

cobas[®] **BKV**

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

Para diagnóstico in vitro

cobas[®] BKV	P/N: 08688249190
cobas[®] EBV/BKV Control Kit	P/N: 08688214190
cobas[®] Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190

Tabla de contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación de la prueba.....	4
Reactivos y materiales.....	7
Reactivos y controles de cobas® BKV.....	7
Reactivos cobas omni para la preparación de muestras	10
Requisitos de almacenamiento y manipulación.....	11
Material adicional necesario.....	12
Instrumentos y software necesarios.....	13
Precauciones y requisitos de manipulación	13
Advertencias y precauciones	13
Manipulación de reactivos.....	14
Buenas prácticas de laboratorio.....	14
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	15
Muestras de plasma conservadas en EDTA	15
Muestras de orina	16
Instrucciones de uso.....	17
Notas sobre el procedimiento.....	17
Ejecución de la prueba cobas® BKV	17
Resultados.....	19
Control de calidad y validez de los resultados.....	19
Interpretación de los resultados	20
Limitaciones del procedimiento.....	20

Evaluación no clínica del rendimiento 21

Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de plasma conservado en EDTA ...	21
Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS.....	21
Intervalo lineal.....	22
Precisión (intralaboratorio).....	23
Verificación de los subtipos.....	24
Especificidad.....	24
Especificidad analítica.....	24
Sustancias interferentes	26
Correlación de métodos.....	27
Fallo de todo el sistema.....	27
Contaminación por arrastre.....	28
Características clave de rendimiento para el tipo de muestra de orina.....	28
Límite de detección (LoD) del estándar internacional de la OMS.....	28
Intervalo lineal.....	30
Precisión (intralaboratorio).....	31
Verificación de los subtipos.....	31
Especificidad.....	32
Especificidad analítica.....	32
Sustancias interferentes	33
Correlación de métodos.....	35
Contaminación por arrastre.....	35

Información adicional 36

Características principales de la prueba.....	36
Símbolos	37
Fabricante y distribuidores	38
Marcas registradas y patentes.....	38
Copyright	38
Bibliografía.....	39
Revisión del documento.....	40

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 la carga viral del 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 el cobas® 6800 System y el cobas® 8800 System. 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.

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. Los **cobas**® 6800/8800 Systems 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 **cobas**® 6800/8800, que asigna los resultados de la prueba a todas las pruebas como fragmento diana no detectado, ADN de BKV detectado < LLoQ (límite de cuantificación inferior), ADN de BKV detectado > ULoQ (límite de cuantificación superior) 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 tres 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 en la Tabla 2, la Tabla 4, la Tabla 7 y la Tabla 9.

Consulte los apartados **Reactivos y materiales** y **Precauciones y requisitos de manipulación** para obtener información sobre los peligros del producto.

Tabla 1 cobas® BKV

cobas® BKV Almacenar a 2-8 °C Casete para 192 pruebas (P/N 08688249190)		
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 EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. EUH208: Contiene subtilisina. 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 sulfóxido de dimetilo, 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, < 0,1 % de ADN polimerasa Z05D, < 0,10 % de enzima AmpErase (uracil-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 (P/N 08688214190)			
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 x 0,5 ml)	 <p>ADVERTENCIA H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. 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 [n.º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º CE 220-239-6] (3:1)</p>
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 x 0,5 ml)	 <p>ADVERTENCIA H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. 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 [n.º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º CE 220-239-6] (3:1)</p>

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

** Sustancia peligrosa.

Tabla 3 cobas® Buffer Negative Control Kit

cobas® Buffer Negative Control Kit		
Almacenar a 2-8 °C (P/N 07002238190)		
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, tampón 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 ditiotretitol***, citrato de sodio dihidratado	4 × 875 ml	 <p>PELIGRO</p> <p>H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. H314: Provoca quemaduras graves y lesiones oculares graves. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/ los vapores/el aerosol. P273: Evítese su liberación al medio ambiente. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. 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. 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

* Estos reactivos no están incluidos en el kit de la prueba **cobas® BKV**. Consulte el listado de material adicional necesario (Tabla 7).

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

*** Sustancia peligrosa.

Requisitos de almacenamiento y manipulación

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

Cuando los reactivos no están cargados en los cobas® 6800/8800 Systems, 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 – 192	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

Los reactivos cargados en los cobas® 6800/8800 Systems se almacenan a la temperatura correspondiente adecuada y el sistema controla su fecha de caducidad. Los cobas® 6800/8800 Systems solamente permiten utilizar los reactivos cuando se cumplen todas las condiciones indicadas en la Tabla 6. El sistema evita automáticamente el uso de reactivos caducados. La Tabla 6 ayuda al usuario a entender las condiciones de manipulación de los reactivos de los cobas® 6800/8800 Systems.

Tabla 6 Condiciones de caducidad de los reactivos de los cobas® 6800/8800 Systems

Reactivo	Fecha de caducidad del kit	Estabilidad del kit abierto	Serie en las que se puede utilizar el kit	Periodo de estabilidad (horas acumuladas de carga fuera de la nevera)
cobas® BKV – 192	No caducado	90 días desde el primer uso	Máx. 40 series	Máx. 40 horas
cobas® EBV/BKV Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 8 horas
cobas® Buffer Negative Control Kit	No caducado	No aplicable ^a	No aplicable	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni MGP Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Specimen Diluent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable
cobas omni Wash Reagent	No caducado	30 días desde la carga*	No aplicable	No aplicable

^a Reactivos de un solo uso

* El tiempo se calcula desde la primera vez que se carga el reactivo en los cobas® 6800/8800 Systems.

Material adicional necesario

Tabla 7 Materiales y fungibles para el uso en los **cobas®** 6800/8800 Systems

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Bolsa para residuos sólidos y recipiente de residuos sólidos o Bolsa para residuos sólidos con complemento y kit del cajón	07435967001 y 07094361001 o 08030073001 y 08387281001
Recipiente de residuos sólidos	07094361001
Tubos secundarios cobas omni 13 × 75 (opcional)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (opcional)	07958064190

* Se necesitan racks MPA de 16 mm y racks RD5 para la prueba **cobas®** BKV. Los racks MPA de 16 mm son los racks necesarios para cargar tubos secundarios de **cobas®** PCR Media en el **cobas®** 6800/8800 System. 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.

Tabla 8 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

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 necesario instalar el software **cobas**® 6800/8800 y el paquete de análisis **cobas**® BKV en los instrumentos. El IG (Instrument Gateway) se suministra con el sistema.

Tabla 9 Instrumentos

Equipo	P/N
cobas ® 6800 System (opción móvil)	05524245001 y 06379672001
cobas ® 6800 System (fijo)	05524245001 y 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Módulo de suministro de muestras	06301037001

Nota: **cobas**® BKV acepta el tubo primario utilizado para los tipos de muestra de orina obtenidas con **cobas**® PCR Media. Para obtener información adicional, consulte la Asistencia al usuario o la Guía del usuario de los **cobas**® 6800/8800 Systems.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, 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 **cobas**® 6800/8800 Systems 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 0,6 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10) 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 Hojas 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 sodio (lejía) 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 0,6 %.

Manipulación de reactivos

- Manipule todos los reactivos, controles y muestras de acuerdo con las 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 (lejía). 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, 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 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 0,6 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.

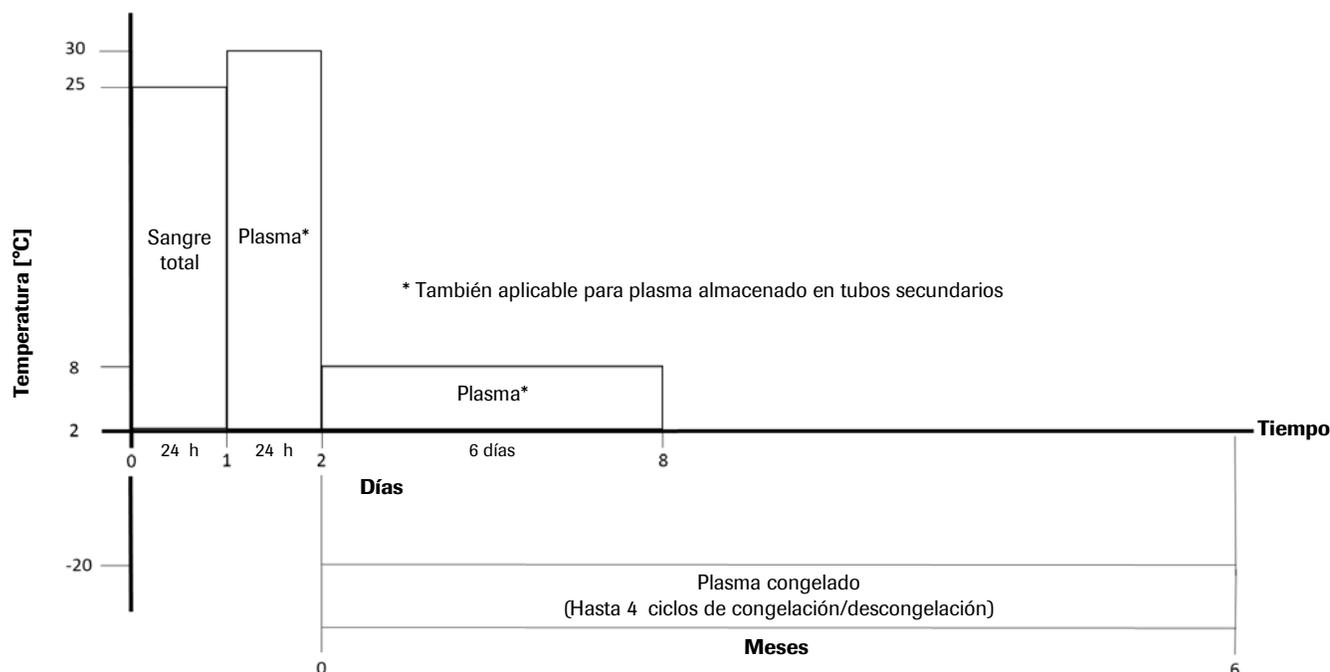
- Si el derrame se produce sobre un instrumento cobas® 6800/8800, siga las instrucciones descritas en la Asistencia al usuario o la Guía del usuario de los cobas® 6800/8800 Systems para limpiar y descontaminar correctamente la superficie de los instrumentos.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

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

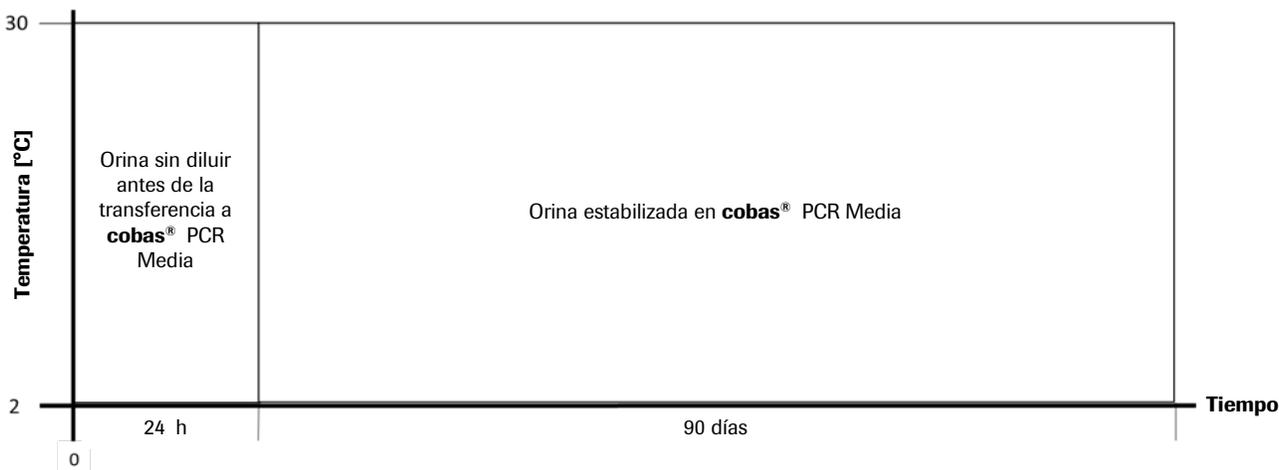
Muestras de plasma conservadas en EDTA

- 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. Es de un solo uso.
- 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 Guía del usuario de los **cobas®** 6800/8800 Systems para conocer las especificaciones de códigos de barras adecuadas e información adicional sobre la carga de tubos de muestras.
- Consulte la Asistencia al usuario y/o la Guía del usuario de los **cobas®** 6800/8800 Systems para obtener información sobre el correcto mantenimiento de los instrumentos.

Ejecución de la prueba **cobas®** BKV

cobas® BKV puede analizarse con un volumen de muestra mínimo necesario de 350 µL para plasma conservado en EDTA y de 550 µL para muestras de orina estabilizadas. El procedimiento de análisis del instrumento se describe con detalle en la Asistencia al usuario o la Guía del usuario de los **cobas®** 6800/8800 Systems. En la Ilustración 3 se resume el procedimiento.

- Las muestras deben estar destapadas y deben cargarse directamente en racks para su procesamiento en los **cobas®** 6800/8800 Systems.
- Una sola serie puede combinar varios tipos de muestras (plasma, orina estabilizada).
- 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 1 de la Ilustración 3.

Ilustración 3 Procedimiento de la prueba cobas® BKV

1	<p>Inicie sesión en el sistema. Pulse el botón “Iniciar” para preparar el sistema. Solicite las pruebas.</p> <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.
2	<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 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	<p>Cargue las muestras en el sistema.</p> <ul style="list-style-type: none">• Para muestras de orina primarias recogidas en cobas® PCR Media.<ul style="list-style-type: none">○ 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	<p>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.</p>
5	<p>Revisión y exportación de los resultados.</p>
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>Limpie el instrumento.</p> <ul style="list-style-type: none">• Descargue los casetes de control vacíos.• Vacíe el cajón de placas de amplificación.• Vacíe los residuos líquidos.• Vacíe los residuos sólidos.

Resultados

Los cobas® 6800/8800 Systems 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

- Con cada serie se procesan un control negativo [(-) C] y dos controles positivos: 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 cobas® 6800/8800 como en el informe para garantizar la validez de la serie.
- La serie se considera válida siempre y cuando no haya avisos para ninguno de los tres controles, es decir, el control negativo y los dos controles positivos: EBV/BKV L(+)C, EBV/BKV H(+)C. El resultado del control negativo se muestra como (-) C, mientras que los controles positivos bajo y alto se presentan como EBV/BKV L(+)C y EBV/BKV H(+)C.

El software cobas® 6800/8800 invalida automáticamente los resultados cuando los controles positivos y negativos fallan.

Avisos de controles

Tabla 10 Avisos de controles para los controles negativo y positivo

Control negativo	Aviso	Resultado	Interpretación
(-) C	Q02 (Serie de control errónea)	No válido	Un resultado inválido 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)	No válido	Un resultado inválido 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)	No válido	Un resultado inválido o el resultado del título calculado para el control positivo alto no está dentro del intervalo asignado.

Si la serie de control no es válida, repita todas las pruebas de la serie afectada.

Interpretación de los resultados

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

- Una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como inválidos.

Tabla 11 Resultados de diana para la interpretación de los resultados de diana individuales

Resultados	Interpretación
Target Not Detected	ADN del BKV no detectado. Los resultados se indican como “BKV no detectado”.
< Titer Min	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
Titer	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 ^a	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 El resultado de muestra “> Titer Max” hace referencia a las muestras positivas para BKV detectadas con títulos superiores al límite de cuantificación superior (ULoQ). Si se desea obtener un resultado cuantitativo, 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.

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 **cobas**® 6800/8800 Systems.
- 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

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 estándar internacional de la OMS se determinó mediante el análisis de diluciones en serie del 1º 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 12 a Tabla 14 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 12 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 13 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 14 Límite de detección en plasma conservado en EDTA, Lote 3

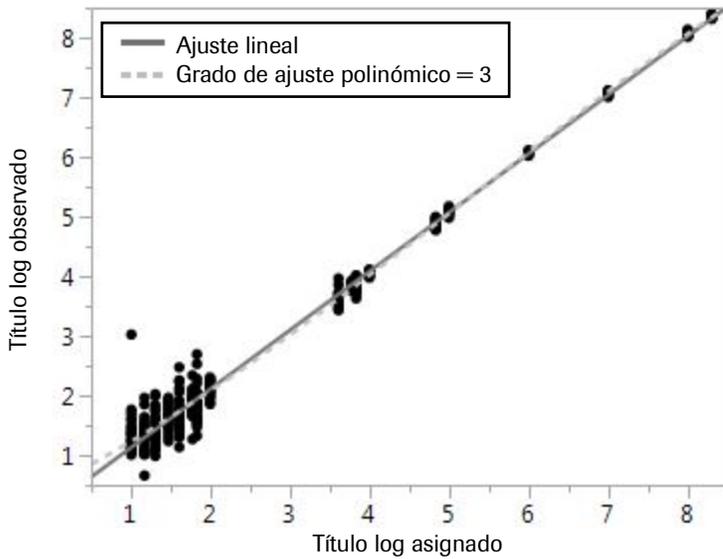
Concentración del título de entrada (ADN del BKV en UI/ml)	Número de réplicas válidas	Número de positivos	Tasa de posit. en %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD según PROBIT con una tasa de positividad del 95 %	19,3 UI/ml Intervalo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

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 4). En el intervalo lineal, la exactitud de la prueba estuvo comprendida entre $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ilustración 4 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 **cobas**® 6800/8800 Systems 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 15.

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 15 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, 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 16 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 \log_{10} medio de cada una de las muestras positivas para el BKV con organismos de posible reacción cruzada se situó en $\pm 0,5 \log_{10}$ del título \log_{10} medio del control positivo respectivo añadido.

Tabla 16 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		

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 17 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 17 Compuestos farmacológicos analizados para la interferencia mediante cuantificación del ADN del BKV con la prueba cobas® BKV

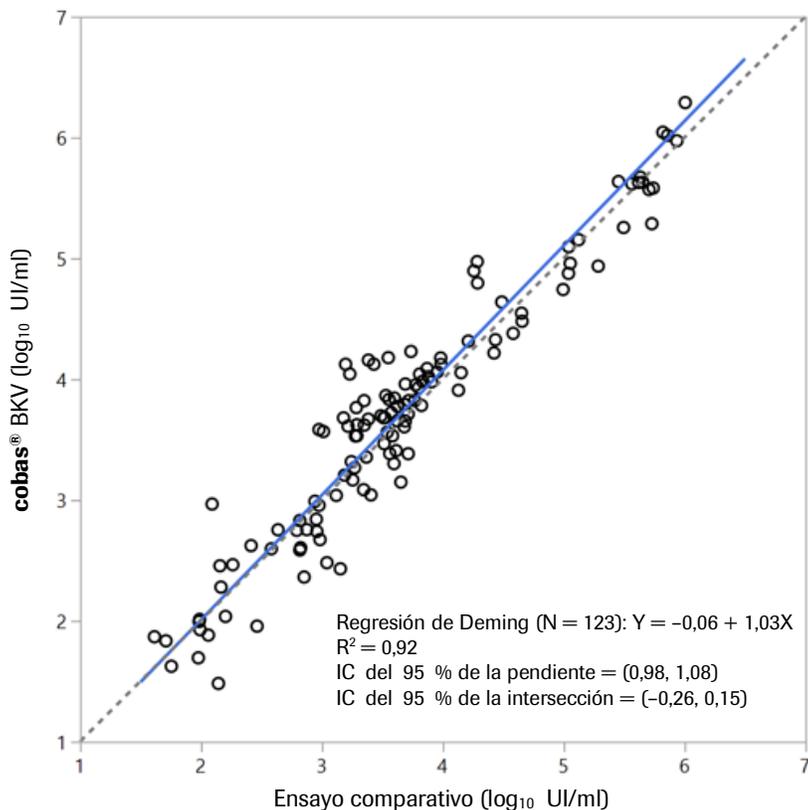
Clase de fármaco	Nombre genérico del fármaco	
Antimicrobiano	Cefotetan	Sulfametoxazol
	Clavulanato de potasio	Ticarcilina disódica
	Fluconazol	Trimetoprima
	Piperacilina	Vancomicina
	Tazobactam sódico	Micafungina
Compuestos para el tratamiento de los virus del herpes	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	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 5 se muestran los resultados de la regresión de Deming.

Ilustración 5 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 2,00E+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 por arrastre 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 en las Tabla 18 a Tabla 20. 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 18 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 19 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 20 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.

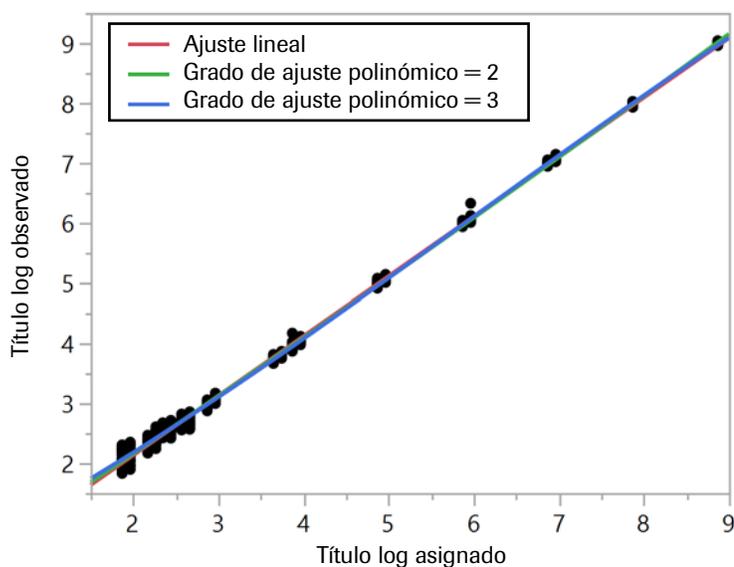
Intervalo lineal

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 lb 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 6.

Se demostró que la prueba **cobas**® BKV era lineal entre $7,41E+01$ 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 6). En el intervalo lineal, la exactitud de la prueba estuvo comprendida entre $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ilustración 6 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 cobas® 6800/8800 Systems 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 21.

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 21 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 22 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 $\pm 0,5 \log_{10}$ del título log₁₀ medio del control positivo respectivo añadido.

Tabla 22 Microorganismos analizados para reactividad cruzada

Virus	Bacterias	Bacterias	Levadura
<i>Virus del herpes simple 2</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Virus del papiloma humano 16</i>	<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>		

Sustancias interferentes

Se analizaron niveles elevados de albúmina (0,5 % p/v), bilirrubina conjugada (1 % p/v), glucosa (1 % p/v), células mononucleares de sangre periférica (1,00E+06 células/ml), moco (en presencia de 1 torunda de moco por 4,3 ml de muestra), pH ácido (pH 4), pH alcalino (pH 9), semen (1 torunda sumergida 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 23 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 23 Compuestos farmacológicos analizados para la interferencia mediante cuantificación del ADN del BKV con la prueba cobas® BKV

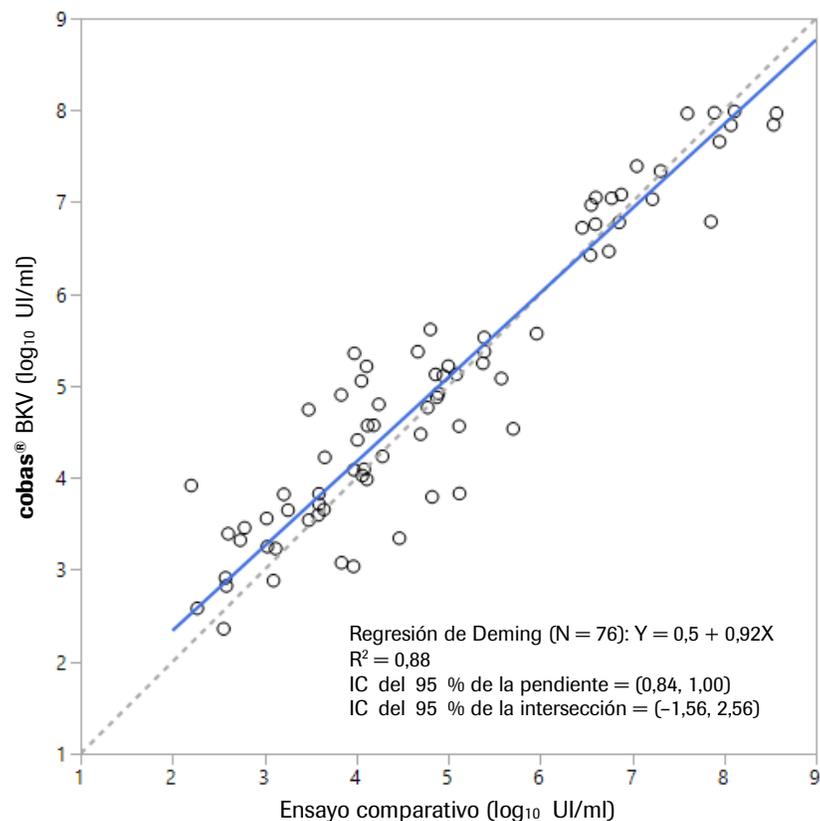
Clase de fármaco	Ingrediente activo	Concentración	Nombre genérico del fármaco
Antimicrobiano	Clotrimazol	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazol	701 µmol/l	Arilin rapid Supositorios vaginales Crema Vagi Metro Gel Nidazea
Hormona esteroidea estrógeno	Estradiol	4,41 nmol/l	Estrace
Analgésicos	Clorhidrato 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 7 se muestran los resultados de la regresión de Deming.

Ilustración 7 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 por arrastre fue del 0,0 % (intervalo de confianza unilateral superior del 95 % de 1,24 %).

Información adicional

Características principales de la prueba

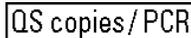
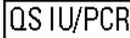
Tipo de muestra	Plasma conservado en EDTA	Orina estabilizada en cobas ® PCR Media
Cantidad mínima de muestra necesaria	350 µl*	550 µl*
Volumen de procesamiento de muestras	200 µl	400 µl
Sensibilidad analítica	21,5 UI/ml (intervalo de confianza bilateral del 95 %: 16,3-32,4 UI/ml)	12,2 UI/ml (intervalo de confianza bilateral del 95 %: 9,2-18,3 UI/ml)
Intervalo lineal	21,5 UI/ml - 1E+08 UI/ml	200 UI/ml - 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.

Símbolos

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

Tabla 24 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos de PCR para diagnóstico de Roche

	Software auxiliar		Límite inferior del intervalo asignado		Control negativo
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Límite superior del intervalo asignado		Control positivo
	Hoja de datos del código de barras		Almacenar en la oscuridad		Control
	Código de lote		Suficiente para $<n>$ pruebas		Intervalo asignado (copias/ml)
	Riesgo biológico		Límite de temperatura		Intervalo asignado (UI/ml)
	Número de catálogo		Archivo de definición de pruebas		Procedimiento estándar
	Consulte las instrucciones de uso		Fabricante		Procedimiento ultrasensible
	Contenido del kit		Fecha de caducidad		Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
	Distribuido por		Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial)		UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados.
	Para evaluación del rendimiento IVD únicamente		Número de serie		El presente producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79/CE de productos sanitarios para el diagnóstico <i>in vitro</i> .
Rx Only	Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos sólo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.		Fecha de fabricación		
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>		No reutilizar		

Servicio técnico para clientes de EE. UU.: 1-800-526-1247

Fabricante y distribuidores

Tabla 25 Fabricante y distribuidores



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



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Marcas registradas y patentes

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2020 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. 1.0 07/2019	Primera publicación.
Doc Rev. 2.0 04/2020	<p>Se ha actualizado para incluir información sobre orina.</p> <p>Se han actualizado o añadido apartados para incluir contenido específico sobre orina.</p> <p>Se ha ampliado el almacenamiento de las muestras en tubos secundarios (≤ -20 °C) hasta 6 meses.</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p>