

cobas[®] BKV

Prueba cuantitativa de ácidos nucleicos para uso en los sistemas cobas[®] 5800/6800/8800

Para diagnóstico *in vitro*

cobas[®] BKV

P/N: 09040960190

Para uso en el sistema cobas[®] 5800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Para uso en los sistemas cobas[®] 6800/8800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 o

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 o

P/N: 09051953190

Tabla de contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación de la prueba.....	5
Reactivos y materiales.....	8
Reactivos y controles de cobas® BKV	8
Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras.....	11
Requisitos de almacenamiento y manipulación de los reactivos	12
Requisitos para la manipulación de reactivos en el sistema cobas® 5800 o en los sistemas cobas® 6800/8800.....	12
Material adicional necesario para los sistemas cobas® 5800/6800/8800	13
Instrumentos y software necesarios.....	15
Precauciones y requisitos de manipulación.....	16
Advertencias y precauciones.....	16
Manipulación de reactivos	17
Buenas prácticas de laboratorio.....	17
Extracción, transporte y almacenamiento de las muestras	18
Muestras de plasma conservadas en EDTA.....	18
Muestras de orina.....	19
Instrucciones de uso	20
Notas sobre el procedimiento.....	20
Ejecución de la prueba cobas® BKV en los sistemas cobas® 5800/6800/8800	20
Resultados	23
Control de calidad y validez de los resultados en el sistema cobas® 5800 y los sistemas cobas® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o posterior	23
Control de calidad y validez de los resultados en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4	23
Avisos de controles en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4.....	24

Interpretación de los resultados en los sistemas cobas ® 5800/6800/8800.....	25
Interpretación de los resultados en el sistema cobas ® 5800 y los sistemas cobas ® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o superior.....	25
Interpretación de resultados en los sistemas cobas ® 6800/8800 con versión del software 1.4	26
Limitaciones del procedimiento.....	27
Evaluación no clínica del rendimiento	28
Equivalencia entre sistemas	28
Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA.....	28
Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS.....	28
Intervalo lineal	29
Precisión (intralaboratorio).....	30
Verificación de los subtipos.....	31
Especificidad.....	31
Especificidad analítica.....	31
Especificidad analítica: sustancias interferentes	33
Correlación de métodos.....	33
Fallo de todo el sistema.....	34
Contaminación por arrastre	34
Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de orina.....	35
Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS.....	35
Intervalo lineal	36
Precisión (intralaboratorio).....	37
Verificación de los subtipos.....	38
Especificidad.....	38
Especificidad analítica.....	38
Especificidad analítica: sustancias interferentes	39
Correlación de métodos.....	41
Contaminación por arrastre.....	41

Evaluación clínica del rendimiento	42
Reproducibilidad de la prueba cobas ® BKV para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA	42
Rendimiento de la prueba cobas ® BKV para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA	43
Reproducibilidad de la prueba cobas ® BKV para el tipo de muestra de orina estabilizada.....	46
Rendimiento de la prueba cobas ® BKV para el tipo de muestra de orina estabilizada.....	48
Información adicional	51
Características principales de la prueba	51
Símbolos	52
Asistencia técnica	53
Fabricante e importador.....	53
Marcas registradas y patentes	53
Derechos de autor	53
Bibliografía	54
Revisión del documento	55

Uso previsto

cobas® BKV es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la cuantificación del ADN del virus de BK (BKV) en plasma humano conservado en EDTA y orina estabilizada en **cobas**® PCR Media.

En el plasma conservado en EDTA, la prueba **cobas**® BKV se ha diseñado como complemento en el diagnóstico y la gestión del BKV en pacientes trasplantados. En los pacientes sometidos a control del BKV en plasma conservado en EDTA, las mediciones en serie del ADN pueden utilizarse para indicar la necesidad de posibles cambios en el tratamiento y para valorar la respuesta viral al tratamiento.

En orina estabilizada en **cobas**® PCR Media, la prueba **cobas**® BKV se ha diseñado como complemento en el diagnóstico y la gestión del BKV en pacientes trasplantados.

Los resultados de la prueba **cobas**® BKV deben interpretarse en el contexto de todos los resultados clínicos y de laboratorio relevantes.

La prueba **cobas**® BKV no se ha concebido para el cribado en sangre o productos sanguíneos.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

Los pacientes trasplantados presentan un mayor riesgo de padecer numerosas infecciones víricas y bacterianas con mayor probabilidad de causar problemas de salud graves en la población trasplantada en relación con la población sana general. Este riesgo mayor se debe en parte a la disminución de la función del sistema inmune debido a los medicamentos inmunosupresores que reciben los pacientes trasplantados para reducir las probabilidades de rechazo del trasplante.^{1,2}

El virus BK (BKV) es un virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) sin envoltura pequeño (~5 kb) que pertenece a la familia de los poliomavirus. Existen cuatro subtipos principales de BKV, de los que el subtipo I es el que presenta una mayor tasa de detección (80 %), seguido del subtipo IV (15 %).³ La seroprevalencia del BKV es > 80 % entre la población general de adultos sanos.⁴ En personas inmunocompetentes, el BKV no está asociado a ninguna patología significativa. Sin embargo, la infección por BKV puede provocar enfermedades clínicas de gravedad en personas inmunocomprometidas, incluidos los pacientes trasplantados.⁵

Las infecciones por BKV se manifiestan mayormente en los riñones y el tracto urinario. Después de la infección primaria, el virus permanece latente en el epitelio tubular renal y el epitelio uretral y puede reactivarse en personas inmunocomprometidas. Los pacientes con trasplante de riñón presentan un riesgo mayor de padecer complicaciones relacionadas con el BKV en comparación con los destinatarios de otros tipos de trasplantes, incluidas la nefropatía asociada a infección por poliomavirus (PVN) y la estenosis uretral. La PVN se produce en hasta un 10 % de receptores de trasplante de riñón y aproximadamente un 50 % de los pacientes afectados por PVN experimentarán un rechazo del injerto del trasplante. Además, aproximadamente un 3 % de los destinatarios de trasplantes de riñón desarrollan una estenosis uretral asociada a la infección por BKV.⁵ Los trasplantes de células madre hematopoyéticas (HSCT) también experimentan complicaciones asociadas con el BKV con una mayor frecuencia, la mayoría de las veces en forma de cistitis hemorrágica (HC). Entre un 5 y un 15 % de los pacientes de HSCT desarrollan una HC.¹

Las directrices recomiendan un control habitual del BKV para los pacientes trasplantados de riñón durante un periodo máximo de 5 años después del trasplante.⁶ Este enfoque de control permite identificar entre 80-90 % de pacientes con

riesgo de sufrir una PVN. Se recomienda realizar un análisis de plasma para detectar viremia del virus BKV como parte de la estrategia para identificar pacientes con un riesgo mayor de PVN, ya sea como prueba confirmatoria para pacientes a los que ya se les ha detectado viruria de BKV o como modalidad de prueba primaria para el cribado rutinario.⁶ Actualmente no existen recomendaciones para el seguimiento rutinario de BKV en pacientes HSCT y las pruebas se recomiendan básicamente para la evaluación de pacientes con hematuria y síntomas clínicos de cistitis. Sin embargo, un nivel de ADN de BKV superior a 10.000 copias/ml se asocia a un mayor riesgo de HC en pacientes trasplantados.⁷

Para los pacientes de trasplante de riñón que presentan una elevación permanente de los niveles de ADN de BKV en plasma, que suele establecerse como una medición superior a 10.000 copias/ml, se recomienda una prueba de BKV en plasma cada 1-2 semanas hasta que el nivel de ADN vuelva a los niveles no detectables en dos mediciones consecutivas.

Muchas pruebas de laboratorio para la cuantificación de BKV no están estandarizadas, lo que se traduce en una mayor variabilidad interlaboratorio e interensayo.^{6,7} Además, los constituyentes de la orina pueden provocar agregación del BKV, lo que también influye en la variabilidad cuantitativa.^{8,9} La valoración formal de la reproducibilidad y validez de los niveles de ADN de BKV es fundamental para garantizar unos resultados coherentes (independientemente del laboratorio en el que se efectúe la prueba) en la gestión clínica de los pacientes afectados con enfermedades asociadas al BKV.

A pesar de que el umbral viral exacto médicamente relevante todavía sea objeto de debate debido a la variabilidad entre ensayos, el concepto de umbral crítico parece válido y se ha utilizado en estudios de historia natural para demostrar que unos valores elevados de niveles de ADN de BKV están asociados a un mayor riesgo de desarrollo de PVN y HC.^{6,7}

Motivos para el uso de las pruebas NAT

En el ámbito clínico, la serología de los poliomavirus no se utiliza y solamente se considera para determinar si un paciente ha estado infectado previamente con el BKV y presenta riesgo de reactivación. Los métodos de cultivo de virus presentan un tiempo de respuesta más largo y, debido a su naturaleza semicuantitativa, su uso resulta limitado en pacientes inmunocomprometidos que suelen tener niveles bajos del virus. En cambio, la detección directa de ADN del BKV con métodos de PCR a tiempo real ofrece potencialmente un amplio intervalo dinámico y una elevada precisión y especificidad para su uso en pacientes trasplantados.

Explicación de la prueba

La prueba cobas® BKV es una prueba cuantitativa que se ejecuta en los sistemas cobas® 5800/6800/8800. cobas® BKV permite la detección y cuantificación de ADN de BKV en plasma conservado en EDTA y orina estabilizada en cobas® PCR Media de pacientes infectados. La cuantificación del nivel de ADN del BKV se realiza mediante un estándar de cuantificación de ADN diferente del BKV (DNA-QS) que se añade a cada una de las muestras durante el procesamiento de las muestras. El DNA-QS también permite monitorizar todo el proceso de preparación de las muestras y amplificación mediante PCR. Además, la prueba utiliza tres controles externos: uno positivo de título alto, uno positivo de título bajo y uno negativo. Los controles externos positivo alto y positivo bajo se fabrican mediante dilución a partir de material en stock con un título rastreable al 1^{er} estándar internacional de la OMS para el BKV (código NIBSC: 14/212). Cada lote del kit de amplificación/detección presenta una calibración rastreable según el 1^{er} estándar internacional de la OMS para el BKV (código NIBSC: 14/212).

Principios del procedimiento

La prueba cobas® BKV se basa en la preparación de muestras totalmente automática (extracción y purificación de ácidos nucleicos) seguida de un proceso de amplificación y detección mediante PCR. El sistema cobas® 5800 se ha diseñado como un único instrumento integrado. Los sistemas cobas® 6800/8800 constan del módulo de suministro de muestras, el módulo de transferencia, el módulo de procesamiento y el módulo analítico. La gestión de datos automática se realiza mediante el software del sistema cobas® 5800 y los sistemas cobas® 6800/8800, que asigna los resultados de la prueba a todas las pruebas como diana no detectada, ADN del BKV detectado < LLoQ (límite inferior de cuantificación), ADN de BKV detectado > ULoQ (límite superior de cuantificación) o un valor del intervalo lineal $LLoQ < x < ULoQ$. Los resultados pueden revisarse directamente en la pantalla del sistema, exportarse o imprimirse como informe.

La extracción de ácidos nucleicos de las muestras de paciente y de moléculas de DNA-QS de lambda añadidas se realiza simultáneamente. En resumen, los ácidos nucleicos víricos se liberan al añadir proteinasa y reactivo de lisis a la muestra. Los ácidos nucleicos liberados se unen a la superficie de sílice de las partículas de vidrio magnéticas añadidas. Las sustancias sin unir y las impurezas, como las proteínas desnaturalizadas, los restos celulares y potenciales inhibidores de la PCR se eliminan en los siguientes pasos con el reactivo de lavado y los ácidos nucleicos purificados se eluyen de las partículas de vidrio mediante el buffer de elución a temperatura elevada.

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos diana de la muestra se realiza mediante un enfoque de diana dual específica del virus a partir de regiones altamente conservadas del BKV localizadas en la región del antígeno-t pequeño del BKV y la región VP2 del BKV. La amplificación selectiva de DNA-QS se realiza mediante cebadores que van en un sentido y en sentido contrario específicos de la secuencia que se seleccionan de modo que no presenten homología alguna con el genoma del BKV. Para el proceso de amplificación se utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable. La amplificación de las secuencias diana y de DNA-QS se realiza simultáneamente mediante un perfil universal de amplificación mediante PCR con unos pasos de temperatura y número de ciclos predefinidos. El reactivo de Master Mix incluye trifosfato de deoxiuridina (dUTP), en lugar de trifosfato desoxitimidina (dTTP), que se incorpora al ADN recién sintetizado (amplicón).¹⁰⁻¹² La enzima AmpErase, que se incluye en la Master Mix para PCR cuando se calienta durante la primera ciclación térmica, destruye los amplicones contaminados de las series de PCR anteriores. Sin embargo, los amplicones nuevos no se eliminan porque la enzima AmpErase se inactiva cuando se expone a temperaturas superiores a los 55 °C.

El reactivo Master Mix de cobas® BKV contiene dos sondas de detección específicas para las secuencias diana del BKV y una para DNA-QS. Las sondas están marcadas con marcadores emisores fluorescentes específicos para la diana para permitir la detección simultánea de fragmentos diana de BKV y DNA-QS en dos canales diana distintos.^{13,14} La señal fluorescente de las sondas intactas se elimina mediante el marcador silenciador. Durante el paso de amplificación de la PCR, la hibridación de la sonda con las plantillas específicas de ADN monocatenario provoca la escisión de la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa, lo que produce la separación de los marcadores emisores y silenciadores y la emisión de una señal fluorescente. Con cada ciclo de PCR, se generan cantidades crecientes de sondas escindidas y la señal acumulada del marcador emisor aumenta concomitantemente. La detección y diferenciación en tiempo real de los productos de PCR se consigue mediante cuantificación de la fluorescencia generada por los marcadores emisores liberados para las dianas víricas y el DNA-QS.

Reactivos y materiales

Reactivos y controles de cobas® BKV

Los materiales suministrados para el ensayo cobas® BKV se detallan en la Tabla 1. Los materiales necesarios no proporcionados se indican de la Tabla 2 a la Tabla 4 y de la Tabla 8 a la Tabla 10.

Todos los reactivos y controles sin abrir deben almacenarse como se recomienda desde la Tabla 1 hasta la Tabla 4.

Tabla 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Almacenar a 2-8 °C

Casete para 192 pruebas (P/N 09040960190)





Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit 192 pruebas
Solución de proteinasa (PASE)	Buffer Tris, < 0,05 % de EDTA, cloruro de calcio, acetato de calcio, 8 % de proteinasa, glicerol EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina de <i>Bacillus subtilis</i> . Puede provocar una reacción alérgica.	22,3 ml
Estándar de cuantificación de ADN (DNA QS)	Buffer Tris, < 0,05 % de EDTA, < 0,001 % de constructo de ADN diferente de BKV con una región de unión a cebador diferente de BKV y una región exclusiva de unión a sonda (ADN no infeccioso), < 0,002 % de ARN Poli rA (sintético), < 0,1 % de azida sódica	21,2 ml
Buffer de elución (EB)	Buffer Tris, 0,2 % de metil-4-hidroxibenzoato	21,2 ml
Reactivo 1 de Master Mix (MMX-R1)	Acetato de manganeso, hidróxido potásico, < 0,1 % de azida sódica	7,5 ml
Reactivo 2 de Master Mix para BKV (BKV MMX-R2)	Buffer Tricina, acetato de potasio, < 18 % de dimetilsulfóxido, glicerol, < 0,1 % de Tween 20, EDTA, < 0,12 % de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01 % de cebadores ascendentes y descendentes para BKV, < 0,01 % de cebadores que van en un sentido y en sentido contrario para el estándar de cuantificación, < 0,01 % de sondas oligonucleótidas marcadas con fluorescente específicas para el BKV y el estándar de cuantificación del BKV, < 0,01 % de aptámero oligonucleótido, < 0,01 % de ADN polimerasa Z05D, < 0,10 % de enzima AmpErase (uracilo-N-glicosilasa) (microbiana), < 0,1 % de azida sódica	9,7 ml

Tabla 2 cobas® EBV/BKV Control Kit**cobas® EBV/BKV Control Kit**

Almacenar a 2-8 °C

Para uso en el sistema cobas® 5800 y los sistemas cobas® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o superior (P/N 09040951190)

Para uso en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4 (P/N 08688214190 o P/N 09040951190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
Control positivo bajo para EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % de ADN de BKV sintético (plásmido) encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago Lambda, plasma humano normal, ADN de BKV no detectable mediante métodos de PCR < 0,1 % de conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  ADVERTENCIA H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 55965-84-9 Masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).
Control positivo alto para EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % de ADN de BKV sintético (plásmido) encapsulado en proteína recubierta de bacteriófago Lambda, plasma humano normal, ADN de BKV no detectable mediante métodos de PCR < 0,1 % de conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  ADVERTENCIA H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Utilice guantes protectores. P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada. 55965-84-9 Masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

* Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

** Mezcla o sustancia peligrosa.

Tabla 3 cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Almacenar a 2-8 °C


Para uso en el sistema cobas® 5800 y los sistemas cobas® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o superior (P/N 09051953190)

Para uso en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4 (P/N 07002238190 o P/N 09051953190)

Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit
Control negativo para el buffer de cobas® (BUF (-) C)	Buffer Tris, < 0,1 % de azida sódica, EDTA, 0,002 % de ARN poli Ar (sintético)	16 ml (16 × 1 ml)

Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras

Tabla 4 Reactivos cobas® omni para la preparación de muestras

Reactivos	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997546190)	Partículas de vidrio magnéticas, buffer Tris, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1 % de azida sódica	480 pruebas	No aplicable
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997511190)	Buffer Tris, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato, < 0,1 % de azida sódica	4 × 875 ml	No aplicable
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Almacenar a 2-8 °C (P/N: 06997538190)	43 % (p/p) de tiocianato de guanidina**, 5 % (p/v) de polidocanol**, 2 % (p/v) de ditiotreitol**, citrato de sodio dihidratado EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.	4 × 875 ml	 <p>PELIGRO</p> <p>H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H314: Provoca quemaduras graves y lesiones oculares graves. H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.</p> <p>P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.</p> <p>P303 + P361 + P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Enjuagar la piel con agua. P304 + P340 + P310: EN CASO DE INHALACIÓN: transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P305 + P351 + P338 + P310: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P391: Recoger los derrames.</p> <p>593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol</p>
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Almacenar a 15-30 °C (P/N: 06997503190)	Citrato de sodio dihidratado, 0,1 % de metil-4 hidroxibenzoato	4,2 l	No aplicable

* Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

** Mezcla o sustancia peligrosa.

Requisitos de almacenamiento y manipulación de los reactivos

Los reactivos deben almacenarse y manipularse según las indicaciones de la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 7.

Cuando los reactivos no están cargados en el sistema cobas® 5800 o los sistemas cobas® 6800/8800, almacénelos a la temperatura correspondiente especificada en la Tabla 5.

Tabla 5 Almacenamiento de reactivos (cuando el reactivo no está cargado en el sistema)

Reactivo	Temperatura de almacenamiento
cobas® BKV	2-8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2-8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2-8 °C
cobas® omni Lysis Reagent	2-8 °C
cobas® omni MGP Reagent	2-8 °C
cobas® omni Specimen Diluent	2-8 °C
cobas® omni Wash Reagent	15-30 °C

Requisitos para la manipulación de reactivos en el sistema cobas® 5800 o en los sistemas cobas® 6800/8800

Los reactivos cargados en el sistema cobas® 5800 o en los sistemas cobas® 6800/8800 se almacenan a la temperatura correspondiente adecuada y el sistema controla y aplica su fecha de caducidad. El sistema solamente permite utilizar los reactivos cuando se cumplen todas las condiciones indicadas en la Tabla 6, la Tabla 7 y la Tabla 8. El sistema evita automáticamente el uso de reactivos caducados. La información sobre la estabilidad restante del kit abierto y el número de usos del kit para los reactivos específicos del ensayo está disponible a través de la interfaz de usuario del sistema.

Tabla 6 Condiciones de caducidad de los reactivos monitorizadas y aplicadas por el sistema cobas® 5800

Reactivo	Estabilidad del kit abierto	Número de usos del kit	Periodo de estabilidad
cobas® BKV	90 días desde el primer uso	40	36 días desde la carga
cobas® EBV/BKV Control Kit	vial de un solo uso	8	36 días desde la carga
cobas® Buffer Negative Control Kit	vial de un solo uso	16	36 días desde la carga

Tabla 7 Condiciones de caducidad de los reactivos controladas y aplicadas por los sistemas cobas® 6800/8800

Reactivo	Estabilidad del kit abierto	Número de usos del kit	Periodo de estabilidad (fuera del refrigerador a bordo)
cobas® BKV	90 días desde el primer uso	40	40 horas desde la carga
cobas® EBV/BKV Control Kit	vial de un solo uso	8	8 horas desde la carga
cobas® Buffer Negative Control Kit	vial de un solo uso	16	10 horas desde la carga

La Tabla 8 muestra la estabilidad del kit abierto de los reactivos **cobas® omni**. Antes de cada serie, el sistema verifica la estabilidad del kit abierto y procura un volumen de llenado suficiente. Por lo tanto, estos reactivos no tienen asignado un número de usos del kit o un periodo de estabilidad.

Tabla 8 Condición de caducidad de los reactivos **cobas® omni** monitorizada y aplicada por los sistemas **cobas® 5800/6800/8800**

Reactivo	Estabilidad del kit abierto
cobas® omni Lysis Reagent	30 días desde la carga
cobas® omni MGP Reagent	30 días desde el primer uso
cobas® omni Specimen Diluent	30 días desde la carga
cobas® omni Wash Reagent	30 días desde la carga

Material adicional necesario para los sistemas **cobas® 5800/6800/8800**

Tabla 9 Materiales para el uso en los sistemas **cobas® 5800/6800/8800**

Material	P/N
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190

Tabla 10 Material fungible para el uso en el sistema **cobas® 5800***

Material
cobas® omni Processing Plate 24
cobas® omni Liquid Waste Plate 24
cobas® omni Amplification Plate 24
Puntas CORE TIPS con filtro, 1 ml
Punta CORE TIPS con filtro, 300 µl
cobas® omni Liquid Waste Container
Bolsa para residuos sólidos o bolsa para residuos sólidos con inserto
Transportador de muestras de tubos de 16 posiciones completo
Transportador de racks de 5 posiciones

*Para conocer los números de referencia, consulte la Asistencia al usuario del sistema **cobas® 5800**.

Tabla 11 Material fungible para el uso en los sistemas **cobas®** 6800/8800*

Material
cobas® omni Processing Plate
cobas® omni Amplification Plate
cobas® omni Pipette Tips
cobas® omni Liquid Waste Container
Bolsa para residuos sólidos y recipiente de residuos sólidos o bolsa para residuos sólidos con inserto y kit del cajón
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050**,**

* Para conocer los números de referencia, consulte la Asistencia al usuario de los sistemas **cobas®** 6800/8800.

** Póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener una lista de pedido detallada para racks de muestras, racks para puntas obstruidas y bandejas de racks compatibles con cada instrumento.

*** El rack MPA de 16 mm son los racks preferidos para uso con muestras recogidas en tubos **cobas®** PCR Media.

Tabla 12 Kits de obtención de muestras de orina utilizados con **cobas®** BKV

Kit para la obtención de muestras	P/N
cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas® PCR Media Kit	06466281190
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit*	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (opcional)*	07958064190

* Póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener más detalles.

Nota: el kit de muestras de orina para PCR **cobas®** está diseñado para recoger y transportar muestras de orina. Cada kit de muestras de orina para PCR **cobas®** contiene 100 envases de muestras de orina para PCR **cobas®**. Cada paquete contiene 1 pipeta desechable y 1 tubo **cobas®** PCR Media con 4,3 ml de **cobas®** PCR Media. **cobas®** PCR Media actúa como medio estabilizador de ácidos nucleicos para el transporte y el almacenamiento de muestras de orina.

Para las muestras de orina enviadas directamente al laboratorio sin que se haya utilizado un kit de muestras de orina para PCR **cobas®** para la obtención, se puede utilizar como alternativa el kit **cobas®** PCR Media que contiene 100 tubos **cobas®** PCR Media (sin pipetas desechables), dado que la orina debe transferirse al cabo de 24 horas de la obtención.

Instrumentos y software necesarios

Es preciso instalar el software **cobas**® 5800, el software de los sistemas **cobas**® 6800/8800 y el paquete de análisis **cobas**® BKV (ASAP) para los sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.

Para el software de los sistemas **cobas**® 5800 y **cobas**® 6800/8800 versión 2.0 o posterior, el software x800 Data Manager y el PC (o servidor) se suministran con el sistema.

Para la versión 1.4 del software de los sistemas **cobas**® 6800/8800, el servidor IG (Instrument Gateway) se suministra con el sistema.

Tabla 13 Instrumentos

Equipo	P/N
Sistema cobas ® 5800	08707464001
Sistema cobas ® 6800	05524245001 y 09575154001
Sistema cobas ® 8800	05412722001 y 09575146001
Módulo de suministro de muestras para los sistemas cobas ® 6800/8800	06301037001 y 09936882001

Consulte la Asistencia al usuario del sistema **cobas**® 5800 o de los sistemas **cobas**® 6800/8800 para obtener información adicional.

Nota: póngase en contacto con su representante local de Roche para obtener una lista de pedido detallada para tubos primarios y tubos secundarios, racks de muestras, racks para puntas obstruidas y bandejas de racks compatibles con cada instrumento.

cobas® BKV acepta el tubo primario utilizado para los tipos de muestra de orina obtenidas con **cobas**® PCR Media.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento de prueba, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad de esta prueba, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos y las mezclas de amplificación.

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- El uso de la prueba cobas® BKV para el cribado de la presencia del BKV no se ha evaluado en sangre o productos sanguíneos.
- Todas las muestras de paciente deben tratarse como si fueran infecciosas, utilizando los procedimientos de laboratorio recomendados tal como se describe en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories y en el documento M29-A4 del CLSI.^{15, 16} Solamente el personal competente en la manipulación de material biopeligroso y en el uso de la prueba cobas® BKV y los sistemas cobas® 5800/6800/8800 deberían llevar a cabo este procedimiento.
- Todos los materiales de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosos y manipularse teniendo en cuenta las precauciones generales. En caso de que se produzca un derrame, desinfecte de inmediato con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio o potasio al 0,5 % en agua destilada o desionizada o siga los procedimientos apropiados del laboratorio.
- El cobas® EBV/BKV Control Kit contiene plasma derivado de sangre humana. El análisis del material original realizado mediante métodos de PCR muestra trazas aceptables de niveles bajos de ADN de BKV. Ningún método de prueba conocido puede garantizar totalmente que un producto derivado de la sangre humana no transmita agentes infecciosos.
- **No congele la sangre total ni las muestras de orina almacenadas en tubos primarios.**
- Utilice solo el material fungible suministrado o que se requiera expresamente para garantizar el óptimo rendimiento de la prueba.
- Puede solicitar ficha de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) al representante local de Roche.
- Siga al pie de la letra los procedimientos y las directrices que se suministran para garantizar la correcta realización de la prueba. Cualquier variación de dichos procedimientos y directrices podría afectar al rendimiento óptimo de la prueba.
- Podrían producirse resultados falsos positivos si no se evita la contaminación por arrastre de las muestras durante la manipulación y el procesamiento de las mismas.
- **cobas® PCR Media (de los tubos de muestra primarios) contiene hidrocloreuro de guanidina. Evite el contacto directo entre hidrocloreuro de guanidina y el hipoclorito de potasio o de sodio u otros reactivos altamente reactivos como ácidos o bases. Tales mezclas pueden producir gases nocivos.**
- Si se derrama líquido que contenga hidrocloreuro de guanidina, límpielo con un detergente apto para laboratorio y agua. Si el líquido vertido contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie **PRIMERO** el área afectada con detergente para laboratorio y agua y, a continuación, con una solución de hipoclorito de sodio o potasio al 0,5 %.
- Informe a la autoridad competente local y al fabricante de cualquier incidente grave que pueda tener lugar durante la realización del ensayo.

Manipulación de reactivos

- Manipule todos los reactivos, controles y muestras de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para evitar la contaminación por arrastre de las muestras o los controles.
- Antes de utilizarlos, revise cada casete de reactivo, diluyente, reactivo de lisis y reactivo de lavado para asegurarse de que no hay signos de fugas. No utilice el material si hay alguna evidencia de fuga.
- El **cobas® omni** Lysis Reagent contiene tiocianato de guanidina, una sustancia química potencialmente peligrosa. Evite el contacto de reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua para evitar quemaduras.
- Los kits de la prueba **cobas® BKV**, el **cobas® omni** MGP Reagent y el **cobas® omni** Specimen Diluent contienen azida sódica como conservante. Evite el contacto de reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua para evitar quemaduras. Si se producen salpicaduras de reactivos, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- No permita que el **cobas® omni** Lysis Reagent, que contiene tiocianato de guanidina, entre en contacto con la solución de hipoclorito de sodio o de potasio. Tales mezclas pueden producir gases de alta toxicidad.
- Elimine todos los materiales que hayan estado en contacto con las muestras y los reactivos de acuerdo con la reglamentación nacional, estatal y local.

Buenas prácticas de laboratorio

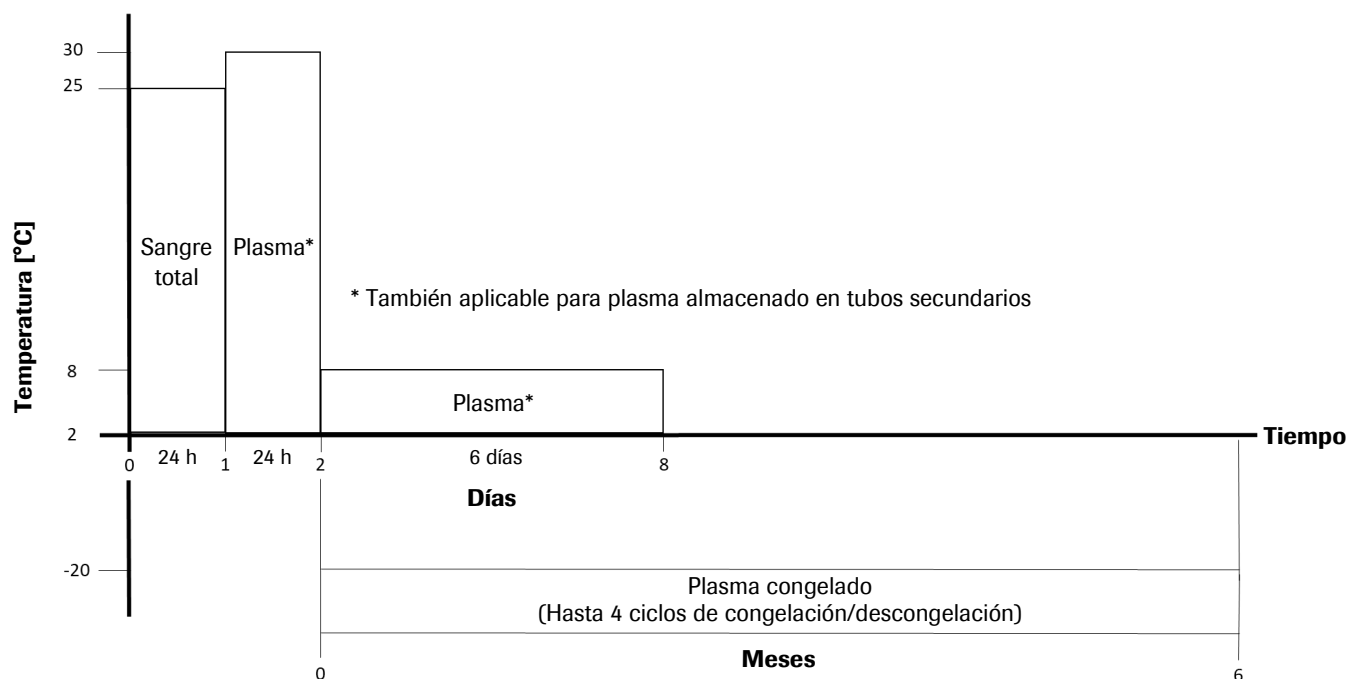
- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo.
- Utilice guantes de laboratorio, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras y los reactivos. Debe cambiarse los guantes entre cada manipulación de muestras y kits **cobas® BKV**, EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+)**C**), EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+)**C**), **cobas® Buffer Negative Control Kit** y reactivos **cobas® omni** para evitar la contaminación. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y de los controles.
- Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit, y cuando se saque los guantes.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio o potasio al 0,5 % en agua destilada o desionizada. A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.
- Si el derrame se produce sobre un instrumento **cobas® 5800** o **cobas® 6800/8800**, siga las instrucciones descritas en la Asistencia al usuario o de los sistemas **cobas® 5800** o **cobas® 6800/8800** para limpiar y descontaminar correctamente la superficie de los instrumentos.

Extracción, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras y los controles como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Muestras de plasma conservadas en EDTA

- Almacene todas las muestras a las temperaturas especificadas. La estabilidad de las muestras se ve afectada por las temperaturas elevadas.
- Si se utilizan muestras congeladas en tubos secundarios, deje que se descongelen a temperatura ambiente (15-30 °C) por completo y, a continuación, agítelas unos instantes (entre 3 y 5 segundos) y centrifúguelas para que todo el volumen de la muestra se deposite en la parte inferior del tubo.
- La sangre total debería recogerse en tubos para preparación de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de pruebas de diagnóstico molecular o en tubos estériles y utilizar EDTA como anticoagulante. Siga las instrucciones del fabricante de los tubos de recogida de muestras. Consulte la Ilustración 1.
- La sangre total recogida en tubos para preparación de plasma BD Vacutainer® PPT™ para métodos de pruebas de diagnóstico molecular o en tubos estériles con EDTA como anticoagulante pueden almacenarse y/o transportarse durante un máximo de 24 horas a una temperatura comprendida entre 2 °C y 25 °C antes de la preparación del plasma. La centrifugación debe realizarse conforme a las instrucciones del fabricante.
- Después de la separación, las muestras de plasma pueden almacenarse durante 24 horas a 2-30 °C en tubos primarios o secundarios y, a continuación:
 - Almacenarse en tubos primarios o secundarios un máximo de 6 días a 2-8 °C.
 - Almacenarse en tubos secundarios un máximo de 6 meses a ≤ -20 °C.
- Las muestras de plasma se mantienen estables hasta un máximo de cuatro ciclos de congelación/descongelación si se congelan a ≤ -20 °C.
- Si las muestras se van a transportar, es recomendable empaquetarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación estatal y/o internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos.

Ilustración 1 Condiciones de almacenamiento de muestras de plasma conservado en EDTA

Muestras de orina

- Utilice únicamente el **cobas®** PCR Urine Sample Kit para recoger y estabilizar las muestras de orina para la prueba **cobas®** BKV. No se ha validado el uso de la prueba **cobas®** BKV con otros tipos de medios o dispositivos de recogida de orina. El uso de la prueba **cobas®** BKV con otros tipos de medios o dispositivos de recogida de orina puede generar resultados falsos negativos, falsos positivos y/o no válidos.
- Las muestras de orina se deben transferir al tubo **cobas®** PCR Media (estabilizadas) de forma inmediata. Si las muestras no se transfieren inmediatamente, se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 30 °C durante un máximo de 24 horas.

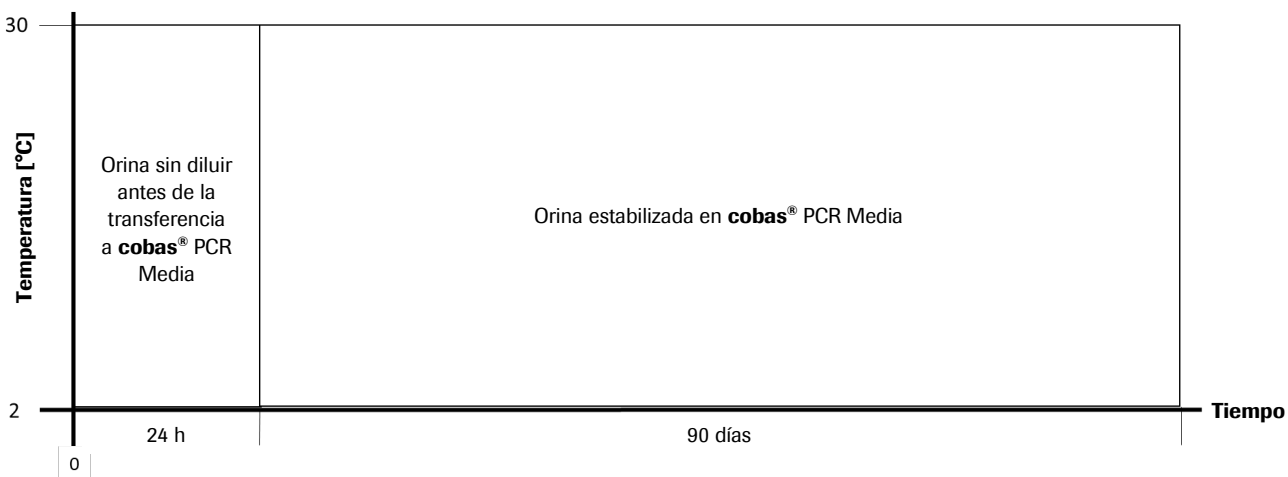
Una vez estabilizadas las muestras de orina en **cobas®** PCR Media, las muestras pueden almacenarse hasta 90 días a 2-30 °C.

Consulte la Ilustración 2.

- Las muestras de orina sin analizar deben presentar la parte superior del nivel de líquido entre las dos líneas negras del visor de la etiqueta del tubo **cobas®** PCR Media. Si el nivel de líquido se encuentra por encima o por debajo de estas líneas, significará que la muestra no se ha recogido correctamente y no se podrá usar para las pruebas.
- Si no hay suficiente volumen de orina (4,3 ml) para la dilución en el tubo de muestra de orina para PCR **cobas®**, la orina puede diluirse manualmente con **cobas®** PCR Media. Antes de realizar la prueba **cobas®** BKV, diluya manualmente un mínimo 0,5 ml de orina sin diluir en **cobas®** PCR Media (proporción 1:1).
- Para evitar la contaminación por arrastre de las muestras procesadas, utilice otros tapones para los tubos **cobas®** PCR Media, de un color distinto (neutro; consulte el apartado **Material adicional necesario**), para volver a tapar las muestras después del análisis.
- Si se necesita un análisis adicional, asegúrese de que haya como mínimo 1,2 ml de muestra restante en el tubo **cobas®** PCR Media.

- Si las muestras se van a transportar, es recomendable empaquetarlas y etiquetarlas de acuerdo con la reglamentación estatal y/o internacional relativa al transporte de muestras y agentes etiológicos.

Ilustración 2 Condiciones de almacenamiento de muestras de orina



Instrucciones de uso

Notas sobre el procedimiento

- No utilice los reactivos **cobas®** BKV, el **cobas®** EBV/BKV Control Kit, el **cobas®** Buffer Negative Control Kit ni ningún reactivo **cobas®** **omni** después de la fecha de caducidad.
- No reutilice el material fungible. Son de un solo uso.
- La prueba **cobas®** BKV puede realizarse con un volumen de muestra mínimo obligatorio de 350 µl para plasma conservado en EDTA (flujo de trabajo de muestras de 200 µl) y de 550 µl para muestras de orina estabilizadas (flujo de trabajo de muestras de 400 µl).
- Las muestras deben estar destapadas y deben cargarse directamente en racks para su procesamiento en el sistema **cobas®** 5800.
- Una sola serie puede combinar varios tipos de muestras (plasma, orina estabilizada).

Ejecución de la prueba **cobas®** BKV en los sistemas **cobas®** 5800/6800/8800

- El funcionamiento del instrumento se describe con detalle en la Asistencia al usuario del sistema **cobas®** 5800 o los sistemas **cobas®** 6800/8800.
- Consulte la Asistencia al usuario del sistema **cobas®** 5800 o los sistemas **cobas®** 6800/8800 para obtener información sobre el correcto mantenimiento de los instrumentos.
- Las muestras de plasma conservado en EDTA y de orina estabilizada deben procesarse utilizando la selección de tipo de muestra de la interfaz de usuario de la prueba **cobas®** BKV, tal como se describe en el paso 2 de la Ilustración 3 y en el paso 1 de la Ilustración 4.

- Asegúrese de que las etiquetas de código de barras de los tubos de muestras puedan verse a través de las aberturas laterales de los racks de muestras RD5 o MPA. Consulte la Asistencia al usuario del sistema **cobas**® 5800 o los sistemas **cobas**® 6800/8800 para conocer las especificaciones de códigos de barras adecuadas e información adicional sobre la carga de tubos de muestras.

Ilustración 3 Procedimiento de la prueba **cobas**® BKV en el sistema **cobas**® 5800

1	Inicie una sesión en el sistema. Pulse el botón “Iniciar” para preparar el sistema.
2	<p>Carga de las muestras en el sistema:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cargue los racks de muestras en el sistema. • El sistema se prepara automáticamente. • Solicite las pruebas. <ul style="list-style-type: none"> ○ Seleccione “Plasma” para solicitar muestras de plasma conservado en EDTA. ○ Seleccione “Orina” para solicitar muestras de orina recogidas en cobas® PCR Media. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Retire el tapón del tubo. ▪ Transfiera el tubo directamente al rack.
3	<p>Cargue los reactivos y el material fungible según las indicaciones del sistema:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cargue el casete de reactivo específico de la prueba. • Cargue los miniracks de control. • Cargue las puntas de procesamiento. • Cargue las puntas de elución. • Cargue las placas de procesamiento. • Cargue las placas de residuos líquidos. • Cargue las placas de amplificación. • Cargue el casete con MGP. • Cargue el diluyente de muestras. • Cargue el reactivo de lisis. • Cargue el reactivo de lavado.
4	Seleccione el botón de inicio de procesamiento en la interfaz de usuario para iniciar la serie analítica. Las series siguientes se iniciarán de forma automática si no se posponen manualmente.
5	Revise y exporte los resultados.
6	<p>Retire y tape todos los tubos de muestra que cumplan los requisitos de volumen mínimo para utilizarlos en el futuro, en caso necesario.</p> <p>Limpieza del instrumento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Descargue los miniracks de control vacíos. • Descargue el casete de reactivo específico de la prueba vacío. • Vacíe el cajón de placas de amplificación. • Vacíe los residuos líquidos. • Vacíe los residuos sólidos.

Ilustración 4 Procedimiento de la prueba cobas® BKV en los sistemas cobas® 6800/8800

1 Inicie una sesión en el sistema.
Pulse el botón “Iniciar” para preparar el sistema.
Solicite las pruebas:

- Seleccione “Plasma” para solicitar muestras de plasma conservado en EDTA.
- Seleccione “Orina” para solicitar muestras de orina recogidas en cobas® PCR Media.

2 Cargue los reactivos y el material fungible según las indicaciones del sistema:

- Cargue el casete de reactivo específico de la prueba.
- Cargue los casetes de control.
- Cargue las puntas de pipeta.
- Cargue las placas de procesamiento.
- Cargue el reactivo MGP.
- Cargue las placas de amplificación.
- Cargue el diluyente de muestras.
- Cargue el reactivo de lisis.
- Cargue el reactivo de lavado.

3 Cargue las muestras en el sistema:

- Para muestras de orina primarias recogidas en cobas® PCR Media.
 - Retire el tapón del tubo.
 - Transfiera el tubo directamente al rack.
- Cargue el rack de muestras y los racks para puntas obstruidas en el módulo de suministro de muestras.
- Confirme que las muestras han sido aceptadas en el módulo de transferencia.

4 Inicie la serie analítica mediante el botón “Iniciar manualmente” de la interfaz de usuario o ejecute un inicio automático después de 120 minutos o cuando la serie esté llena.

5 Revise y exporte los resultados.

6 Retire y tape todos los tubos de muestra que cumplan los requisitos de volumen mínimo para utilizarlos en el futuro, en caso necesario.

Limpie el instrumento:

- Descargue los casetes de control vacíos.
- Vacíe el cajón de placas de amplificación.
- Vacíe los residuos líquidos.
- Vacíe los residuos sólidos.

Resultados

Los sistemas **cobas**® 5800/6800/8800 determinan automáticamente la concentración de ADN del BKV en muestras y controles. La concentración de ADN del BKV se expresa en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

Control de calidad y validez de los resultados en el sistema **cobas**® 5800 y los sistemas **cobas**® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o posterior

- Con cada serie se procesan un **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] y dos controles positivos **cobas**® EBV/BKV, además de un control positivo bajo [EBV/BKV L (+) C] y control positivo alto [EBV/BKV H (+) C] al menos cada 72 horas y con cada lote de kit nuevo. Los controles positivos y/o negativos pueden programarse con mayor frecuencia en función de los procedimientos de laboratorio y/o la reglamentación local.
- Los resultados de los controles se muestran en la app “Controles”.
- En el software y/o el informe, revise los avisos para comprobar la validez de los resultados de la prueba (consulte la Asistencia al usuario de x800 Data Manager para conocer la “Lista de códigos de avisos”).
- Los controles se marcan como “Válido” en la columna “Resultado del control” cuando la diana del control correspondiente se ha notificado como válida. Los controles se marcan como “No válido” en la columna “Resultado del control” cuando la diana del control correspondiente se ha notificado como no válida.
- Los controles marcados como “Invalid” muestran un aviso en la columna “Aviso”. En la vista de detalles podrá encontrar más información sobre el motivo por el que el control se ha notificado como no válido, además de información sobre el aviso.
- Si uno de los controles no es válido, repita el análisis de todos los controles y de todas las muestras asociadas.

El software del instrumento realiza automáticamente la validación de los resultados en función de los resultados de los controles.

NOTA: El sistema **cobas**® 5800 y los sistemas **cobas**® 6800/8800 con versión del software 2.0 o posterior se suministran con la configuración estándar para el análisis de un conjunto de controles (positivo y negativo) con cada serie, pero se puede modificar por un programa menos frecuente de hasta cada 72 horas según los procedimientos de laboratorio y/o la reglamentación local. Póngase en contacto con su ingeniero técnico de Roche y/o con el representante del servicio técnico al cliente de Roche para obtener más información.

Control de calidad y validez de los resultados en los sistemas **cobas**® 6800/8800 con versión del software 1.4

- Con cada serie se procesan un **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] y dos controles positivos **cobas**® EBV/BKV, un control positivo bajo [EBV/BKV L (+) C] y un control positivo alto [EBV/BKV H (+) C].
- Compruebe los avisos y los resultados asociados tanto en el software como en el informe para garantizar la validez de la serie.
- Todas los avisos están descritos en la Asistencia al usuario de los sistemas **cobas**® 6800/8800.
- El lote se considera válido cuando no hay avisos para ninguno de los controles. Si el lote no es válido, es necesario repetir las pruebas para todo el lote.

El software del instrumento realiza automáticamente la validación de los resultados en función de los resultados de los controles.

Avisos de controles en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4

En las series válidas, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software y/o los informes del sistema cobas® 5800 y de los sistemas cobas® 6800/8800. La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

Tabla 14 Avisos de controles para los controles negativo y positivo

Control negativo	Aviso	Resultado	Interpretación
(-) Ctrl	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Un resultado no válido o el resultado del título calculado del control negativo no es negativo.
Control positivo	Aviso	Resultado	Interpretación
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Un resultado no válido o el resultado del título calculado para el control positivo bajo no está dentro del intervalo asignado.
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Serie de control errónea)	Invalid	Un resultado no válido o el resultado del título calculado para el control positivo alto no está dentro del intervalo asignado.

Interpretación de los resultados en los sistemas cobas® 5800/6800/8800

En las series válidas, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software y/o los informes del sistema cobas® 5800 y de los sistemas cobas® 6800/8800. La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

Tabla 15 Resultados de diana para la interpretación de los resultados de la diana individuales

Resultados	Interpretación
Target Not Detected	ADN del BKV no detectado. Los resultados se indican como "BKV no detectado".
< Titer Min ^a	El título calculado está por debajo del límite inferior de cuantificación (LLoQ) del ensayo. Los resultados se indican como "BKV detectado, inferior a (título mínimo)". Título mínimo de plasma en EDTA = 21,5 UI/ml Título mínimo de orina = 200 UI/ml
Título	El título calculado está comprendido en el intervalo lineal del ensayo: mayor o igual que el título mínimo y menor o igual que el título máximo. Los resultados se indican como "(Título) de BKV detectado".
> Titer Max ^b	El título calculado está por encima del límite superior de cuantificación (ULoQ) del ensayo. Los resultados se indican como "BKV detectado, superior a (título máximo)". Título Máximo de plasma en EDTA y orina = 1,0E+08 UI/ml

^a Los resultados de muestra "< Titer Min" (Target Detected < LLoQ) deben ser interpretados junto con otros datos clínicos y no utilizarse como único argumento para las decisiones de tratamiento.

^b El resultado de la muestra "> Titer Max" hace referencia a las muestras positivas para BKV detectadas con títulos superiores al límite superior de cuantificación (ULoQ). Si se desea obtener un resultado cuantitativo para las muestras de plasma conservado en EDTA, es necesario diluir la muestra original con plasma humano negativo para BKV conservado en EDTA y repetir la prueba. Multiplique el resultado comunicado por el factor de dilución.

Interpretación de los resultados en el sistema cobas® 5800 y los sistemas cobas® 6800/8800 con la versión del software 2.0 o superior

Los resultados de las muestras se muestran en la app "Resultados" del software.

En los lotes de control válidos, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software y/o en el informe.

La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Las muestras asociadas con las series de control válidas se muestran como "Válido" en la columna "Resultado del control" cuando el resultado de la diana del control correspondiente se ha notificado como válido. Las muestras asociadas con las series de control erróneas se muestran como "No válido" en la columna "Resultado del control" cuando el resultado de la diana del control correspondiente se ha notificado como no válido.
- Si los controles asociados al resultado de una muestra no son válidos, se añade un aviso específico al resultado de la muestra de la siguiente manera:
 - Q05D: fallo de validación del resultado por un control positivo no válido
 - Q06D: fallo de validación del resultado por un control negativo no válido

- Los valores en la columna “Resultados” para el resultado de la diana de la muestra individual deben interpretarse como se muestra en la Tabla 15 anterior.
- Si una o más dianas de la muestra están marcadas como “No válido”, el software muestra un aviso en la columna de avisos. En la vista de detalles podrá encontrar más información sobre el motivo por el que la(s) diana(s) de la muestra se ha notificado como no válidas, además de información sobre el aviso.

Interpretación de resultados en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4

En las series válidas, compruebe cada muestra para detectar avisos en el software y/o en el informe. La interpretación de resultados se debe realizar del siguiente modo:

- Las muestras presentan un “Yes” en la columna “Válida” si todos los resultados de las dianas solicitadas muestran resultados válidos. Las muestras que presentan un “No” en la columna “Válida” pueden requerir alguna interpretación o acción adicional.
- Los valores para el resultado de la diana de la muestra individual deben interpretarse como se muestra en la Tabla 15 anterior.

Limitaciones del procedimiento

- La prueba **cobas**® BKV se ha evaluado para ser utilizada únicamente en combinación con el **cobas**® EBV/BKV Control Kit, el **cobas**® Buffer Negative Control Kit, el **cobas**® **omni** MGP Reagent, el **cobas**® **omni** Lysis Reagent, el **cobas**® **omni** Specimen Diluent y el **cobas**® **omni** Wash Reagent en los sistemas **cobas**® 5800/6800/8800.
- La obtención de resultados fiables depende de que los procedimientos de recogida, almacenamiento y manipulación de muestras sean adecuados.
- Esta prueba se ha validado únicamente para su uso con muestras de plasma conservado en EDTA y de orina estabilizada. La realización de la prueba **cobas**® BKV con otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos. La cuantificación del nivel de ADN en plasma y orina estabilizada no puede compararse directamente entre sí ni con la de otros tipos de muestras.
- La cuantificación del ADN del BKV puede verse afectada por los métodos de obtención de la muestra, otros factores propios del paciente (tales como edad, presencia de síntomas) y/o el estadio de la infección.
- La degradación del ADN del BKV en orina sin diluir puede afectar a la cuantificación.¹⁷ Es necesario transferir la orina al **cobas**® PCR Media para conseguir estabilizar la muestras.
- Se ha observado una variabilidad cuantitativa de ADN del BKV inherente a la orina en los experimentos de estabilidad de muestras en diferentes momentos de muestreo (orina sin diluir) o en diferentes alícuotas de la misma muestra (orina sin diluir y orina estabilizada en **cobas**® PCR Media).
- A pesar de estas limitaciones, los resultados del ADN del BKV en orina deberían interpretarse con precaución y siempre en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio y bajo ningún concepto debería ser el único motivo para la toma de decisiones sobre el tratamiento.
- La orina puede contener altos niveles de ADN del BKV, lo que supone un riesgo de contaminación por arrastre.¹⁸
- Como sucede con cualquier prueba molecular, las mutaciones en las regiones diana cubiertas por la prueba **cobas**® BKV pueden afectar la unión de cebadores y/o sondas y causar una cuantificación a la baja del virus o incluso impedir su detección.
- Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas antes de cambiar de una a otra. Los usuarios deberán adherirse a las políticas y los procedimientos específicos.
- La prueba **cobas**® BKV no se ha concebido para el cribado de la presencia de BKV en sangre o productos sanguíneos.

Evaluación no clínica del rendimiento

Equivalencia entre sistemas

La equivalencia entre los sistemas cobas® 5800, cobas® 6800 y los cobas® 8800 se demostró a partir de estudios de rendimiento. Los datos incluidos en estas Instrucciones de uso hacen patente la equivalencia de rendimiento entre todos los sistemas.

Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA

Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS

El límite de detección de la prueba cobas® BKV para el 1^{er} estándar internacional de la OMS se determinó mediante el análisis de diluciones en serie del 1^{er} estándar internacional de la OMS para BKV obtenido del NIBSC (NIBSC 14/212), en plasma humano conservado en EDTA negativo para BKV. Se analizaron paneles con seis niveles de concentración más un blanco con tres lotes de reactivo cobas® BKV, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos.

En las Tabla 16 a Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos con el plasma conservado en EDTA. El estudio demuestra que con el lote de menor sensibilidad, la concentración para la que el análisis PROBIT espera una tasa de positividad del 95 % es de 21,5 UI/ml con un intervalo de confianza del 95 % comprendido entre 16,3 y 32,4 UI/ml para plasma conservado en EDTA. La concentración más baja con una tasa de positividad ≥ 95 % es de 19,0 UI/ml en plasma conservado en EDTA.

Tabla 16 Límite de detección en plasma conservado en EDTA, Lote 1

Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	21,5 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 16,3-32,4 UI/ml		

Tabla 17 Límite de detección en plasma conservado en EDTA, Lote 2

Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	19,7 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 15,0-29,2 UI/ml		

Tabla 18 Límite de detección en plasma conservado en EDTA, Lote 3

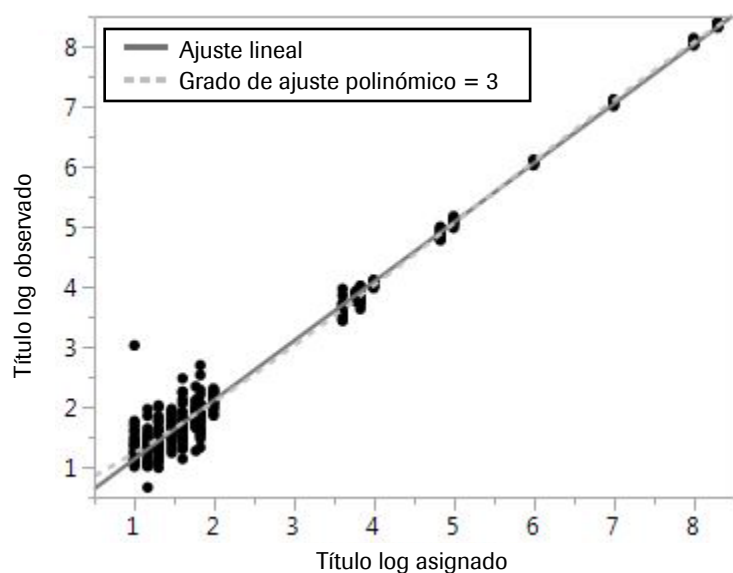
Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	19,3 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 14,8-28,5 UI/ml		

Intervalo lineal

La linealidad de la prueba **cobas**® BKV se evaluó con una serie de diluciones formadas por un panel de 18 miembros del panel con ADN lambda del subgrupo de BKV que cubren todo el intervalo lineal del ensayo. Para preparar los 11 miembros del panel que cubren todo el intervalo lineal se utilizó stock de ADN de lambda de título elevado. Se utilizó una muestra clínica para preparar 7 miembros del panel para los niveles intermedio e inferior del intervalo lineal.

Se analizó cada miembro del panel en 36 réplicas con tres lotes de reactivos **cobas**® BKV. Los resultados se muestran en la Ilustración 5.

Se demostró que la prueba **cobas**® BKV era lineal entre 1,01E+01 y 1,97E+08 UI/ml y presenta una desviación absoluta respecto al mejor ajuste de la regresión no lineal inferior o igual que $\pm 0,1 \log_{10}$ en plasma humano conservado en EDTA (véase la Ilustración 5). A lo largo del intervalo lineal, la exactitud de la prueba fue de $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ilustración 5 Determinación del intervalo lineal para plasma conservado en EDTA**Precisión (intralaboratorio)**

La precisión de la prueba **cobas**® BKV se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de ADN de BKV de título elevado (subgrupo lb) en plasma conservado en EDTA negativo para el BKV. Se analizaron cinco niveles de dilución en 72 réplicas para cada nivel con los tres lotes de reactivo **cobas**® BKV en cuatro instrumentos diferentes y con dos usuarios distintos durante 12 días. Cada muestra se sometió al procedimiento completo de la prueba **cobas**® BKV en los sistemas **cobas**® 6800/8800 totalmente automatizados. Por lo tanto, la precisión a la que se hace referencia en este documento engloba todas las fases del procedimiento de la prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

La prueba **cobas**® BKV presentó una alta precisión para los tres lotes de reactivo analizados en un intervalo de concentración comprendido entre $9,83E+01$ UI/ml y $9,83E+05$ UI/ml.

Tabla 19 Precisión intralaboratorio de la prueba **cobas**® BKV*

Concentración nominal [UI/ml]	Concentración asignada [UI/ml]	Plasma conservado en EDTA			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos los lotes
		SD	SD	SD	SD agrupada
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

* Se considera que los datos de título cuentan con una distribución log-normal y se analizan según la transformación de \log_{10} . Las columnas de desviaciones estándar (SD) presentan el total del título log-transformado para cada uno de los tres lotes de reactivo.

Verificación de los subtipos

El rendimiento de la prueba cobas® BKV con los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV de BKV se evaluó mediante:

- Verificación del límite de detección
- Verificación del intervalo lineal

Verificación del límite de detección para los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV

El ADN de BKV para los cinco subtipos/subgrupos diferentes (Ia, Ic, II, III y IV) se diluyó con tres niveles de concentración diferentes en plasma conservado en EDTA negativo para el BKV. La determinación de la tasa de positividad se llevó a cabo con 63 réplicas para cada nivel. El análisis se realizó con tres lotes de reactivos cobas® BKV utilizando varias series, en días diferentes, con usuarios e instrumentos distintos. Los resultados demuestran que la prueba cobas® BKV es capaz de detectar el ADN del BKV para cinco genotipos/subgrupos diferentes en concentraciones de 21,5 UI/ml con una tasa de positividad ≥ 95 %.

Verificación del intervalo lineal para los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV

La serie de diluciones utilizada para la verificación del estudio de linealidad de los subtipos/subgrupos de la prueba cobas® BKV estaba formada por panel de ocho miembros con el que se cubre el intervalo lineal del ensayo. El análisis se realizó con tres lotes de reactivos cobas® BKV con los que se analizaron 12 réplicas por nivel en plasma conservado en EDTA.

Se verificó el intervalo lineal de la prueba cobas® BKV para todos los cinco subtipos/subgrupos (Ia, Ic, II, III y IV).

Especificidad

La especificidad de la prueba cobas® BKV se determinó mediante el análisis de muestras de plasma conservadas en EDTA negativas para el BKV obtenidas de donantes individuales. Se analizaron 104 muestras individuales de plasma conservado en EDTA con tres lotes de reactivo de cobas® BKV. Todas las muestras dieron negativo para ADN del BKV. En el panel de la prueba, la especificidad de la prueba cobas® BKV fue del 100 % (intervalo de confianza unilateral inferior del 95 %: 97,16 %).

Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba cobas® BKV se evaluó mediante el análisis de un panel de microorganismos con una concentración de $1,00E+06$ unidades/ml (UFC/ml, células/ml, UCC/ml, UFI/ml) para bacterias y levadura y entre $1,00E+05$ unidades/ml y $1,00E+06$ unidades/ml (copias/ml, TCID₅₀/ml, UI/ml, células/ml) para virus. Los microorganismos se diluyeron en plasma humano conservado en EDTA negativo para ADN del BKV y en plasma humano conservado en EDTA con 100 UI/ml de ADN del BKV. En la Tabla 20 se indican los organismos específicos analizados. Se analizó cada muestra en réplicas de tres. Ninguno de los patógenos distintos del BKV interfirió en el rendimiento de la prueba con las concentraciones analizadas. La prueba cobas® BKV generó resultados negativos para todas las muestras de microorganismos sin fragmento diana del BKV y resultados positivos para todas las muestras de microorganismos con fragmento diana del BKV. Además, el título log₁₀ medio de cada una de las muestras positivas para el BKV con organismos de posible reacción cruzada se situó en $\pm 0,5$ log₁₀ del título log₁₀ medio del control positivo respectivo añadido.

Tabla 20 Microorganismos analizados para reactividad cruzada

Virus	Bacterias	Levadura
Adenovirus tipo 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Citomegalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus de Epstein-Barr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus de la hepatitis B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Virus de la hepatitis C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Virus del herpes simple tipo 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Virus del herpes simple tipo 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Virus del herpes humano tipo 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virus del herpes humano tipo 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Virus del herpes humano tipo 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Virus de inmunodeficiencia humana 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Virus de inmunodeficiencia humana 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Virus del papiloma humano	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Virus JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus del simio 40	-	-
Virus de la varicela-zóster	-	-

Especificidad analítica: sustancias interferentes

Se analizaron niveles elevados de triglicéridos (33 g/l), bilirrubina conjugada (0,2 g/l), bilirrubina no conjugada (0,2 g/l), albúmina (60 g/l), hemoglobina (2 g/l) y ADN humano (2 mg/l) en muestras en presencia (100 UI/ml) y ausencia de ADN del BKV. El análisis de las sustancias interferentes endógenas demostró que no interferían con el rendimiento de la prueba cobas® BKV.

También se analizaron los compuestos farmacológicos de la Tabla 21 con una concentración tres veces superior a la C_{max} tanto en presencia como en ausencia de ADN del BKV.

Se ha demostrado que ninguna de las posibles sustancias interferentes afecta al rendimiento de la prueba. La prueba cobas® BKV generó resultados negativos para todas las muestras sin fragmento diana del BKV y resultados positivos para todas las muestras con fragmento diana del BKV. Además, el título \log_{10} medio de cada una de las muestras positivas para el BKV con sustancias potencialmente interferentes se situó en $\pm 0,5 \log_{10}$ del título \log_{10} medio del control positivo respectivo añadido.

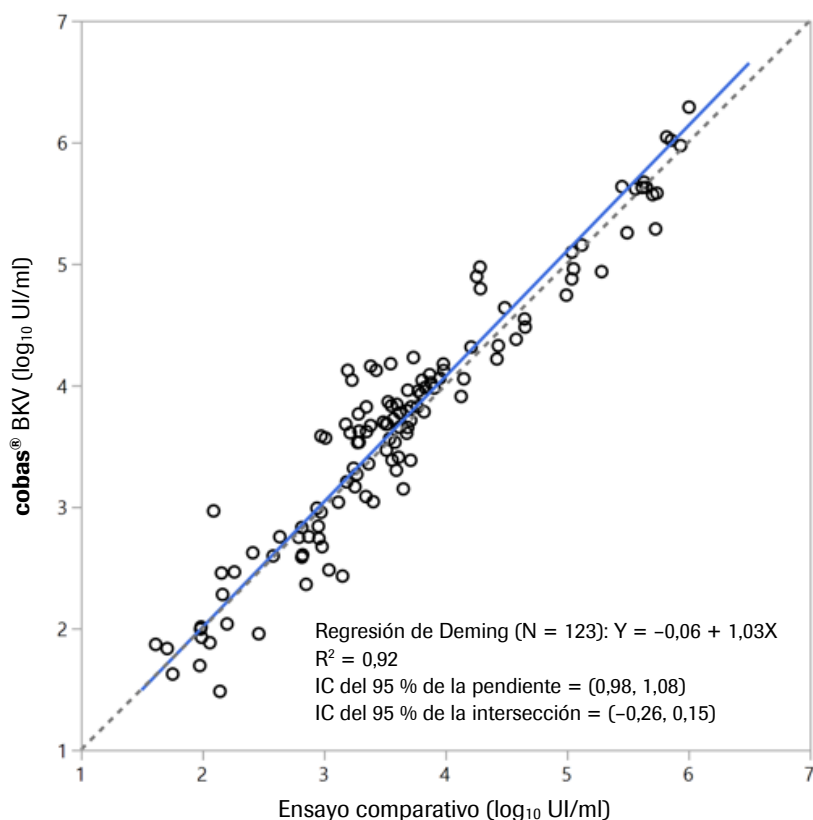
Tabla 21 Compuestos farmacológicos analizados para la interferencia mediante cuantificación del ADN del BKV con la prueba cobas® BKV

Clase de fármaco	Nombre genérico del fármaco	
Antimicrobiano	Cefotetan	Sulfametoxazol
	Clavulanato de potasio	Ticarcilina disódica
	Fluconazol	Trimetoprima
	Piperacilina	Vancomicina
	Tazobactam sódico	Micafungina
Compuestos para el tratamiento de los virus del herpes	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Inmunosupresores	Azatioprina	Prednisona
	Ciclosporina	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Micofenolato mofetil	Ácido micofenólico

Correlación de métodos

El rendimiento de la prueba cobas® BKV se determinó mediante un ensayo comparativo a través del análisis de muestras de plasma conservado en EDTA obtenidas de pacientes infectados con el BKV. Las muestras de plasma conservado en EDTA, dentro del intervalo de cuantificación de ambas pruebas, se analizaron como réplicas individuales. Se realizó el análisis de la regresión de Deming.

En la Ilustración 6 se muestran los resultados de la regresión de Deming.

Ilustración 6 Análisis de regresión de la prueba cobas® BKV vs. ensayo comparativo**Fallo de todo el sistema**

La tasa de fallo de todo el sistema para la prueba cobas® BKV se determinó mediante el análisis de 100 réplicas de plasma conservado en EDTA a las que se añadió una muestra clínica positiva para BKV. Estas muestras se analizaron con una concentración de $3 \times \text{LoD}$.

Los resultados del estudio indican que todas las réplicas fueron válidas y positivas para la diana del BKV, lo que representa una tasa de fallo de todo el sistema del 0 % (intervalo de confianza unilateral superior del 95 % de 2,95 %).

Contaminación por arrastre

La tasa de contaminación por arrastre de la prueba cobas® BKV se determinó mediante el análisis de 240 réplicas de una muestra de matriz negativa al BKV y de 225 réplicas de una muestra de ADN de BKV de título elevado con una concentración aproximada de $2,00\text{E}+07$ UI/ml. En total, se realizaron cinco series con muestras positivas y negativas utilizando un método de ensayo con configuración de tablero de ajedrez.

Las 240 réplicas de la muestra negativa resultaron negativas, por lo que la tasa de contaminación cruzada fue del 0 % (intervalo de confianza unilateral superior del 95 % de 1,24 %).

Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de orina

Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS

El límite de detección de la prueba cobas® BKV para el estándar internacional de la OMS se determinó mediante el análisis de diluciones en serie del 1º estándar internacional de la OMS para el BKV obtenido del NIBSC (NIBSC 14/212), en pooles de orina estabilizada en cobas® PCR Media negativos para BKV. Se analizaron paneles con seis niveles de concentración más un blanco con tres lotes de reactivo cobas® BKV, con múltiples series analíticas, días, operadores e instrumentos.

Los resultados para los pooles de orina estabilizada en cobas® PCR Media se muestran de la Tabla 22 a la Tabla 24. El estudio demuestra que con el lote de menor sensibilidad, la concentración para la que el análisis PROBIT espera una tasa de positividad del 95 % es de 12,2 UI/ml con un intervalo de confianza del 95 % comprendido entre 9,2 y 18,3 UI/ml para la orina sin diluir. La concentración más baja con una tasa de positividad ≥ 95 % es de 10,0 UI/ml en orina sin diluir.

Tabla 22 Límite de detección en orina, Lote 1

Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)*	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	12,2 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 9,2-18,3 UI/ml		

* Muestras de orina analizadas estabilizadas en cobas® PCR Media. Concentración del título de entrada utilizada para el cálculo basada en la orina sin diluir.

Tabla 23 Límite de detección en orina, Lote 2

Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)*	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	11,9 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 9,2-17,3 UI/ml		

* Muestras de orina analizadas estabilizadas en **cobas**® PCR Media. Concentración del título de entrada utilizada para el cálculo basada en la orina sin diluir.

Tabla 24 Límite de detección en orina, Lote 3

Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)*	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	10,1 UI/ml Intervalo de confianza del 95 %: 7,8-14,7 UI/ml		

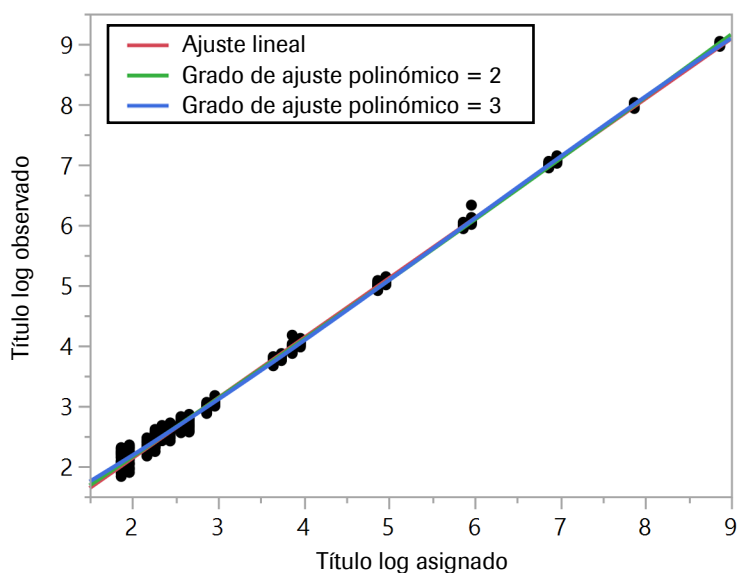
* Muestras de orina analizadas estabilizadas en **cobas**® PCR Media. Concentración del título de entrada utilizada para el cálculo basada en la orina sin diluir.

Intervalo lineal

La linealidad de la prueba **cobas**® BKV se evaluó con una serie de diluciones formadas por un panel de 10 miembros con una muestra clínica (subgrupo Ib de BKV) que cubren todo el intervalo lineal del ensayo. Para preparar los 12 miembros del panel que cubren todo el intervalo lineal se utilizó stock de ADN de lambda de título elevado.

Se analizó cada miembro del panel en 36 réplicas con tres lotes de reactivos **cobas**® BKV. Los resultados se muestran en la Ilustración 7.

Se demostró que la prueba **cobas**® BKV era lineal entre 7,41E+01 UI/ml y 7,41E+08 UI/ml y presenta una desviación absoluta respecto al mejor ajuste de la regresión no lineal inferior o igual que $\pm 0,1 \log_{10}$ en pool de orina estabilizada en **cobas**® PCR Media (véase la Ilustración 7). A lo largo del intervalo lineal, la exactitud de la prueba fue de $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ilustración 7 Determinación del intervalo lineal para orina**Precisión (intralaboratorio)**

La precisión de la prueba **cobas®** BKV se determinó mediante el análisis de diluciones en serie de ADN de BKV de título elevado (subgrupo lb) en pools de orina estabilizados en **cobas®** PCR Media negativos para el BKV. Se analizaron cinco niveles de dilución en 72 réplicas para cada nivel con los tres lotes de reactivo **cobas®** BKV en dos instrumentos diferentes y con dos usuarios distintos durante 12 días. Cada muestra se sometió al procedimiento completo de la prueba **cobas®** BKV en los sistemas **cobas®** 6800/8800 totalmente automatizados. Por lo tanto, la precisión a la que se hace referencia en este documento engloba todas las fases del procedimiento de la prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

La prueba **cobas®** BKV presentó una alta precisión para los tres lotes de reactivo analizados en un intervalo de concentración comprendido entre 7,41E+02 UI/ml y 7,41E+05 UI/ml.

Tabla 25 Precisión intralaboratorio de la prueba **cobas®** BKV*

Concentración nominal [UI/ml]	Concentración asignada [UI/ml]	Orina estabilizada en cobas® PCR Media			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos los lotes
		SD	SD	SD	SD agrupada
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

* Se considera que los datos de título cuentan con una distribución log-normal y se analizan según la transformación de \log_{10} . Las columnas de desviaciones estándar (SD) presentan el total del título log-transformado para cada uno de los tres lotes de reactivo.

Verificación de los subtipos

El rendimiento de la prueba cobas® BKV con los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV de BKV se evaluó mediante:

- Verificación del límite de detección
- Verificación del intervalo lineal

Verificación del límite de detección para los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV

El ADN de BKV para los cinco subtipos/subgrupos diferentes (Ia, Ic, II, III y IV) se diluyó con tres niveles de concentración diferentes en pools de orina estabilizada en cobas® PCR Media negativos para el BKV. La determinación de la tasa de positividad se llevó a cabo con 63 réplicas para cada nivel. El análisis se realizó con tres lotes de reactivos cobas® BKV utilizando varias series, en días diferentes, con usuarios e instrumentos distintos. Los resultados demuestran que la prueba cobas® BKV es capaz de detectar el ADN del BKV para cinco genotipos/subgrupos diferentes en concentraciones de 12,2 UI/ml con una tasa de positividad ≥ 95 %.

Verificación del intervalo lineal para los subtipos I (incluidos los subgrupos Ia y Ic), II, III y IV

La serie de diluciones utilizada para la verificación del estudio de linealidad de los subtipos/subgrupos de la prueba cobas® BKV estaba formada por panel de ocho miembros con el que se cubre el intervalo lineal del ensayo. El análisis se realizó con tres lotes de reactivos cobas® BKV con los que se analizaron 12 réplicas por nivel en orina estabilizada en cobas® PCR Media.

Se verificó el intervalo lineal de la prueba cobas® BKV para todos los cinco subtipos/subgrupos (Ia, Ic, II, III y IV).

Especificidad

La especificidad de la prueba cobas® BKV se determinó mediante el análisis de muestras de orina estabilizadas en cobas® PCR Media negativas para el BKV obtenidas de donantes individuales. Se analizaron 100 muestras individuales de orina con tres lotes de reactivo de cobas® BKV. Todas las muestras dieron negativo para ADN del BKV. En el panel de la prueba, la especificidad de la prueba cobas® BKV fue del 100 % (intervalo de confianza unilateral inferior del 95 %: 97,05 %).

Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba cobas® BKV se evaluó mediante el análisis de un panel de microorganismos con una concentración de 1,00E+06 unidades/ml y 2,00E+06 unidades/ml (UFC/ml, células/ml, UCC/ml, UFI/ml) para bacterias y levadura y de 1,00E+05 unidades/ml (copias/ml, TCID₅₀/ml, UI/ml, células/ml) para virus. Los microorganismos se diluyeron en orina negativa para ADN del BKV y en orina con 600 UI/ml de ADN del BKV. En la Tabla 26 se indican los organismos específicos analizados. Se analizó cada muestra en réplicas de tres. Ninguno de los patógenos distintos del BKV interfirió en el rendimiento de la prueba con las concentraciones analizadas. La prueba cobas® BKV generó resultados negativos para todas las muestras de microorganismos sin fragmento diana del BKV y resultados positivos para todas las muestras de microorganismos con fragmento diana del BKV. Además, el título log₁₀ medio de cada una de las muestras positivas para el BKV con organismos de posible reacción cruzada se situó en $\pm 0,5$ log₁₀ del título log₁₀ medio del control positivo respectivo añadido.

Tabla 26 Microorganismos analizados para reactividad cruzada

Virus	Bacterias	Bacterias	Levadura
Virus del herpes simple 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus del papiloma humano 16	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida glabrata</i>
-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	-
-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
-	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus oralis/viridans</i>	-
-	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
-	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
-	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-
-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-
-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-
-	<i>Morganella morganii</i>	-	-

Especificidad analítica: sustancias interferentes

Se analizaron niveles elevados de albúmina (0,5 % p/v), bilirrubina conjugada (1 % p/v), glucosa (1 % p/v), células mono-nucleares de sangre periférica (1,00E+06 células/ml), moco (en presencia de 1 frotis de moco por 4,3 ml de muestra), pH ácido (pH 4), pH alcalino (pH 9), semen (1 frotis sumergido en semen por 4,3 ml de muestra), sodio (300 mEq/l) y sangre total (10 % v/v) en muestras en presencia (600 UI/ml) y ausencia de ADN del BKV. El análisis de las sustancias interferentes endógenas demostró que no interferían con el rendimiento de la prueba **cobas**® BKV.

También se analizaron los compuestos farmacológicos de la Tabla 27 tanto en presencia como en ausencia de ADN del BKV.

Se ha demostrado que ninguna de las posibles sustancias interferentes afecta al rendimiento de la prueba, salvo el polvo de talco. El polvo de talco a una concentración de $\leq 0,05$ % no presentó interferencias con la prueba **cobas**® BKV. La prueba **cobas**® BKV generó resultados negativos para todas las muestras sin fragmento diana del BKV y resultados positivos para todas las muestras con fragmento diana del BKV. Además, el título \log_{10} medio de cada una de las muestras positivas para el BKV con sustancias potencialmente interferentes se situó en $\pm 0,5 \log_{10}$ del título \log_{10} medio del control positivo respectivo añadido.

Tabla 27 Compuestos farmacológicos analizados para la interferencia mediante cuantificación del ADN del BKV con la prueba cobas® BKV

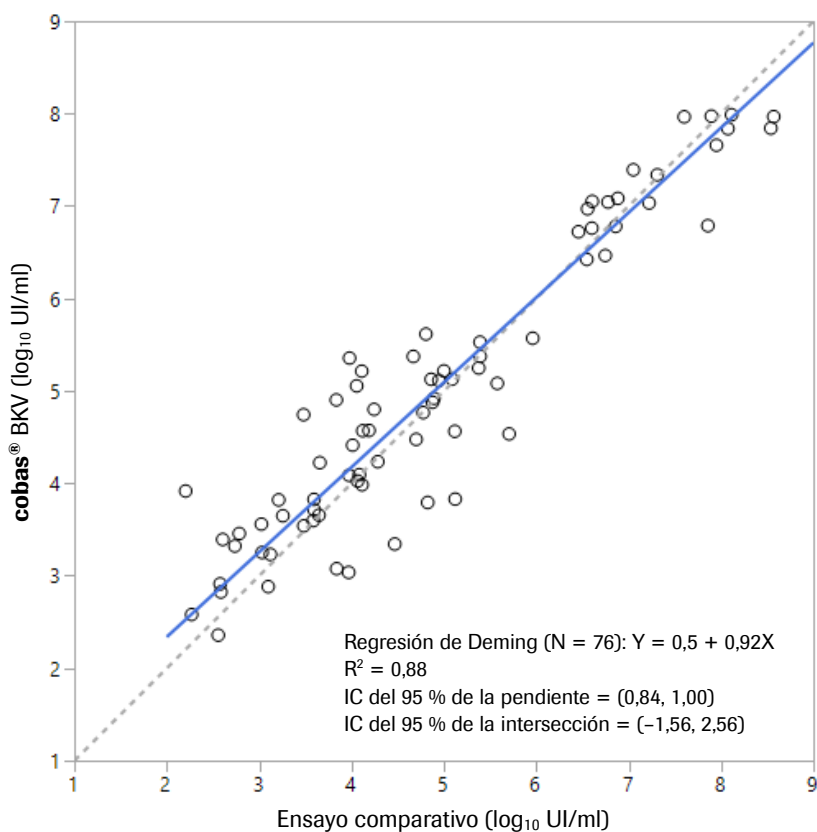
Clase de fármaco	Ingrediente activo	Concentración	Nombre genérico del fármaco
Antimicrobiano	Clotrimazol	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazol	701 µmol/l	Arilin rapid Supositorios vaginales Crema Vagi Metro Gel Nidazea
Hormona esteroidea estrógeno	Estradiol	4,41 nmol/l	Estrace
Analgésicos	Clorhidrato de fenazopiridina	200 µg/ml	Azo Standard
	Acetaminofeno	1324 µmol/l	Acetaminofeno
Lubricante	Glicol de propileno	1000 µg/ml	Ultragel K-Y
Fármaco antiinflamatorio no esteroideo	Ácido acetilsalicílico	3,62 mmol/l	Ácido acetilsalicílico
	Naproxeno	2170 µmol/l	Naproxeno
	Ibuprofeno	2425 µmol/l	Ibuprofeno
No aplicable	Talco	0,05 % (p/v)	Polvos de talco

Correlación de métodos

El rendimiento de la prueba cobas® BKV se determinó mediante un ensayo comparativo a través del análisis de muestras de orina obtenidas de pacientes infectados con el BKV. Las muestras de orina dentro del intervalo de cuantificación de ambas pruebas se analizaron como réplicas individuales. Se realizó el análisis de la regresión de Deming.

En la Ilustración 8 se muestran los resultados de la regresión de Deming.

Ilustración 8 Análisis de regresión de la prueba cobas® BKV vs. ensayo comparativo



Contaminación por arrastre

La tasa de contaminación por arrastre de la prueba cobas® BKV se determinó mediante el análisis de 240 réplicas de una muestra de matriz negativa al BKV y de 225 réplicas de una muestra de ADN de BKV de título elevado con una concentración aproximada de $1,00E+09$ UI/ml. En total, se realizaron cinco series con muestras positivas y negativas utilizando un método de ensayo con configuración de tablero de ajedrez.

Las 240 réplicas de la muestra negativa resultaron negativas, por lo que la tasa de contaminación cruzada fue del 0,0 % (intervalo de confianza unilateral superior del 95 % de 1,24 %).

Evaluación clínica del rendimiento

Reproducibilidad de la prueba cobas® BKV para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA

La reproducibilidad de la prueba cobas® BKV se evaluó en relación con diversos factores (lote de reactivo, centro de análisis, serie y días de análisis) que pudieran afectar a los resultados comunicados en las pruebas clínicas de rutina. La evaluación se llevó a cabo en 3 centros de análisis con 3 lotes de reactivo y un panel de muestras positivas y negativas que dio lugar a un total de 270 pruebas por concentración (sin incluir los controles). Los paneles estaban compuestos por plasma conservado en EDTA negativo para la IgG anti ACV del BKV, y analizados para detectar el BKV con un protocolo de liberación NAT en plasma, a los que posteriormente se añadió un estándar internacional de la OMS para el BKV o ADN de cultivo de virus del genotipo Ib (el más común) del BKV. Dos usuarios de cada centro analizaron cada lote de reactivo durante 5 días. Se llevaron a cabo dos series analíticas (1 serie analítica = 1 serie; 1 serie = 1 panel + 3 controles) cada día y en cada serie analítica se analizaron 3 réplicas de cada miembro del panel. Los resultados de la evaluación se resumen en la Tabla 28.

Tabla 28 Porcentaje atribuible de la variación total (%TV), la desviación estándar (SD) de la precisión total y el CV (%) lognormal de la concentración de ADN del BKV (\log_{10} UI/ml) por miembro positivo del panel

Concentración de ADN de BKV esperada (\log_{10} UI/ml)	Concentración de ADN de BKV media observada ^a (\log_{10} UI/ml)	Número de pruebas ^b	%TV del lote ^c (CV%) ^d	%TV del centro ^c (CV%) ^d	%TV del día/operador ^c (CV%) ^d	%TV de la serie ^c (CV%) ^d	%TV de la intraserie ^c (CV%) ^d	Precisión total SD ^e	CV (%) lognormal de la precisión total ^d
1,81	1,74	270	9 % (20,63)	6 % (17,69)	0 % (0,00)	7 % (19,15)	78 % (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10 % (9,79)	10 % (9,57)	14 % (11,44)	25 % (15,16)	40 % (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3 % (4,42)	24 % (13,46)	0 % (0,00)	56 % (20,58)	17 % (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7 % (5,66)	28 % (11,50)	0 % (0,00)	40 % (13,85)	25 % (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4 % (3,27)	49 % (11,00)	0 % (0,00)	13 % (5,60)	34 % (9,10)	0,068	15,74

^a Calculada mediante el procedimiento SAS MIXED.

^b Número de pruebas válidas con nivel de ADN detectable.

^c %TV = Contribución porcentual a la variación total.

^d CV% = Coeficiente porcentual lognormal de la variación = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Cálculo realizado utilizando la variabilidad total del procedimiento SAS MIXED.

Nota: la tabla únicamente incluye resultados con nivel de ADN detectable. SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; BKV = virus BK.

La prueba **cobas**® BKV mostró una reproducibilidad clínica aceptable en diversas concentraciones a lo largo del intervalo lineal. Además, el sistema detectó el 100 % de las muestras $3 \times \text{LLOQ}$. Los sistemas **cobas**® 6800 y **cobas**® 8800 comparten un diseño modular y tuvieron un funcionamiento equivalente cuando se utilizó la prueba **cobas**® BKV. Todos los límites de confianza del 95 % estimados para la diferencia entre 2 mediciones de la misma persona se situaron en $\pm 0,84 \log_{10}$ UI/ml, lo que indica que el ensayo puede evaluar los cambios en los niveles de ADN del BKV que se consideran clínicamente significativos.

De las 270 pruebas válidas para los miembros negativos del panel realizadas en los sistemas **cobas**® 6800/8800, todas las muestras generaron un resultado “Target Not Detected”, por lo que el porcentaje de concordancia de negativos (PCN) fue del 100 % con un IC exacto del 95 % del 98,6 % al 100 %.

Rendimiento de la prueba **cobas® BKV para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA**

El rendimiento clínico de la prueba **cobas**® BKV se evaluó además en tres centros de análisis mediante la medición de los niveles de ADN del BKV en muestras clínicas (diluidas y sin diluir) de pacientes infectados y no infectados por BKV y muestras artificiales de plasma conservadas en EDTA a las que se añadió cultivo de virus BKV y su posterior comparación con una prueba de ácidos nucleicos desarrollada en laboratorio (LDT) consolidada (LDT de comparación del BKV). De todas las muestras analizadas con la prueba **cobas**® BKV y la prueba de comparación del BKV, un total de 550 muestras (217 muestras clínicas sin diluir y 303 diluidas de 129 personas trasplantadas y 30 muestras artificiales) resultaron válidas para ambos ensayos y evaluables para el análisis de la concordancia clínica (Tabla 29).

Tabla 29 Análisis de concordancia entre la prueba **cobas®** BKV y la prueba LDT de comparación con respecto a los resultados de ADN del BKV para todas las muestras

cobas® BKV (log ₁₀ UI/ml)	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) Target Not Detected	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) < LLoQ (< 2,3)	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) De 2,3 a < 3,0	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) De 3,0 a < 3,7	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) De 3,7 a 4,4	LDT de comparación del BKV (log ₁₀ UI/ml) > 4,4	Total
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
De 2,3 a < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
De 3,0 a < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
De 3,7 a 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Total	130	61	85	133	70	71	550
Concordancia de columna (%)	(130/130) 100,0 %	(61/61) 100,0 %	(80/85) 94,1 %	(133/133) 100,0 %	(69/70) 98,6 %	(71/71) 100,0 %	-
(IC con porcentaje del 95 %)ª	(97,1 %, 100 %)	(94,1 %, 100,0 %)	(87,0 %, 97,5 %)	(97,2 %, 100,0 %)	(92,3 %, 99,7 %)	(94,9 %, 100,0 %)	-

Nota: CI = intervalo de confianza; LLoQ = límite inferior de cuantificación de la LDT de comparación del BKV (200 UI/ml = 2,3 log₁₀ UI/ml). Desviación estándar de la LDT de comparación del BKV estimada a 0,37 log₁₀ UI/ml (estudio de precisión analítica con LDT del BKV de la Universidad de Indiana). La concentración del analito de 3,0 log₁₀ UI/ml representó el LLoQ + 2σ, 3,7 log₁₀ UI/ml representó el LLoQ + 4σ y 4,4 log₁₀ UI/ml representó LLoQ + 6σ con un intervalo de rango de 2σ. En la tabla se incluyen los pares de muestras evaluables para el análisis de la concordancia clínica.

ª Independencia asumida entre todas las muestras.

Se definieron los resultados discordantes como aquellos alejados de la diagonal en más de un cuadro (indicados con sombreado). Para la concordancia de la columna Target Not Detected (TND) con LDT, se combinaron las celdas de Diana no detectada con **cobas®** BKV y < LLoQ (< 2,3). El motivo para añadir las células adyacentes < LLoQ y Diana no detectada para la columna Diana no detectada reside en que la diferencia entre Diana no detectada y < LLoQ no es clínicamente significativa pero sí que lo es analíticamente en el extremo inferior del rango de medición, por lo que pueden verse afectadas por errores aleatorios.

De las 43 muestras negativas para ADN del BKV recogidas para la estimación del porcentaje de concordancia de negativos (PCN) con la prueba **cobas®** BKV, 43 muestras resultaron negativas según **cobas®** BKV y, por lo tanto, el PCN fue del 100 % con un IC exacto del 95 % del 91,8 % al 100 %.

La concordancia entre la prueba **cobas®** BKV y la LDT de comparación del BKV también se evaluó utilizando distintos umbrales clínicos (Tabla 30).

Tabla 30 Resumen de concordancia entre la prueba **cobas**® BKV y la prueba LDT de comparación del BKV con distintos umbrales para todas las muestras

Umbrales*	Porcentaje de concordancia < umbral del IC del 95 % (n/N)	Porcentaje de concordancia ≥ umbral del IC del 95 % (n/N)
Target Not Detected	82,3 % (107/130) (74,8 %, 87,9 %)	97,1 % (408/420) (95,1 %, 98,4 %)
LLoQ (2,3 log ₁₀ UI/ml)	98,4 % (188/191) (95,5 %, 99,5 %)	87,7 % (315/359) (83,9 %, 90,7 %)
3,0 log ₁₀ UI/ml	99,6 % (275/276) (98,0 %, 99,9 %)	77,0 % (211/274) (71,7 %, 81,6 %)
4,0 log ₁₀ UI/ml	100,0 % (447/447) (99,1 %, 100,0 %)	67,0 % (69/103) (57,4 %, 75,3 %)

Nota: Las muestras con resultados "Target Not Detected" se han categorizado como "< valor umbral en UI/ml".

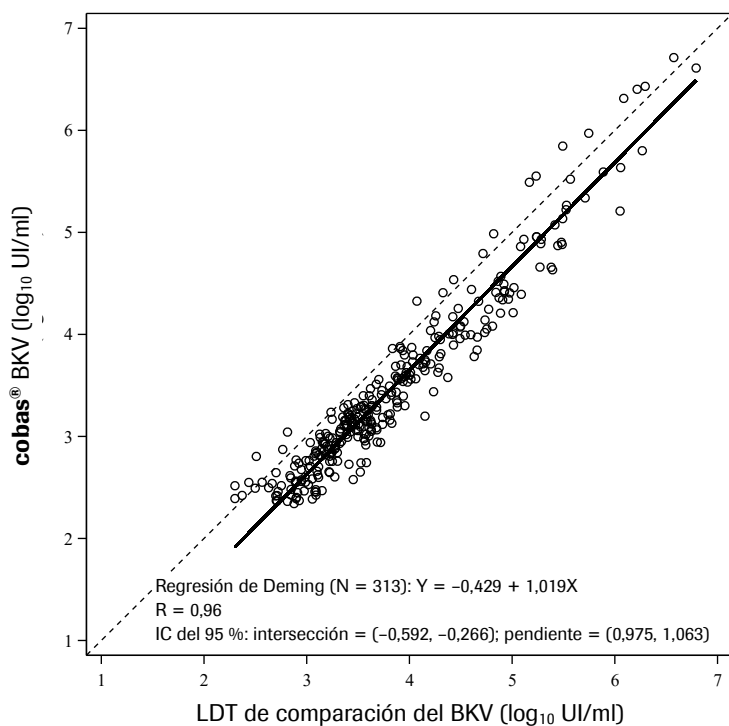
LLoQ = límite inferior de cuantificación de la LDT de comparación del BKV (200 UI/ml = 2,3 log₁₀ UI/ml).

Intervalo de confianza (IC) del 95 % calculado por el método de puntuación de Wilson asumiendo la independencia entre todas las muestras.

* Umbrales de 1000 UI/ml = 3,0 log₁₀ UI/ml y 10.000 UI/ml = 4,0 log₁₀ UI/ml.

De todas las muestras analizadas con la prueba **cobas**® BKV que resultaron positivas para BKV con la prueba de comparación del BKV, un total de 313 (133 muestras clínicas diluidas y 159 sin diluir procedentes de 68 personas trasplantadas y 21 muestras artificiales) resultaron evaluables para el análisis de correlación realizado en los tres centros de análisis (Ilustración 9).

Ilustración 9 Correlación entre la prueba **cobas®** BKV y la LDT de comparación del BKV para todas las muestras: gráfico de regresión lineal de Deming de los niveles de ADN (\log_{10} UI/ml)



Un gráfico de sesgo adicional de las diferencias del nivel de ADN indicó una diferencia sistemática entre ambos ensayos que se mantiene constante en el intervalo lineal superpuesto. El IC del 95 % de la intersección de la línea ajustada en los gráficos de sesgo fue del $-0,404$ al $-0,168$, lo que se sitúa en $\pm 0,74 \log_{10}$ UI/ml (± 2 veces la desviación estándar de la precisión analítica de la LDT de comparación del BKV). Asimismo, el sesgo medio se estimó en $-0,357 \log_{10}$ UI/ml y utilizando la ecuación de la línea ajustada en los gráficos de sesgo, la diferencia sistemática entre ensayos fue de $-0,343 \log_{10}$ UI/ml y de $-0,362 \log_{10}$ UI/ml para las muestras con unos niveles de ADN de 3 y 4 \log_{10} UI/ml, respectivamente.

Reproducibilidad de la prueba **cobas®** BKV para el tipo de muestra de orina estabilizada

La reproducibilidad de la prueba **cobas®** BKV se evaluó en relación con diversos factores (lote de reactivo, centro de análisis, serie y días de análisis) que pudieran afectar a los resultados comunicados en las pruebas clínicas de rutina. La evaluación se llevó a cabo en 3 centros de análisis con 3 lotes de reactivo y un panel de muestras positivas y negativas que dio lugar a un total de 270 pruebas por concentración (sin incluir los controles). Los paneles estaban compuestos por orina estabilizada con **cobas®** PCR Media confirmada como negativa para ADN del BKV mediante un protocolo de liberación de ácidos nucleicos (NAT) en orina a la que posteriormente se añadió un estándar internacional de la OMS para el BKV o con ADN de cultivo de virus del genotipo Ia del BKV. Dos usuarios de cada centro analizaron cada lote de reactivo durante 5 días. Se llevaron a cabo dos series analíticas (1 serie analítica = 1 serie; 1 serie = 1 panel + 3 controles) cada día y en cada serie analítica se analizaron 3 réplicas de cada miembro del panel. Los resultados de la evaluación se resumen en la Tabla 31.

Tabla 31 Porcentaje atribuible de la variación total (%TV), la desviación estándar (SD) de la precisión total y el CV (%) lognormal de la concentración de ADN del BKV (\log_{10} UI/ml) por miembro positivo del panel (orina estabilizada)

Concen- tración de ADN del BKV esperada	Concen- tración de ADN de BKV media observada ^a	Número de pruebas ^b	%TV del lote ^c (CV%) ^d	%TV del centro ^c (CV%) ^d	%TV del día/ operador ^c (CV%) ^d	%TV de la serie ^c (CV%) ^d	%TV de la intraserie ^c (CV%) ^d	Precisión total SD ^e	Precisión total CV (%) ^d
2,78	2,92	270	59 % (12,64)	0 % (1,15)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	40 % (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47 % (8,14)	2 % (1,62)	8 % (3,31)	0 % (0,00)	43 % (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38 % (5,02)	2 % (1,28)	6 % (2,07)	0 % (0,00)	53 % (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21 % (3,12)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	79 % (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2 % (1,51)	19 % (4,84)	6 % (2,79)	0 % (0,00)	73 % (9,53)	0,048	11,17

Nota: la tabla únicamente incluye resultados con nivel de ADN detectable. SD = desviación estándar; CV = porcentaje del coeficiente de variación; BKV = virus de BK.

^a Calculada mediante el procedimiento SAS MIXED.

^b Número de pruebas válidas con nivel de ADN detectable.

^c %TV = Contribución porcentual a la variación total.

^d CV% = Coeficiente porcentual lognormal de la variación = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Cálculo realizado utilizando la variabilidad total del procedimiento SAS MIXED.

La prueba **cobas**® BKV mostró una reproducibilidad clínica aceptable en diversas concentraciones a lo largo del intervalo lineal. Además, el sistema detectó el 100 % de las muestras $3 \times$ LLoQ. Los sistemas **cobas**® 6800 y **cobas**® 8800 comparten un diseño modular y tuvieron un funcionamiento equivalente cuando se utilizó la prueba **cobas**® BKV. Todos los límites de confianza del 95 % estimados para la diferencia entre 2 mediciones de la misma persona se situaron en $\pm 0,20 \log_{10}$ UI/ml, lo que indica que el ensayo puede evaluar los cambios en los niveles de ADN del BKV que se consideran clínicamente significativos. El sistema mostró una concordancia de porcentaje de negativos del 99,26 % con un IC entre 97,3 % y 99,9 %. De las 270 pruebas válidas para los miembros negativos del panel, 2 muestras (0,74 %) presentaron un nivel de ADN con una positividad $<$ LLoQ. Un examen posterior de estos resultados demostró que no estaban asociados a un instrumento/centro o lote de reactivos en concreto. Una secuenciación adicional del ADN confirmó la presencia del BKV. Las secuencias identificadas del BKV fueron distintas a las del control positivo y a la cepa del BKV utilizada para la preparación del panel, lo que excluye la contaminación durante la preparación del panel y sugiere la presencia de rastros de viruria en una de las 25 muestras de orina del pool de muestras de orina utilizado para la preparación del panel negativo.

Rendimiento de la prueba cobas® BKV para el tipo de muestra de orina estabilizada

El rendimiento clínico de la prueba cobas® BKV se evaluó además en tres centros de análisis mediante la medición de los niveles de ADN del BKV en muestras clínicas de orina de pacientes infectados y no infectados por BKV estabilizadas en cobas® PCR Media y su posterior comparación con una prueba LDT consolidada (LDT de comparación del BKV).

De todas las muestras analizadas con la prueba cobas® BKV y la prueba de comparación del BKV, un total de 308 muestras de orina sin diluir estabilizadas en cobas® PCR Media de 84 personas trasplantadas resultaron válidas para ambos ensayos y evaluables para el análisis de la concordancia clínica (Tabla 32).

Tabla 32 Análisis de concordancia entre la prueba cobas® BKV y la prueba LDT de comparación con respecto a los resultados de ADN del BKV (\log_{10} UI/ml) para todas las muestras (orina estabilizada)

cobas® BKV (\log_{10} UI/ml)	LDT de comparación del BKV Target Not Detected	LDT de comparación del BKV < LLoQ (< 3,0)	LDT de comparación del BKV De 3,0 a < 3,3	LDT de comparación del BKV De 3,3 a < 3,6	LDT de comparación del BKV De 3,6 a 3,9	LDT de comparación del BKV > 3,9	Total
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
De 3,0 a < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
De 3,3 a < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
De 3,6 a 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Total	66	30	8	16	18	170	308
Concordancia de columna (%)	(66/66) 100,0%	(30/30) 100,0%	(6/8) 75,0%	(14/16) 87,5%	(18/18) 100,0%	(169/170) 99,4%	-
(IC con porcentaje del 95 %)ª	(94,5 %, 100,0 %)	(88,6 %, 100,0 %)	(40,9 %, 92,9 %)	(64,0 %, 96,5 %)	(82,4 %, 100,0 %)	(96,7 %, 99,9 %)	-

Nota: CI = intervalo de confianza; LLoQ = límite inferior de cuantificación de la LDT de comparación del BKV ($1000 \text{ UI/ml} = 3,0 \log_{10} \text{ UI/ml}$); LDT = prueba desarrollada en laboratorio; BKV = virus BK.

Desviación estándar de la LDT de comparación del BKV estimada a $0,15 \log_{10} \text{ UI/ml}$ (estudio de validación con LDT de comparación del BKV). La concentración del analito de $3,3 \log_{10} \text{ UI/ml}$ representó el $\text{LLoQ} + 2\sigma$, $3,6 \log_{10} \text{ UI/ml}$ representó el $\text{LLoQ} + 4\sigma$ y $3,9 \log_{10} \text{ UI/ml}$ representó $\text{LLoQ} + 6\sigma$ con un intervalo de rango de 2σ .

En la tabla se incluyen los pares de muestras evaluables para el análisis de la concordancia clínica.

ª Independencia asumida entre todas las muestras.

La secuenciación del ADN en las muestras representativas de personas con resultados caracterizados por una desviación constante de más de 1 log₁₀ UI/ml del nivel de ADN no reveló ningún error de coincidencia de la secuencia para dianas del cebador o la sonda para el ensayo cobas® BKV. Se definieron los resultados discordantes como aquellos alejados de la diagonal en más de un cuadro (indicados con sombreado). Para la concordancia de la columna Target Not Detected (TND) con LDT, se combinaron las celdas de Target Not Detected con cobas® BKV y < LLoQ (< 3,0). El motivo para añadir las células adyacentes < LLoQ y Diana no detectada para la columna Diana no detectada reside en que la diferencia entre Diana no detectada y < LLoQ no es clínicamente significativa pero sí que lo es analíticamente en el extremo inferior del rango de medición, por lo que pueden verse afectadas por errores aleatorios. De las 66 muestras negativas para ADN del BKV recogidas para la estimación del porcentaje de concordancia de negativos (PCN) con la prueba cobas® BKV, 61 muestras obtuvieron resultados válidos, siendo las 61 muestras negativas según la prueba cobas® BKV y, por lo tanto, el PCN fue del 100 % con un IC exacto del 95 % del 94,1 % al 100 %.

La concordancia entre la prueba cobas® BKV y la LDT de comparación del BKV también se evaluó utilizando distintos umbrales clínicos (Tabla 33).

Tabla 33 Resumen de concordancia entre la prueba cobas® BKV y la prueba LDT de comparación del BKV con distintos umbrales para todas las muestras (orina estabilizada)

Umbral*	Porcentaje de concordancia < umbral del IC del 95 % (n/N)	Porcentaje de concordancia ≥ umbral del IC del 95 % (n/N)
Target Not Detected	93,9 % (62/66) (85,4 %, 97,6 %)	97,5 % (236/242) (94,7 %, 98,9 %)
LLoQ (3,0 log ₁₀ UI/ml)	97,9 % (94/96) (92,7 %, 99,4 %)	99,5 % (211/212) (97,4 %, 99,9 %)
4,0 log ₁₀ UI/ml	90,9 % (130/143) (85,1 %, 94,6 %)	99,4 % (164/165) (96,6 %, 99,9 %)
7,0 log ₁₀ UI/ml	97,2 % (242/249) (94,3 %, 98,6 %)	94,9 % (56/59) (86,1 %, 98,3 %)

Nota: Las muestras con resultados "Target Not Detected" se han categorizado como "< valor umbral en UI/ml".

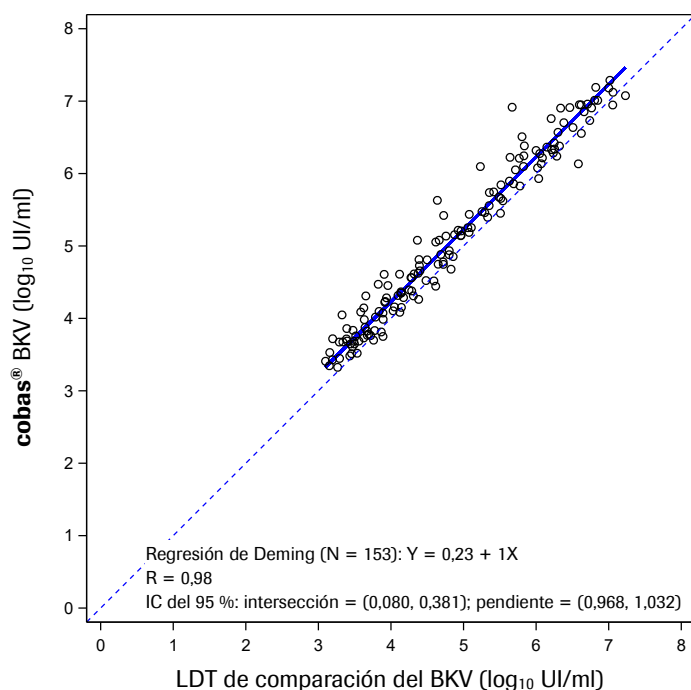
LLoQ = límite inferior de cuantificación de la LDT de comparación del BKV (1000 UI/ml = 3,0 log₁₀ UI/ml).

Intervalo de confianza (IC) del 95 % calculado por el método de puntuación de Wilson asumiendo la independencia entre todas las muestras.

* Umbrales de 10.000 UI/ml = 4,0 log₁₀ UI/ml y 10.000.000 UI/ml = 7,0 log₁₀ UI/ml.

De todas las muestras analizadas con la prueba cobas® BKV que resultaron positivas para BKV con la prueba de comparación del BKV, un total de 153 muestras de orina sin diluir estabilizadas en cobas® PCR Media procedentes de 55 personas trasplantadas resultaron evaluables para el análisis de correlación realizado en los tres centros de análisis (Ilustración 10).

Ilustración 10 Correlación entre la prueba cobas® BKV y la LDT de comparación del BKV para todas las muestras: gráfico de regresión lineal de Deming de los niveles de ADN (\log_{10} UI/ml) (orina estabilizada)



Un gráfico de sesgo adicional de las diferencias del nivel de ADN indicó una diferencia sistemática entre ambos ensayos que se mantiene constante en el intervalo lineal superpuesto. El IC del 95 % de la intersección de la línea ajustada en los gráficos de sesgo fue del 0,168 al 0,488, lo que se sitúa en $\pm 0,5 \log_{10}$ UI/ml. Asimismo, el sesgo medio se estimó en $0,231 \log_{10}$ UI/ml y utilizando la ecuación de la línea ajustada en los gráficos de sesgo, la diferencia sistemática entre ensayos fue de $0,248 \log_{10}$ UI/ml y de $0,188 \log_{10}$ UI/ml para las muestras con unos niveles de ADN de $4 \log_{10}$ UI/ml y $7 \log_{10}$ UI/ml, respectivamente.

Información adicional

Características principales de la prueba





















































Tipo de muestra	Plasma conservado en EDTA	Orina estabilizada en cobas ® PCR Media
Cantidad mínima de muestra necesaria	350 µl*	550 µl*
Volumen de procesamiento de muestras	200 µl	400 µl
Sensibilidad analítica	21,5 UI/ml (intervalo de confianza bilateral del 95 %: 16,3-32,4 UI/ml)	12,2 UI/ml (intervalo de confianza bilateral del 95 %: 9,2-18,3 UI/ml)
Intervalo lineal	De 21,5 UI/ml a 1E+08 UI/ml	De 200 UI/ml a 1E+08 UI/ml
Especificidad	100 %	100 %
Subtipos detectados	Subtipos I (incluidos los subgrupos Ia, Ib y Ic), II, III y IV del BKV	

* Volumen muerto de 150 µl identificado para los tubos secundarios **cobas**® **omni**. Otros tubos utilizados para el análisis pueden tener un volumen muerto diferente y requerir un volumen mínimo menor o mayor. Póngase en contacto con su representante local del servicio técnico de Roche para obtener más información.

Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

Tabla 34 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de PCR para diagnóstico de Roche

 Edad o fecha de nacimiento	 Dispositivo no apto para análisis en el lugar de asistencia al paciente	 UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo no apto para autodiagnóstico	 Número de serie
 Intervalo asignado (copias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)</i>	 Centro
 Intervalo asignado (UI/ml)	 No deben reutilizarse	 Procedimiento estándar
 Representante autorizado en la Comunidad Europea	 Mujeres	 Esterilizado con óxido de etileno
 Hoja de datos del código de barras	 Para evaluación del rendimiento IVD únicamente	 Almacenar en la oscuridad
 Código de lote	 Número mundial de artículo comercial	 Límite de temperatura
 Riesgo biológico	 Importador	 Archivo de definición de pruebas
 Número de catálogo	 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado hacia arriba
 Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> .	 Límite inferior del intervalo asignado	 Procedimiento ultrasensible
 Fecha de recogida	 Hombres	 Identificador único del producto
 Consulte las instrucciones de uso	 Fabricante	 Límite superior del intervalo asignado
 Suficiente para <n> pruebas	 Control negativo	 Línea de llenado de orina
 Contenido del kit	 Sin esterilizar	 Para los EE. UU.: Precaución: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.
 Control	 Nombre del paciente	 Fecha de caducidad
 Fecha de fabricación	 Número del paciente	
 Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente	 Abrir aquí	
 Dispositivo para autodiagnóstico	 Control positivo	
	 Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.	

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su afiliada local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante e importador

Tabla 35 Fabricante e importador



Roche Molecular Systems, Inc.
 1080 US Highway 202 South
 Branchburg, NJ 08876, USA
www.roche.com

Fabricado en los EE. UU.



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany

Marcas registradas y patentes

Consulte <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Derechos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Str. 116
 68305 Mannheim
 Germany



Bibliografía

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nিকেleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Preventions, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 4.0 12/2024	<p>Se ha añadido información sobre la versión 2.0 del software del sistema para los sistemas cobas® 6800/8800.</p> <p>Se ha añadido el código NIBSC: 14/212 para el Estándar internacional de la OMS.</p> <p>Se ha actualizado la visualización de los ejemplos de resultados en los sistemas cobas® 6800/8800 con versión del software 1.4.</p> <p>Se ha eliminado las referencias P/N del material fungible; la información detallada sobre el material fungible se encuentra en la Asistencia al usuario de los sistemas cobas® 5800 y cobas® 6800/8800.</p> <p>Se ha eliminado el símbolo "Rx Only" en la primera página.</p> <p>Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p>

Puede consultar el resumen del informe de seguridad y rendimiento en el siguiente enlace:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.