS2.

3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.

4. Las muestras procedentes de pacientes con infecciones debidas a organismos que interfieren potencialmente se obtuvieron de un centro clínico de referencia.

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Organismo	Resultado
CMV	negativo
VZV	negativo
EBV	negativo
HHV6	negativo
HHV8	negativo
HSV1	negativo
Virus JC	negativo
Virus BK	negativo
HTLV II	negativo

S.3 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

S.3.1 Especificidad diagnóstica:

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador meta. Así, la muestra **negativa verdadera** es una muestra conocida como negativa para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

Este parámetro se estudió examinando 10 extractos de muestras de plasma negativas de ADN de VHS2:

NEGATIVOS VERDADEROS	10
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
ESPECIFICIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la especificidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

S.3.2 Sensibilidad diagnóstica

La **sensibilidad diagnóstica** es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador meta. Así, la muestra **positiva verdadera** es una muestra conocida como positiva para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

El kit con código HSV2DNAQT.CE se estudió ante los paneles de prueba de años anteriores QCMD 2017 y QCMD 2019 virus del herpes simple (HSVDNA17 – HSVDNA19). A continuación, se calculó el porcentaje (%) de muestras positivas.

POSITIVOS VERDADEROS	10
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
SENSIBILIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	100 %

Además, se examinó el panel del programa EQA Herpes Simple Virus 2020 como evaluación del desempeño.

HSV2 POSITIVOS	4
NEGATIVOS VERDADEROS	6
FALSOS NEGATIVOS	0
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
SENSIBILIDAD %	100
ESPECIFICIDAD %	100

S.4 PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo con código HSV2DNAQT.CE, la **precisión** se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Se probaron 4 puntos de la curva estándar en 8 réplicas en la misma serie (intraensayo) y en tres series distintas (interensayo).

A continuación, se calcularon la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo.

En ausencia de parámetros internacionales establecidos, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el ADN de VHS2:

Variación de coeficiente de intraensayo (CV%) ≤ 10%.

Variación de coeficiente de interensayo (CV%) ≤ 10%.

T. LIMITACIONES

El usuario final de este equipo deberá leer cuidadosamente y entender este manual de instrucciones. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables. Especialmente, el pipeteado preciso de muestra y reactivo, la aplicación de un flujo de trabajo correcto junto con una programación cuidadosa de la fase de termociclado, son esenciales para la detección y la cuantificación precisas y reproducibles de ADN de VHS2.






La determinación de ADN de VHS2 en el plasma o CSF de un individuo tiene numerosas implicaciones médicas, sociales, psicológicas y económicas.

Se recomienda, de modo confidencial, un asesoramiento y evaluación médica apropiados.

U. BIBLIOGRAFÍA

1. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. Weidmann M., Meyer-König U., Hufert F.T. J. Clin. Microbiol., 2003; 41(4):1565-1568.
2. Molecular Diagnosis of Herpes simplex virus infections in the central nervous system. Tang Y., Shawn Mitchell P., Espy M.J., Smith T.F., Persing D.H. J. Clin. Microbiol., 1999; 37(7):2127-2136.
3. Management of herpes virus infection following transplantation. The British society for antimicrobial chemotherapy, 2000; 45:729-748.
4. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of herpes simplex virus type 1 and 2. Rail H., Bartlime A., Drerup J., Grewing T., Korn K. J. mol. Diagn, 2008;10(4):361-367.
5. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. Cinque P., Cleator G.M., Monteyne P., Sindic C.J., van Loon A.M. J. Neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1996; 61:339-345.
6. Effect of sequence polymorphisms on performance of two real-time PCR assay for detection of herpes simplex virus. Stevenson J., Hymas W., Hillyard D. J. Clin. Microbiol., 2005;43(5):2391-2398.
7. Real-time PCR for type-specific identification of herpes simplex in clinical samples: evaluation of type specific results in the context of CNS disease. Meylan S., Robert D., Estrade C., Grimblehler V., Peter O., Meylan P.R., Sahli R. J. Clin. Virol., 2008;41:87-91

5. Símbolos

LEYENDA			
REF	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
IVD	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
LOT	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
CE	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

4BShopLab



consip

acquistinretepa

DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND
Because diagnosis matters