

Handwritten signature

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Handwritten signature

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchev s
Presidente

VIASURE
by **certest**

Real Time PCR Detection Kit

Human Herpes Virus 6, 7 & 8

Instrucciones de uso

CE IVD
2797

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHV101L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHV101H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHV106L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHV106H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHV112L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHV112H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHV113L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHV113H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV101
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV136
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV172

Tabla A1. Referencias para productos Open format y Rotor-Gene format con control interno.

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHV196T

Tabla A2. Referencias para productos formato Tubo con control interno.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHV101LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHV101HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHV106LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHV106HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHV112LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHV112HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHV113LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHV113HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV101E
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV136E
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV172E

Tabla A3. Referencias para productos Open format y Rotor-Gene format con control de extracción.

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

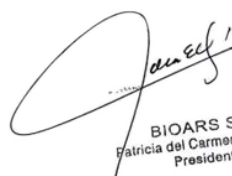
PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHV196TE

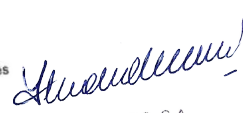
Tabla A4. Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

EN To download IFUs in other languages, please visit certest.es/viasure/labeling. Once there, please follow the instructions to access the language required. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

BG За да изтеглите инструкциите за употреба (IFU) на други езици, моля, отидете на certest.es/viasure/labeling. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия Ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout návody k použití (IFU) v jiných jazycích, přejděte na stránku certest.es/viasure/labeling. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

DA Hvis du vil downloade brugsanvisninger på andre sprog, kan du gå til **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, bedes du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, kan du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um die IFUs in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

EL Για λήψη των Οδηγίες χρήσης (IFUs) σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση **certest.es/viasure/labeling**. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: viasure@certest.es.

ES Para descargar las Instrucciones de Uso (IFU) en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger la notice d'utilisation (IFU) dans d'autres langues, consultez **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur le site, suivez les instructions pour accéder à la langue de votre choix. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

HU A használati utasítások (IFU-k) más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a **certest.es/viasure/labeling** weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: viasure@certest.es.

IT Per scaricare le istruzioni per l'uso (IFU) in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le indicazioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

LT Norėdami atsisiųsti naudojimo instrukciją kitomis kalbomis, apsilankykite adresu **certest.es/viasure/labeling**. Atidaryę šį tinklalapį vykdykite rodomas instrukcijas, kol rasite reikiamą kalbą. Jei reikia daugiau informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu lietošanas pamācību citās valodās, lūdzu, apmeklējiet vietni **certest.es/viasure/labeling**. Pēc vietnes lapas atvēršanas izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB Hvis du vil laste ned en bruksanvisning (IFU) på et annet språk, kan du gå inn på **certest.es/viasure/labeling**. Følg instruksjonene på nettsiden for å få tilgang til det språket du ønsker. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du sende en e-post til: viasure@certest.es.

PT Para transferir instruções de utilização (IFU) noutros idiomas europeus, acesse a **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar ao idioma que pretende. Se necessitar de informações adicionais, entre em contacto conosco através do: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca instrucțiunile IFU în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. După ce ați accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente



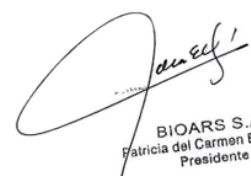
BIOARS S.A.
BIOG. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

SV För att ladda ner bruksanvisningen på andra språk, gå in på **certest.es/viasure/labeling** och följ instruktionerna. Om du behöver ytterligare information, kontakta: viasure@certest.es.

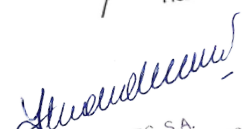
SK Ak si chcete stiahnuť návody na použitie v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Po otvorení stránky postupujte podľa pokynov na prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

FI Lataa suomenkielinen turvallisuusopas osoitteesta **certest.es/viasure/labeling**. Seuraa annettuja ohjeita. Mikäli tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Contenido

1.	Finalidad prevista.....	9
2.	Introducción y explicación.....	9
3.	Procedimiento.....	11
4.	Reactivos suministrados	12
5.	Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	12
6.	Condiciones de transporte, almacenamiento y uso	13
7.	Precauciones para el usuario	15
8.	Procedimiento del test.....	18
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	18
8.2.	Extracción de DNA	20
9.	Interpretación de resultados	21
9.1.	Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	21
9.2.	Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	24
10.	Limitaciones del test	26
11.	Control de calidad.....	29
12.	Características del funcionamiento analítico	29
12.1.	Linealidad analítica	29
12.2.	Sensibilidad analítica.....	30
12.2.1.	Límite de Blanco (LoB).....	31
12.2.2.	Límite de Detección (LoD)	31
12.3.	Rango de medición	33
12.4.	Exactitud.....	33
12.4.1.	Veracidad (Sesgo).....	33
12.4.2.	Precisión.....	34
12.4.3.	Exactitud.....	39
12.5.	Tasa de fallo de todo el sistema.....	40
12.6.	Especificidad y reactividad analítica.....	40
12.6.1.	Especificidad analítica	40

12.6.2. Reactividad analítica.....	52
12.7. Trazabilidad metrológica	53
13. Características del funcionamiento clínico	53
14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento	56
ANEXO 1.....	57
A1.1 Procedimiento	57
A1.2 Reactivos suministrados.....	58
A1.3 Procedimiento del test	59
A1.3.1 Control Positivo liofilizado	59
A1.3.2 Protocolo PCR	60
ANEXO 2.....	61
A2.1 Procedimiento	61
A2.2 Reactivos suministrados.....	61
A2.3 Procedimiento del test	62
A2.3.1 Control Positivo liofilizado	62
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	62
A2.3.3 Protocolo PCR	63
ANEXO 3.....	64
A3.1 Procedimiento	64
A3.2 Reactivos suministrados.....	65
A3.3 Procedimiento del test	67
A3.3.1 Control de Extracción liofilizado	67
A3.3.2 Control Positivo liofilizado	67
A3.3.3 Protocolo PCR	67
ANEXO 4.....	69
A4.1 Procedimiento	69
A4.2 Reactivos suministrados.....	69
A4.3 Procedimiento del test	70
A4.3.1 Control de Extracción liofilizado	70


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

A4.3.2 Control Positivo liofilizado	70
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	71
A4.3.4 Protocolo PCR	71
Bibliografía.....	73
Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	74
Marcas registradas.....	74



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

ESPAÑOL

1. Finalidad prevista

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit es un test de PCR en tiempo real no automatizado diseñado para la identificación y la diferenciación específicas del DNA del virus del herpes humano 6, del virus del herpes humano 7 y/o del virus del herpes humano 8 en muestras de EDTA-plasma, líquido cefalorraquídeo, EDTA-sangre completa y suero, procedentes de individuos con sospecha de infección por el virus del herpes humano 6, el virus del herpes humano 7 y el virus del herpes humano 8 por parte de su profesional de la salud (PS).

Esta prueba está destinada a ser usada como ayuda en el diagnóstico de la infección por VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído de las muestras, multiplicado mediante amplificación por PCR en tiempo real y detectado mediante el uso de sondas marcadas con una molécula fluorescente específicas para VHH-6, VHH-7 y VHH-8.

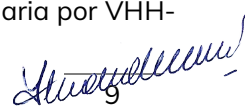
El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).

2. Introducción y explicación

La meningitis es una enfermedad que puede poner en peligro la vida y afecta al sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por la inflamación de las membranas protectoras que rodean el cerebro y la médula espinal, conocidas como meninges. Está causada por diversos agentes infecciosos, entre los que se incluyen bacterias, hongos y virus (Logan & MacMahon, 2008). La forma más frecuente de meningitis es la meningitis aséptica, que se caracteriza por la ausencia de crecimiento bacteriano en los cultivos, siendo los virus una causa frecuente. A medida que la prevalencia de la meningitis bacteriana ha disminuido gracias a las vacunas, la meningitis viral se ha convertido en la forma más común de meningitis en muchos países (McGill *et al.*, 2017). Aunque la meningitis viral suele ser menos grave que la bacteriana, puede dar lugar a complicaciones importantes, especialmente en poblaciones vulnerables, como las personas inmunodeprimidas, los niños pequeños y los ancianos. La presentación clínica de la meningitis viral se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, fotofobia, náuseas y alteración del estado mental, síntomas que se solapan con los de la meningitis bacteriana, lo que dificulta la distinción entre ambas enfermedades basándose únicamente en las características clínicas (Xu *et al.*, 2023).

El virus del herpes humano 6 (VHH-6) A y B son dos virus del herpes β -linfotrópicos que infectan principalmente a los seres humanos. A los cinco años, la mayoría de los seres humanos han contraído la infección por VHH-6, volviéndose seropositivos para el VHH-6. La presentación clásica de la infección primaria por VHH-6 es la roséola infantil. En individuos inmunocompetentes, la infección primaria por VHH-


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

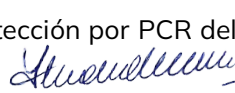
6 suele ser asintomática o puede manifestarse clínicamente como una enfermedad febril asociada con erupciones cutáneas, diarrea, síntomas respiratorios, convulsiones o encefalitis (Tesini *et al.*, 2014).

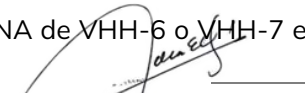
El virus del herpes humano 7 (VHH-7) es también un virus del herpes β -linfotrópico que infecta a los seres humanos durante los primeros cinco años de vida. Al igual que el VHH-6, su infección puede ser asintomática o manifestarse clínicamente en forma de fiebre, síntomas respiratorios superiores, vómitos, diarrea, convulsiones, encefalitis y una enfermedad similar a la roséola. Sin embargo, las manifestaciones clínicas más comunes en los niños con viremia por VHH-7 son las convulsiones y la fiebre (Tesini *et al.*, 2014).

El virus del herpes humano 8 (VHH-8) es un virus del herpes gamma asociado al sarcoma de Kaposi. Se transmite durante el contacto íntimo, probablemente a través de la transferencia de secreciones corporales como la saliva y las secreciones genitales, pero también puede transmitirse a través de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos. En niños inmunocompetentes, la infección primaria por VHH-8 se manifiesta con síntomas leves y no específicos, como fiebre y erupciones cutáneas. En adultos, la infección primaria por VHH-8 se ha asociado con una enfermedad clínica caracterizada por diarrea, fatiga y linfadenopatía. Tras la resolución de la infección primaria, el VHH-8 entra en un estado latente en las células de origen linfoide (Ogoina *et al.*, 2011).

Los herpesvirus establecen una latencia de por vida, en la que el genoma viral se mantiene y se distribuye a las células hijas sin producir virus infecciosos y con una expresión génica viral limitada. Muchos herpesvirus (por ejemplo, el VHH-6 y el VHH-7) se eliminan en la saliva, las secreciones genitales o la sangre casi a diario, normalmente sin síntomas. Esto indica que la latencia es un proceso dinámico y que la reactivación se produce con mucha frecuencia (Cohen, 2020). Las infecciones por VHH-6 y VHH-7 están presentes en más del 90 % de la población adulta de los países desarrollados. La infección por VHH-6 se contrae normalmente en una etapa muy temprana de la vida, a partir del momento en que desaparecen los anticuerpos protectores maternos. Se cree que la infección primaria por VHH-7 también se produce en la infancia, aunque ligeramente más tarde que la infección por VHH-6 (Agut *et al.*, 2016). El hecho de que estas infecciones estén distribuidas de forma casi universal, junto con el hecho de que persisten a lo largo de toda la vida de una persona, significa que cualquier individuo con un sistema inmunitario debilitado corre el riesgo de desarrollar infecciones activas.

Todos estos virus producen manifestaciones clínicas y síntomas similares, lo que hace necesario que los médicos dispongan de un diagnóstico rápido y preciso para distinguir los patógenos causantes. Los métodos de diagnóstico tradicionales, como los cultivos virales, la serología y la histopatología, suelen ser menos sensibles, tardan más en dar resultados y su interpretación puede ser más compleja que las técnicas moleculares (Richman *et al.*, 2016). La PCR en tiempo real se ha convertido en el método más preciso y eficaz para detectar el DNA viral en muestras clínicas. Esta técnica ofrece resultados rápidos, específicos, sensibles, fiables y reproducibles a partir de una amplia variedad de muestras biológicas, incluso de mala calidad. Además, la PCR permite la detección simultánea de varios patógenos mediante tecnología multiplex, lo que aumenta el número de objetivos y reduce el tiempo necesario para descartar múltiples patógenos (Ginocchio & McAdam, 2011; Auburn *et al.*, 2011). Sin embargo, la detección por PCR del DNA de VHH-6 o VHH-7 en


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO


10
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

EDTA-sangre completa o en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, de sus siglas en inglés) no siempre es indicativa de una replicación viral activa, ya que las células mononucleares son un lugar de latencia. Por lo tanto, las pruebas de PCR deben utilizarse principalmente cuando se sospecha una infección sintomática, siendo esencial la correlación clínica para interpretar los resultados con precisión (Pellett Madan *et al.*, 2019).

3. Procedimiento

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit es un test de PCR en tiempo real no automatizado diseñado para la identificación y la diferenciación específicas del DNA del virus del herpes humano 6 (VHH-6), del virus del herpes humano 7 (VHH-7) y/o del virus del herpes humano 8 (VHH-8) en muestras de EDTA-plasma, líquido cefalorraquídeo, EDTA-sangre completa y suero. La detección se realiza en un solo paso de PCR en tiempo real donde la amplificación de las secuencias diana específicas se produce en sus pocillos de reacción correspondientes. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de estos microorganismos se realiza mediante la amplificación de regiones conservadas del gen *U65-U66* de VHH-6, del gen *U57* de VHH-7, y del gen *ORF73* de VHH-8, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se basa en la actividad exonucleasa 5' de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de molde diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en un formato estabilizado¹, así como un **Control Interno o Control de Extracción** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

El **Control Interno (CI)** verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción de PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

El **Control de Extracción (CE)** controla la eficiencia del método de extracción y verifica la reacción de PCR. Se suministra en un vial adicional y debe añadirse a las muestras antes del proceso de extracción.

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "lío-filizado" se utilizan de manera indistinguible y como sinónimos en todo el documento.


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para productos “open format” y “Rotor-Gene format” con control interno, en el Anexo 2 para productos de formato tubo con control interno, en el Anexo 3 para productos “open format” y “Rotor-Gene format” con control de extracción, y en el Anexo 4 para productos de formato tubo con control de extracción.

5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor-Gene (Anexos 1 y 3).
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y / o ≤ -70°C.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Blanco de muestra (Ver sección 8.2 “Extracción de DNA”).

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se ha testado con diferentes flujos de trabajo, aunque han sido seis los seleccionados como los principales para llevar a cabo la evaluación y validación analítica y/o clínica del dispositivo. Los siguientes instrumentos son los que se han considerado como validados para el uso de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit:



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

	Matriz	Instrumentos
1	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Suero LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
2	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Suero LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
3	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Suero LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
4	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Suero LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
5	LCR ¹	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
6	LCR ¹	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)

Tabla 1. Métodos de extracción-amplificación (flujo de trabajo) validados empleando VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit. LCR = líquido cefalorraquídeo.

¹ La matriz de líquido cefalorraquídeo fue validada también sin llevar a cabo previamente la extracción de ácidos nucleicos.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición en el equipo de DNA-Technology:

- DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX -1000, canal ROX -1000 y canal Cy5 -1000.

* Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje el valor de exposición indicado anteriormente hasta 150.

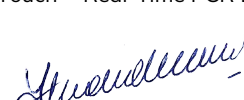
Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.

² Ambos equipos, el CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) son equivalentes y tienen las mismas características operativas.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- Una vez que el Control Positivo ha sido resuspendido, debe guardarse a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado y establecido la estabilidad del Control Positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Para kits de formato tubo: Una vez que el vial de *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede almacenarse a $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ o $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas. Para periodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos). Una vez que el tubo haya sido abierto o rehidratado, debe guardarse para mantener el vial alejado de la luz.
- Para kits de formato abierto (tiras y placas): Para un uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar pocillos adicionales que no necesiten ser utilizados. Si no se utilizan todos los pocillos provistos en una tira de 8 pocillos o en una placa de 96 pocillos, la cantidad requerida de pocillos de reacción se puede cortar fácilmente de las tiras de 8 pocillos o de las placas de 96 pocillos. Si no se utilizan todos los pocillos, se recomienda que los pocillos no utilizados se almacenen en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro para evitar el contacto con la luz hasta su uso. La bolsa abierta con pocillos no rehidratados a $2-40^{\circ}\text{C}$ es estable hasta la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Para tiras y placas: Una vez que los pocillos a emplear se hayan rehidratado, tanto la adición del ácido nucleico como la realización de la PCR en tiempo real deben realizarse inmediatamente.
- Una vez que el vial de Control de Extracción ha sido reconstituido, se recomienda emplearlo inmediatamente o almacenarlo a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- Una vez extraído el ácido nucleico de las muestras clínicas, el eluido se puede almacenar hasta 24 horas a 4°C o 25°C , o hasta 6 meses a -20°C antes de agregarlo al ensayo de PCR en tiempo real.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit	2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit	Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
HHV well-strip o well plate (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>) (Ver Anexo 1)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
HHV Reaction-Mix tube (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>) (Ver Anexo 2)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Tubo rehidratado: $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ o $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas. Para un periodo más largo, almacenar directamente a	Uso inmediato a temperatura ambiente.

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
		-20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	
1HHV well-strip o well plate (Human Herpes Virus 6, 7 & 8) (Ver Anexo 3)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
1HHV Reaction-Mix tube (Human Herpes Virus 6, 7 & 8) (Ver Anexo 4)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Tubo rehidratado: 25°C±5°C o 4°C±2°C hasta 4 horas. Para un periodo más largo, almacenar directamente a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Vial HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Rehydration Buffer		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Negative Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Water RNase/DNase free		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Extraction Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.

Tabla 2. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit y cada uno de sus componentes.

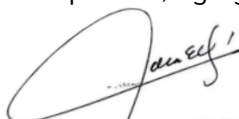
7. Precauciones para el usuario

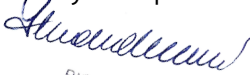
- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. No llevar a cabo el ensayo de PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las instrucciones de uso.
- No usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio de los reactivos una vez abiertos.
- Una vez retirado el aluminio protector de las tiras o de la placa, o abiertos los tubos, el usuario final deberá utilizar las tiras, la placa o los tubos en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira o en una placa, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-HHV113L, VS-HHV113H, VS-HHV136, VS-HHV172, VS-HHV113LE, VS-HHV113HE, VS-HHV136E y VS-HHV172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para las referencias VS-HHV101, VS-HHV136, VS-HHV172, VS-HHV101E, VS-HHV136E y VS-HHV172E (compatible con instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene®), utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación cruzada.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Una vez abierto el sobre del Control Positivo, del Control de Extracción o de la mezcla de reacción en formato tubo, rehidratar los viales inmediatamente, utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos correctamente. No se recomienda dejar el vial abierto sin resuspender, ya que esto puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- Una vez retirado el sello protector de aluminio de las tiras o de la placa, utilícelas inmediatamente para el ensayo de PCR en tiempo real (rehidrate los pocillos, agregue las muestras y coloque las tiras o la


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

placa en el termociclador). No se recomienda dejar las tiras o la placa abiertas sin resuspender. Asimismo, una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe añadir el ácido nucleico en cada pocillo y llevarse a cabo el ensayo de PCR en tiempo real inmediatamente.

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- No abra el vial de *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Positive Control en el área pre-PCR.
- Abra y rehidrate el Control de Extracción en el área pre-PCR lejos del Control Positivo.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y/o equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos. Evitar la contaminación y el contacto con piel, ojos y ropa.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos y/o materiales que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas de acuerdo con la legislación nacional sobre residuos sanitarios. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, el transporte, el almacenamiento, la manipulación, el tratamiento y la eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas y superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. Se puede solicitar a Certest Biotec una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

- Consulte el manual de cada equipo de PCR en tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Asegúrese de que la configuración y las condiciones de los ajustes en el termociclador se realizan siguiendo las instrucciones de la sección “Protocolo PCR” en los Anexos 1, 2, 3 y 4 (protocolo DNA/RNA, número de ciclos, temperaturas, etc.). Del mismo modo, revise las características técnicas del termociclador que se va a usar para conocer qué formato de tubo se debe utilizar.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto; sin embargo, se puede solicitar a Certest Biotec en caso de necesidad.

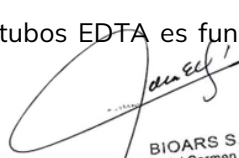
8. Procedimiento del test

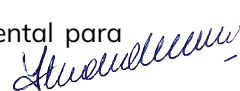
Consulte el Anexo 1 para el procedimiento del test de productos “open format” y “Rotor-Gene format” con control interno, el Anexo 2 para el procedimiento del test de productos de formato tubo con control interno, el Anexo 3 para el procedimiento del test de productos “open format” y “Rotor-Gene format” con control de extracción, y el Anexo 4 para el procedimiento del test de productos de formato tubo con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit fue testado empleando muestras de EDTA K2-plasma (en adelante, muestras de EDTA-plasma) y muestras de EDTA K2-sangre completa (en adelante, muestras de EDTA-sangre completa) recogidas en tubos EDTA, muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) recogidas en tubos estériles, y muestras de suero recogidas en tubos sin aditivos (o con gel separador). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger lo antes posible, durante la fase aguda de la enfermedad o en cualquier momento durante el curso clínico, y antes de comenzar el tratamiento, si es posible. Las muestras deberían obtenerse evitando tocar tejidos adyacentes y secreciones de órganos que no sean de interés, y recogerse posteriormente en contenedores limpios y estériles, con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra). Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre y el número de identificación de la persona de la que proceden, el origen de la muestra, la fecha y la hora en la que fue tomada. Tras la recogida, las muestras deben guardarse en una bolsa de bioseguridad y deben transportarse y procesarse con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes enviados para pruebas moleculares deben conservarse en condiciones controladas para que los ácidos nucleicos no se degraden durante el almacenamiento. Se recomienda el uso de muestras frescas para el ensayo. Tanto para el transporte (si fuera necesario) como para el almacenaje de las muestras clínicas hasta su procesamiento, se debería considerar la temperatura a la que tienen que conservarse y la duración, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patogénico. En el caso de **muestras de EDTA-plasma o EDTA-sangre completa**, la recogida en tubos EDTA es fundamental para


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


18 BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

evitar la degradación del ácido nucleico, ya que el EDTA actúa como anticoagulante que impide la coagulación de la sangre, protege la integridad del DNA y preserva la calidad de las muestras. Las muestras deben mantenerse a Temperatura Ambiente (TA) durante un máximo de 24 horas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patogénico. Las muestras de EDTA-plasma pueden almacenarse a 4°C durante un máximo de 2 a 7 días con una degradación mínima, mientras que las muestras de EDTA-sangre completa pueden almacenarse a 4°C durante un máximo de 48 horas, especialmente si se utilizan anticoagulantes como el EDTA o la heparina, lo que las hace adecuadas para un uso a corto plazo. Para una conservación prolongada, la congelación a -20 °C es eficaz durante varios meses, aunque deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación, ya que pueden degradar el DNA viral. La condición ideal para el almacenamiento a largo plazo es -8 °C, lo que garantiza la estabilidad del ácido nucleico durante años sin degradación significativa^{3,4}. En el caso de las **muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)**, se puede considerar la posibilidad de recogerlas en tubos estériles con aditivos inhibidores de nucleasas para preservar el DNA viral, ya que esta matriz contiene una cantidad menor de DNA que el plasma o la sangre, lo que hace que la manipulación adecuada de las muestras sea aún más crítica. Las muestras de LCR deben almacenarse/transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas, o a 4°C durante un máximo de 48-72 horas, aunque lo ideal es procesarlas en un plazo de 24 horas para minimizar la degradación del material genético. Para la conservación a largo plazo, la congelación a -20°C es eficaz durante varias semanas, pero deben minimizarse los ciclos de congelación-descongelación. Para una conservación óptima, las muestras de LCR deben almacenarse a -80°C para garantizar la estabilidad del ácido nucleico^{3,5,6}. Por último, las **muestras de suero** deben recogerse en tubos sin aditivos o con gel separador, lo que ayuda a separar el suero de las células de EDTA-sangre completa tras la centrifugación. El suero suele ser estable a temperatura ambiente durante un máximo de 24-48 horas, o puede almacenarse a 4°C durante un máximo de 2-7 días con una degradación mínima. Sin embargo, es preferible congelarlo para su almacenamiento a largo plazo. La hemólisis y la exposición al calor pueden afectar a la cantidad de DNA viral, ya que el suero es especialmente susceptible a la degradación por enzimas (como las DNAsas) si no se almacena adecuadamente. Las muestras de suero deben congelarse a -80°C si no se analizan en un plazo de 48 horas^{3,7}.

³ CLSI. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods, 2nd ed. CLSI guideline MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

⁴ Huang, L. H., Lin, P. H., Tsai, K. W., Wang, L. J., Huang, Y. H., Kuo, H. C., & Li, S. C. (2017). The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PloS one*, 12(9), e0184692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184692>.

⁵ Teunissen, C. E., Petzold, A., Bennett, J. L., Berven, F. S., Brundin, L., Comabella, M., Franciotta, D., Frederiksen, J. L., Fleming, J. O., Furlan, R., Hintzen, R. Q., Hughes, S. G., Johnson, M. H., Krasulova, E., Kuhle, J., Magnone, M. C., Rajda, C., Rejdak, K., Schmidt, H. K., van Pesch, V., ... Deisenhammer, F. (2009). A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73(22), 1914–1922. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2>.

⁶ Cinque, P., Bossolasco, S., & Lundkvist, A. (2003). Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 26(1), 1–28. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00173-7](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00173-7).

⁷ Jin, Y., Chen, K., Wang, Z., Wang, Y., Liu, J., Lin, L., Shao, Y., Gao, L., Yin, H., Cui, C., Tan, Z., Liu, L., Zhao, C., Zhang, G., Jia, R., Du, L., Chen, Y., Liu, R., Xu, J., Hu, X., ... Wang, Y. (2016). DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions. *BMC cancer*, 16(1), 753. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2783-2>.

En general, los siguientes requisitos son esenciales para mantener la estabilidad del DNA del VHH-6, VHH-7 y VHH-8 en matrices biológicas como EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR y suero: 1) procesamiento rápido de las muestras para evitar la degradación del DNA; 2) almacenamiento a temperaturas muy bajas (-80°C) después de la recogida; y 3) uso de tubos adecuados que contengan inhibidores de nucleasas para mantener la integridad del DNA viral. Además, deben evitarse los ciclos repetidos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de las muestras y de los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recogerse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio. Como ejemplos, puede consultar las referencias Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J., & Orta Mira, N. (2019). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>; CLSI. *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods*. 2nd ed. CLSI guideline MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020 ([MM13 | Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002)); o Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., Theel, E. S., Thomson, R. B., Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1–e94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>.

Nota: Las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras de LCR, suero, EDTA-plasma o EDTA-sangre completa destinadas a ser utilizadas para la detección de encefalitis viral, que aparecen en la bibliografía citada, en la guía CLSI y en la guía autorizada de la IDSA. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o los manuales de políticas del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Debido a que VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit está también disponible con Control de Extracción (referencias incluidas en los Anexos 3 y 4), si el Control de Extracción (CE) se utiliza para monitorear el aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de inhibición de la PCR, agregue 5 µL del CE reconstituido por muestra. Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el Control de Extracción únicamente se utiliza como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µL del CE reconstituido por pocillo/reacción.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Tener en cuenta: El Control Positivo y el Control Negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la muestra clínica. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para las dianas de interés.

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit fue validado con muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero, extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y analizadas con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology) o Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Además, VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit fue validado con matriz de LCR sin previa extracción de ácidos nucleicos y analizado con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

En caso de emplear un flujo de trabajo distinto a los arriba mencionados, la validación de este nuevo flujo de trabajo debe ser realizada por parte del usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de Control Interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

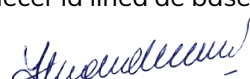
Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al Control Positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al Control Positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

El uso del Control Positivo y del Control Negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del Control Negativo y la presencia de señal para VHH-6, VHH-7 y VHH-8 en el pocillo del Control Positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	VHH-6 (FAM) ¹	VHH-7 (Cy5) ¹	VHH-8 (ROX) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	20-30	20-30	20-30	20-30	Válido
Control Negativo (CN)	> 40 o sin señal	> 40 o sin señal	> 40 o sin señal	20-30	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que uno o ambos controles CP y CN fallen (se observa una señal de amplificación en el pocillo del Control Negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo del Control Positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "Inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct 20-30) en los pocillos de los controles (CP y CN).

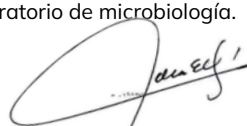
La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados del Control Positivo y del Control Negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

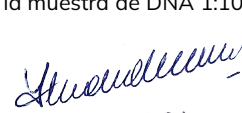
Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione en el termociclador solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguientes tabla, lea y analice los resultados:

VHH-6 (FAM)	VHH-7 (Cy5)	VHH-8 (ROX)	Control Interno (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
$\leq 40^3$	$\leq 40^4$	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 detectado
$\leq 40^3$	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 detectado, DNA de VHH-7 y VHH-8 no detectado
> 40 o sin señal ³	$\leq 40^4$	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-7 detectado, DNA de VHH-6 y VHH-8 no detectado
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-8 detectado, DNA de VHH-6 y VHH-7 no detectado
$\leq 40^3$	$\leq 40^4$	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 y VHH-7 detectado, DNA de VHH-8 no detectado
$\leq 40^3$	> 40 o sin señal ⁴	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 y VHH-8 detectado, DNA de VHH-7 no detectado
> 40 o sin señal ³	$\leq 40^4$	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-7 y VHH-8 detectado, DNA de VHH-6 no detectado
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	$\leq 35^2$	Válido	Dianas no detectadas ²
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	> 35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido - Repetir Test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 El Control Interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤ 35). En ocasiones, su detección no ocurre porque la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción debe considerarse "Inválida" y se recomienda repetir la PCR en tiempo real diluyendo la muestra de DNA 1:10, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

2 En el caso de que los genes diana de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del Control Interno, el resultado se considera "Inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la PCR en tiempo real diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

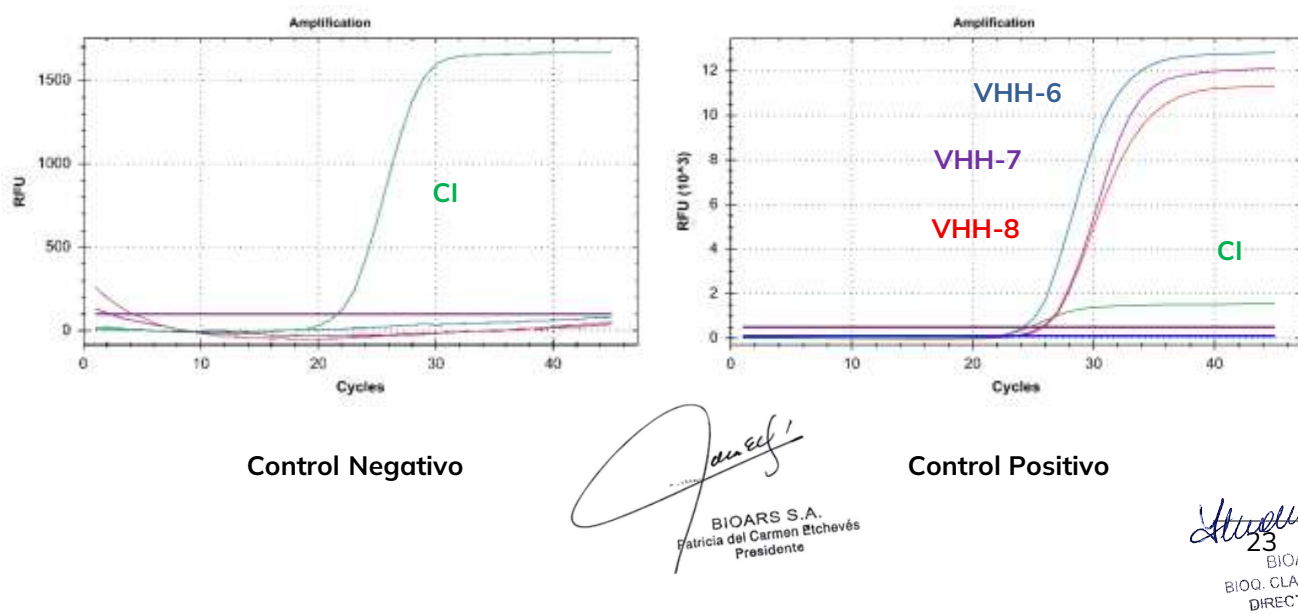
3 En el caso de EDTA-sangre completa para VHH-6, el intervalo Ct de 37-40 se considera una zona gris, lo que requiere una verificación adicional. En tales casos, se recomienda separar EDTA-plasma de la muestra de EDTA-sangre completa y volver a realizar el ensayo para confirmar si el resultado es realmente positivo. La centrifugación de la muestra de EDTA-sangre completa y el posterior análisis de EDTA-plasma permite detectar infecciones activas por VHH-6 debido a la presencia de DNA viral libre. Por el contrario, las infecciones latentes, asociadas con el DNA viral integrado en los linfocitos B, no producirán amplificación después de la centrifugación. Alternativamente, el seguimiento del valor Ct del paciente a lo largo del tiempo puede proporcionar información sobre la naturaleza de la infección. Un valor Ct creciente o la falta de amplificación en las pruebas de seguimiento pueden indicar una infección latente, mientras que los valores Ct estables o decrecientes sugieren una replicación activa.

4 En el caso de EDTA-sangre completa para VHH-7, se propone un valor $Ct \leq 37$, y se recomienda no utilizar este test para diagnosticar VHH-7 en esta matriz. En tales casos, se recomienda separar EDTA-plasma de la muestra de EDTA-sangre completa y volver a realizar el ensayo para confirmar si el resultado es realmente positivo. La centrifugación de la muestra de EDTA-sangre completa y el posterior análisis de EDTA-plasma permite detectar infecciones activas por VHH-7 debido a la presencia de DNA viral libre. Por el contrario, las infecciones latentes, asociadas con el DNA viral integrado en los linfocitos B, no producirán amplificación después de la centrifugación. Alternativamente, el seguimiento del valor Ct del paciente a lo largo del tiempo puede proporcionar información sobre la naturaleza de la infección. Un valor Ct creciente o la falta de amplificación en las pruebas de seguimiento pueden indicar una infección latente, mientras que los valores Ct estables o decrecientes sugieren una replicación activa.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR en tiempo real y revisar los parámetros, y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- a) repetir la PCR en tiempo real con la misma muestra de DNA aislada, o
- b) volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra, o
- c) obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del Control Negativo y del Control Positivo en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de Control de Extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al Control Positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al Control Positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso del Control Positivo y del Control Negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del Control Negativo y la presencia de señal para VHH-6, VHH-7 y VHH-8 en el pocillo del Control Positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	VHH-6 (FAM) ¹	VHH-7 (Cy5) ¹	VHH-8 (ROX) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	20-30	20-30	20-30	20-35	Válido
Control Negativo (CN)	> 40 o sin señal	> 40 o sin señal	> 40 o sin señal	20-35	Válido

Tabla 5. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que uno o ambos controles CP y CN fallen (se observa una señal de amplificación en el pocillo del Control Negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo del Control Positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "Inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos de los controles (CP y CN). Se debe añadir 1 µL de CE al CP y CN antes de comenzar la PCR en tiempo real (ver sección "Protocolo PCR" de los Anexos 3 y 4).

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados del Control Positivo y del Control Negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione en el termociclador solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

VHH-6 (FAM)	VHH-7 (Cy5)	VHH-8 (ROX)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación de muestras individuales de pacientes	
$\leq 40^3$	$\leq 40^4$	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 detectado
$\leq 40^3$	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 detectado, DNA de VHH-7 y VHH-8 no detectado
> 40 o sin señal ³	$\leq 40^4$	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-7 detectado, DNA de VHH-6 y VHH-8 no detectado
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-8 detectado, DNA de VHH-6 y VHH-7 no detectado
$\leq 40^3$	$\leq 40^4$	> 40 o sin señal	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 y VHH-7 detectado, DNA de VHH-8 no detectado
$\leq 40^3$	> 40 o sin señal ⁴	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-6 y VHH-8 detectado, DNA de VHH-7 no detectado
> 40 o sin señal ³	$\leq 40^4$	≤ 40	$\leq 35^1$	Válido	DNA de VHH-7 y VHH-8 detectado, DNA de VHH-6 no detectado
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	$\leq 35^2$	Válido	Dianas no detectadas ²
> 40 o sin señal ³	> 40 o sin señal ⁴	> 40 o sin señal	> 35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido - Repetir Test ²

Tabla 6. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 35$). En ocasiones, su detección no ocurre porque la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción debe considerarse "Inválida" y se recomienda repetir la PCR en tiempo real diluyendo la muestra de DNA 1:10, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct del Control de Extracción entre los controles y las muestras clínicas debido al proceso de extracción.

2 En el caso de que los genes diana de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del Control de Extracción, el resultado se considera "Inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la PCR en tiempo real diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

3 En el caso de EDTA-sangre completa para VHH-6, el intervalo Ct de 37-40 se considera una zona gris, lo que requiere una verificación adicional. En tales casos, se recomienda separar EDTA-plasma de la muestra de EDTA-sangre completa y volver a realizar el ensayo para confirmar si el resultado es realmente positivo. La centrifugación de la muestra de EDTA-sangre completa y el posterior análisis de EDTA-plasma permite detectar infecciones activas por VHH-6 debido a la presencia de DNA viral libre. Por el contrario, las infecciones latentes, asociadas con el DNA viral integrado en los linfocitos B, no producirán amplificación después de la centrifugación. Alternativamente, el seguimiento del valor Ct del paciente a lo largo del tiempo puede proporcionar información sobre la naturaleza de la infección. Un valor Ct creciente o la falta de amplificación en las pruebas de seguimiento pueden indicar una infección latente, mientras que los valores Ct estables o decrecientes sugieren una replicación activa.

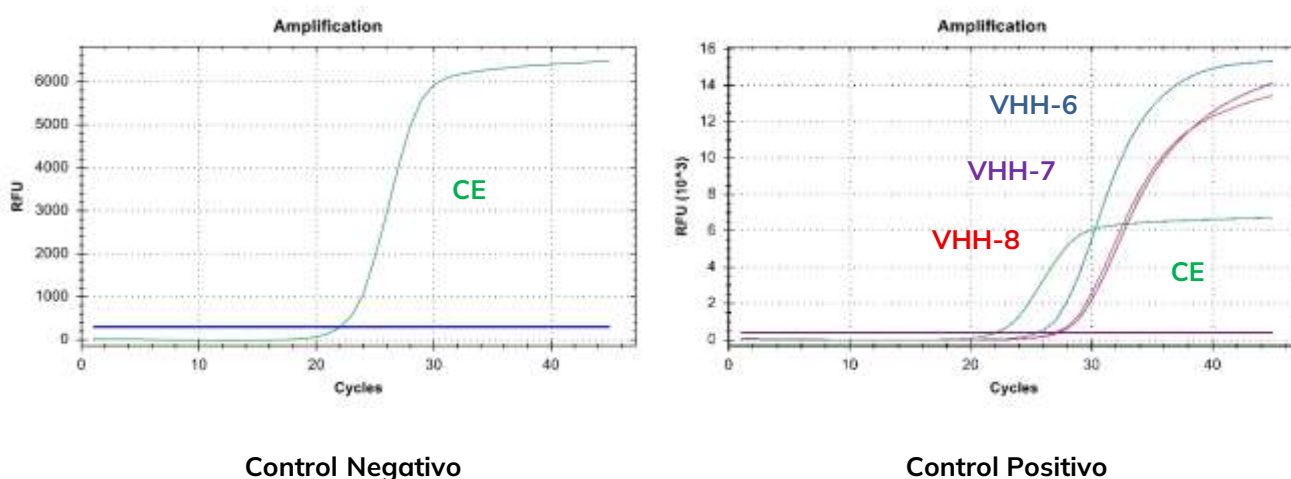
4 En el caso de EDTA-sangre completa para VHH-7, se propone un valor $Ct \leq 37$, y se recomienda no utilizar este test para diagnosticar VHH-7 en esta matriz. En tales casos, se recomienda separar EDTA-plasma de la muestra de EDTA-sangre completa y volver a realizar el ensayo para confirmar si el resultado es realmente positivo. La centrifugación de la muestra de EDTA-sangre completa y el posterior análisis de EDTA-plasma permite detectar infecciones activas por VHH-7 debido a la presencia de DNA viral libre. Por el contrario, las infecciones latentes, asociadas con el DNA viral integrado en los linfocitos B, no producirán amplificación después de la centrifugación. Alternativamente, el seguimiento del valor Ct del paciente a lo largo del tiempo puede proporcionar información sobre la naturaleza de

la infección. Un valor Ct creciente o la falta de amplificación en las pruebas de seguimiento pueden indicar una infección latente, mientras que los valores Ct estables o decrecientes sugieren una replicación activa.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR en tiempo real y revisar los parámetros, y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- repetir la PCR en tiempo real con la misma muestra de DNA aislada, o
- volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del Control Negativo y del Control Positivo en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



10. Limitaciones del test

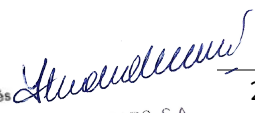
- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, líquido cefalorraquídeo y suero.
- Pueden producirse interferencias por coinfección. El VHH-7 en concentraciones superiores a $1,17 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/μL puede interferir con la detección del VHH-6 en concentraciones bajas (cercasas al LoD), pero niveles elevados del VHH-6 disminuyen este riesgo.
- La detección mediante PCR del DNA del VHH-6 o del VHH-7 en EDTA-sangre completa o en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) no se correlaciona tan bien con la replicación viral activa, ya que las células mononucleares son un lugar de latencia. En general, las pruebas diagnósticas para el VHH-6 o el VHH-7 deben limitarse a situaciones en las que sea plausible una infección sintomática y

para ayudar a orientar las decisiones terapéuticas. El diagnóstico de los síntomas directamente relacionados con el VHH-6 o el VHH-7 requiere la exclusión cuidadosa de otras etiologías.

- La importancia clínica de la PCR del VHH-6 en muestras de LCR y EDTA-plasma debe interpretarse con cautela, ya que la presencia del virus puede ser incidental y no causal. La presencia del virus puede ser consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o de la integración cromosómica de secuencias del VHH-6 en células humanas. Los pacientes con resultados positivos del VHH-6 en la PCR también pueden tener otros patógenos identificables, por lo que los resultados deben ser analizados e interpretados meticulosamente por un médico especializado, junto con otros hallazgos de laboratorio y bibliografía actualizada que respalde la decisión diagnóstica.
- Aunque este ensayo se podría utilizar con diferentes métodos de extracción/amplificación, sólo ha sido validado con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gc instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology) o Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Además, la matriz de LCR sin previa extracción de ácidos nucleicos fue validada con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- En el caso de que se utilicen los equipos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene®, solo debe utilizarse un producto VIASURE por análisis, para evitar así posibles fenómenos “crosstalk” entre canales. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del Límite de Detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que los valores de las muestras por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8, ya sea a causa del *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Positive Control, por muestras con una elevada concentración de DNA diana, o por contaminación debida a productos de PCR de reacciones previas.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos se debe llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a falsos negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción del DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar a la detección de variantes nuevas o desconocidas del VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de PCR en tiempo real u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones o durante el tratamiento de la misma.
 - El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.6.1 de estas Instrucciones de Uso (Interferencias e inhibidores de PCR). Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción de PCR en tiempo real. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que dichos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los microorganismo(s).
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades neurológicas son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra, etc., entre otros.
- El Control Positivo y el Control Negativo no deben extraerse, pero se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y la PCR en tiempo real para descartar posibles contaminaciones. Resultados falsos positivos probables podrían quedarse sin detectar si se omite el blanco de muestra.

11. Control de calidad

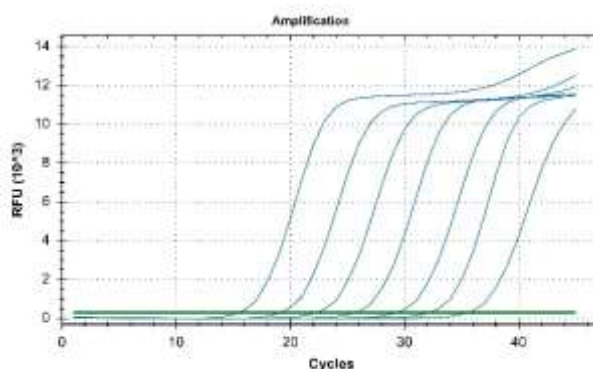
VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene un Control Positivo y un Control Negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el Control Interno (CI) o el Control de Extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del funcionamiento analítico

12.1. Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se estableció y confirmó analizando ambas variantes del producto empleando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 y 10 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente al virus del herpes humano 6 (VHH-6), al virus del herpes humano 7 (VHH-7) y al virus del herpes humano 8 (VHH-8). A continuación, se incluyen ejemplos de las gráficas de amplificación resultantes de un ensayo llevado a cabo en el termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Figura 3. Diluciones seriadas de un DNA molde del VHH-6 (10^7 -10 copias/reacción) en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).



[Firma]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

[Firma]
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Figura 4. Diluciones seriadas de un DNA molde del VHH-7 (10^7 -10 copias/reacción) en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).

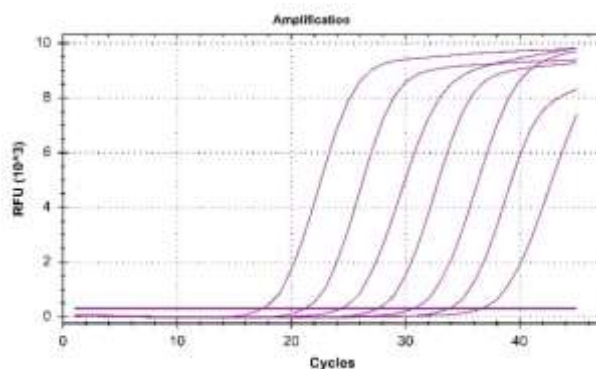
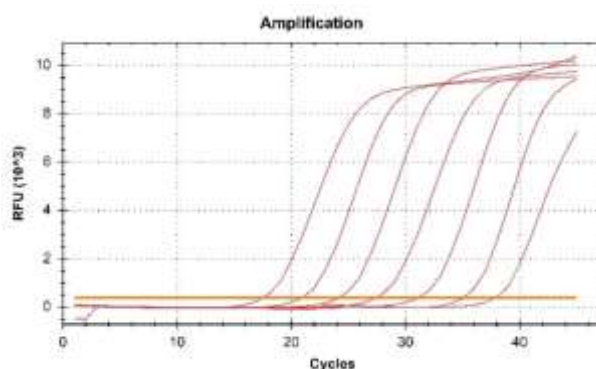


Figura 5. Diluciones seriadas de un DNA molde del VHH-8 (10^7 -10 copias/reacción) en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).



La linealidad del ensayo también se determinó con los equipos QuantStudio™ Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems™), DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y Rotor-Gene® Q (QIAGEN), empleando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 y 10 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente al VHH-6, VHH-7 y VHH-8. Se observó el mismo nivel de detección que el obtenido con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) en todo el rango estudiado. Los resultados permitieron confirmar que la linealidad, la regresión lineal, la eficiencia y el nivel de detección observado para todas las dianas detectadas con VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit, utilizando los cuatro termocicladores mencionados, cumplen con los criterios de aceptación.

12.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica normalmente suele hacer referencia al Límite de Detección (LoD). En la práctica, los parámetros de LoD y Límite de Blanco (LoB) se establecen como parte de la evaluación de la sensibilidad analítica.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

12.2.1. Límite de Blanco (LoB)

Para la determinación del “Límite de Blanco” (LoB), se realizó un ensayo de control sin muestra en ambas variantes del producto, bien con el Control Interno (CI) o con el Control de Extracción (CE). Para ello, se reconstituyeron placas de 96 pocillos con buffer de rehidratación y, a continuación, se añadieron 5 µL a cada pocillo de Control Negativo (agua libre de RNAsa/DNAsa) o ácido nucleico negativo para el DNA del VHH-6, VHH-7 y VHH-8, procedente de matrices negativas (EDTA-plasma, suero, EDTA-sangre completa, LCR y LCR sin haber sido sometido a una extracción previa de los ácidos nucleicos).

En primer lugar, el ensayo de control sin muestra se realizó con agua libre de RNAsa/DNAsa como espécimen, la cual se añadió a los pocillos correspondientes de las placas de 96 pocillos. Utilizando la variante del producto con Control Interno, las muestras se analizaron con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). Por el contrario, utilizando la variante del producto con Control de Extracción, las muestras se analizaron con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Del mismo modo, los ácidos nucleicos procedentes de matrices negativas (EDTA-plasma, suero, EDTA-sangre completa y LCR) fueron extraídos con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y analizados con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). La matriz de LCR no sometida al proceso de extracción de ácidos nucleicos fue evaluada con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), con el fin de evaluar cómo el proceso de extracción podría afectar a los resultados del ensayo de LoB.

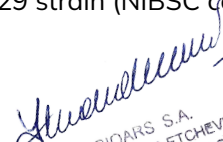
En conclusión, no se observaron amplificaciones inespecíficas con ninguno de los termocicladores utilizados, excepto en el canal Cy5 (detección del VHH-7) en la matriz negativa de EDTA-sangre completa. No se trata de una situación de riesgo, ya que es un valor esperado, dado que los valores falsos positivos en la matriz de EDTA-sangre completa suponen un reto, especialmente debido a la capacidad de este virus para integrarse en el genoma humano y persistir en los individuos a lo largo de toda su vida. Por lo tanto, los resultados cumplen con los criterios de aceptación inicialmente establecidos, teniendo en cuenta el establecimiento de un valor de corte Ct de 37 para VHH-7 en muestras de EDTA-sangre completa.

12.2.2. Límite de Detección (LoD)

El Límite de Detección (LoD) de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit fue analizado utilizando matrices biológicas verificadas como DNA-diana negativas (muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR y suero), contaminadas con las siguientes cepas de referencia:

- 1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain (NIBSC code: 15/266).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ-CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

- Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivada por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810071CFHI).
- Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivada por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810104CFHI).

Las muestras se extrajeron y analizaron siguiendo cinco flujos de trabajo:

	Extracción	Amplificación
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
3	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
4	_*	CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
5	_*	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)

Tabla 7. Métodos de extracción y amplificación (flujos de trabajo) validados utilizando VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit.

* NOTA: Estos flujos de trabajo solo se llevaron a cabo con la matriz de LCR con el fin de comparar los resultados con los obtenidos mediante el procedimiento de referencia (extracción + amplificación por PCR).

VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit demostró los valores de LoD indicados en la siguiente tabla, con una tasa de positividad del $\geq 95\%$. En el caso de la matriz de LCR, al ser la más restrictiva, el LoD se determinó siguiendo los flujos de trabajo 1 y 4 utilizando tanto matriz de LCR sintética como real, con el fin de verificar si eran equivalentes. Dado que se obtuvieron valores de LoD similares, los flujos de trabajo restantes se probaron utilizando matriz de LCR sintética.

El LoD final del producto para cada diana y matriz validadas se corresponderá con el valor de LoD más restrictivo de todos los obtenidos, siempre que se cumpla con los criterios de aceptación de estar dentro del rango de 1-3xLoD.

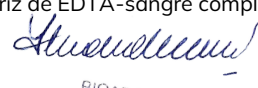
	LoD				
	EDTA-plasma	LCR	LCR SE	EDTA-sangre completa	Suero
VHH-6	10 UI/rxn (1 UI/ μ L)	10 UI/rxn (1 UI/ μ L)	5 UI/rxn (1 UI/ μ L)	30 UI/rxn (3 UI/ μ L)	20 UI/rxn (2 UI/ μ L)
VHH-7	0,04 TCID ₅₀ /rxn (0,004 TCID ₅₀ / μ L)	0,04 TCID ₅₀ /rxn (0,004 TCID ₅₀ / μ L)	0,02 TCID ₅₀ /rxn (0,004 TCID ₅₀ / μ L)	n.a.*	0,04 TCID ₅₀ /rxn (0,004 TCID ₅₀ / μ L)
VHH-8	0,2 TCID ₅₀ /rxn (0,02 TCID ₅₀ / μ L)	0,2 TCID ₅₀ /rxn (0,02 TCID ₅₀ / μ L)	0,2 TCID ₅₀ /rxn (0,04 TCID ₅₀ / μ L)	0,2 TCID ₅₀ /rxn (0,02 TCID ₅₀ / μ L)	0,2 TCID ₅₀ /rxn (0,02 TCID ₅₀ / μ L)

Tabla 8. Resultados de LoD obtenidos con VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit, utilizando los flujos de trabajo validados y matrices contaminadas con material de referencia para VHH-6, VHH-7 y VHH-8. rxn = reacción, UI = Unidades Internacionales, TCID₅₀ = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés), LCR = líquido cefalorraquídeo, SE = no sometido al proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Nota: los microlitros (μ L) se refieren a la muestra original antes del proceso de extracción de ácido nucleico.

* n.a. = no aplicable. Tenga en cuenta que no se pudo obtener el valor LoD del VHH-7 a partir de muestras de EDTA-sangre completa, ya que estas muestras de donantes sanos dieron positivo para este patógeno debido al fenómeno de latencia. No se trata de una situación de riesgo, ya que es un valor esperado, dado que los valores falsos positivos en la matriz de EDTA-sangre completa suponen


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

un reto, especialmente debido a la capacidad de este virus para integrarse en el genoma humano y persistir en los individuos a lo largo de toda su vida.

En conclusión, los valores finales de LoD por diana y matriz validada cumplen con los criterios de aceptación establecidos inicialmente, y no se observaron diferencias significativas entre los flujos de trabajo. Además, no se observaron discrepancias entre las matrices, pero EDTA-sangre completa se excluyó de los experimentos de validación debido a los problemas documentados en la literatura sobre la detección del VHH-6 y el VHH-7. Por lo tanto, se seleccionó EDTA-plasma como matriz representativa para los siguientes experimentos analíticos. La matriz de LCR no sometida al proceso de extracción de ácidos nucleicos también se evaluó en todos los experimentos con el fin de analizar el rendimiento del test en un flujo de trabajo que no requiere la extracción de ácidos nucleicos.

12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico y sintético perteneciente a VHH-6, VHH-7 y VHH-8, utilizando el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados permitieron confirmar la detección correcta de las dianas en el rango de medición indicado en la siguiente tabla.

	Rango de medición	
Virus del herpes humano 6	10 ⁷ copias/reacción	10 copias/reacción
$\bar{x}$ (Ct)	18,07	37,80
Virus del herpes humano 7	10 ⁷ copias/reacción	10 copias/reacción
$\bar{x}$ (Ct)	19,68	39,08
Virus del herpes humano 8	10 ⁷ copias/reacción	50 copias/reacción
$\bar{x}$ (Ct)	19,87	37,31

Tabla 9. Rango de medición de VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct.

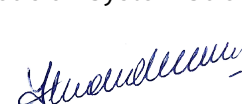
En conclusión, el rango de medición de VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit fue determinado satisfactoriamente y cumplió con los criterios de aceptación para la validación inicialmente establecidos, asegurando que el producto proporciona resultados fiables, precisos y reproducibles en un amplio espectro de cargas virales, y confirmando su utilidad en diversos escenarios de diagnóstico clínico.

12.4. Exactitud

12.4.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit fue evaluada testando el material de referencia listado a continuación. Las cepas de referencia se añadieron en matriz de EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y en matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos. Después, las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Directora Ejecutiva


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

analizadas con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). En el caso de DNA/RNA de referencia y/o cepas de referencia añadidas en la matriz de LCR, se analizaron directamente con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todas las muestras se detectaron correctamente y cumplieron con los criterios de aceptación inicialmente establecidos.

1. Fragmentos de DNA sintéticos

- Nombre del fragmento de DNA sintético para el gen *U65-U66* del virus del herpes humano 6: HHAXPC, canal FAM.
- Nombre del fragmento de DNA sintético para el gen *U57* del virus del herpes humano 7: HHBXPC, canal Cy5.
- Nombre del fragmento de DNA sintético para el gen *ORF73* del virus del herpes humano 8: HHCXPC, canal ROX.

2. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Referencia externa	Nombre del patógeno	Variedad
15/266	Virus del herpes humano 6B	1er Estándar Internacional de la WHO para el DNA del virus VHH-6B para Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos

Tabla 10. Material de referencia procedente del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), extraído con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y analizado con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

3. ZeptoMetrix

Referencia externa	Nombre del patógeno	Variedad
0810529CFHI	Virus del herpes humano 6A	Virus del herpes humano 6A cepa GS
0810071CFHI	Virus del herpes humano 7	Virus del herpes humano tipo 7
0810104CFHI	Virus del herpes humano 8	Virus del herpes humano tipo 8

Tabla 11. Material de referencia procedente de ZeptoMetrix, extraído con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y analizado con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

4. Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQA)

Se analizaron un total de 110 muestras que contenían el virus del herpes humano 6, el virus del herpes humano 7 y/o el virus del herpes humano 8, entre otros virus no diana, procedentes de los programas INSTAND y QCMD, mostrando una concordancia del > 95%.

12.4.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, se realizaron ensayos intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo, inter-lote, e inter-termociclador (reproducibilidad). El panel de muestras se contaminó en matriz de EDTA-plasma (como matriz


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y en matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos. Después, las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras fueron analizadas directamente con el termociclador indicado en cada subsección. En cada carrera se incluyeron un Control Positivo y un Control Negativo.

Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando diez réplicas de todas las muestras en un día por un técnico, utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit y el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	31,54	0,24	0,76
	VHH-7	Cy5	31,65	0,16	0,51
	VHH-8	ROX	31,38	0,18	0,57
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	32,70	0,32	0,98
	VHH-7	Cy5	33,39	0,19	0,55
	VHH-8	ROX	32,53	0,30	0,91
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,31	0,28	1,38
Control Positivo	VHH-6	FAM	24,11	0,17	0,72
	VHH-7	Cy5	25,37	0,10	0,41
	VHH-8	ROX	24,96	0,09	0,34
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,31	0,34	1,65

Tabla 12. Resultados intra-ensayo de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	32,77	0,73	2,22
	VHH-7	Cy5	33,78	0,29	0,86
	VHH-8	ROX	32,13	0,33	1,02
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	34,04	0,82	2,40
	VHH-7	Cy5	35,03	0,41	1,17
	VHH-8	ROX	33,39	0,39	1,16
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,05	0,04	0,19
Control Positivo	VHH-6	FAM	21,03	0,03	0,13
	VHH-7	Cy5	22,79	0,06	0,28
	VHH-8	ROX	24,15	0,08	0,34
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
	Control Interno	HEX	21,01	0,17	0,81

Tabla 13. Resultados intra-ensayo de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

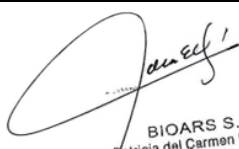
Inter-ensayo

El inter-ensayo se probó analizando tres réplicas de las diferentes muestras en tres días diferentes por tres técnicos distintos con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit y el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). En las siguientes tablas se muestra un resumen de los resultados.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	31,63	0,27	0,84
	VHH-7	Cy5	31,71	0,15	0,46
	VHH-8	ROX	31,34	0,20	0,64
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	32,72	0,31	0,96
	VHH-7	Cy5	33,48	0,25	0,76
	VHH-8	ROX	32,51	0,28	0,87
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,40	0,15	0,75
Control Positivo	VHH-6	FAM	24,17	0,20	0,84
	VHH-7	Cy5	25,41	0,08	0,30
	VHH-8	ROX	24,90	0,14	0,56
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,38	0,16	0,77

Tabla 14. Resultados inter-ensayo de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	32,53	0,63	1,93
	VHH-7	Cy5	33,02	0,39	1,18
	VHH-8	ROX	31,54	0,70	2,22
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	33,55	0,50	1,50
	VHH-7	Cy5	34,28	0,44	1,29
	VHH-8	ROX	32,66	0,53	1,63
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,95	0,24	1,13
Control Positivo	VHH-6	FAM	20,95	0,11	0,50
	VHH-7	Cy5	22,70	0,21	0,92
	VHH-8	ROX	23,97	0,08	0,35


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,87	0,21	1,01

Tabla 15. Resultados inter-ensayo de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

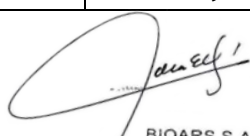
Inter-lote

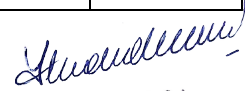
Los valores inter-lote se determinaron analizando tres réplicas de las diferentes muestras en la misma carrera y por un solo técnico, mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit y el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	31,78	0,30	0,93
	VHH-7	Cy5	31,78	0,18	0,56
	VHH-8	ROX	31,54	0,19	0,60
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	32,96	0,30	1,46
	VHH-7	Cy5	33,55	0,30	0,90
	VHH-8	ROX	32,78	0,21	0,66
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,16	0,17	0,82
Control Positivo	VHH-6	FAM	24,32	0,09	0,35
	VHH-7	Cy5	25,38	0,18	0,71
	VHH-8	ROX	24,98	0,18	0,71
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,41	0,54	2,62

Tabla 16. Resultados inter-lote de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	32,13	0,56	1,75
	VHH-7	Cy5	32,76	0,39	1,19
	VHH-8	ROX	31,45	0,28	0,90
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	33,24	0,90	2,70
	VHH-7	Cy5	34,27	0,48	1,41
	VHH-8	ROX	32,81	0,44	1,34
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,08	0,04	0,19
Control Positivo	VHH-6	FAM	21,11	0,22	1,05
	VHH-7	Cy5	22,84	0,26	1,12


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
	VHH-8	ROX	24,25	0,08	0,33
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,64	0,15	0,72

Tabla 17. Resultados inter-lote de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

Inter-termociclador

Los valores inter-termociclador se determinaron analizando tres réplicas de las mismas muestras utilizadas para los ensayos intra-ensayo, inter-ensayo e inter-lote, utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. El DNA extraído de las muestras, así como el Control Positivo y el Control Negativo, fueron analizados juntos por el mismo técnico. Cuando se utilizó matriz de EDTA-plasma, las muestras se analizaron en los equipos CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). Cuando se utilizó matriz de LCR, las muestras se analizaron en los equipos CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	31,76	0,64	2,02
	VHH-7	Cy5	31,29	0,47	1,51
	VHH-8	ROX	31,10	0,37	1,18
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	33,22	0,69	2,07
	VHH-7	Cy5	33,22	0,41	1,23
	VHH-8	ROX	32,48	0,43	1,31
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,28	0,43	2,11
Control Positivo	VHH-6	FAM	24,59	0,68	2,75
	VHH-7	Cy5	25,21	0,22	0,87
	VHH-8	ROX	24,70	0,18	0,74
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,27	0,28	1,38

Tabla 18. Resultados inter-termociclador de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 1 (6xLoD)	VHH-6	FAM	32,22	1,28	3,96
	VHH-7	Cy5	32,32	0,78	2,41
	VHH-8	ROX	31,06	0,51	1,64

Muestra	Diana	Canal VIASURE	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV%
Muestra 2 (3xLoD)	VHH-6	FAM	33,69	1,75	5,19
	VHH-7	Cy5	33,94	0,74	2,19
	VHH-8	ROX	32,44	0,56	1,72
Muestra negativa	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	19,98	0,47	2,33
Control Positivo	VHH-6	FAM	20,79	0,37	1,76
	VHH-7	Cy5	22,20	0,79	3,54
	VHH-8	ROX	23,62	0,56	2,37
Control Negativo	VHH-6/VHH-7/VHH-8	FAM/Cy5/ROX	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	20,23	0,36	1,79

Tabla 19. Resultados inter-termociclador de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a. = no aplica.

En conclusión, todos los ensayos mostraron amplificación en el Control Interno con un valor Ct ≤ 35 y se cumplieron los criterios de aceptación en todos los experimentos (intra-ensayo, inter-ensayo, ensayo inter-lote y ensayo inter-termociclador). El estudio de precisión confirmó el rendimiento fiable del ensayo VIASURE, independientemente de la matriz y del procedimiento de extracción seguido (o no), como se demostró anteriormente en los experimentos de LoD. Esta consistencia sugiere que las capacidades de detección del dispositivo son robustas y no se ven influidas de manera significativa por el tipo de muestra y/o el flujo de trabajo utilizado, siempre que se cumplan los criterios de precisión.

12.4.3. Exactitud

El experimento de exactitud se llevó a cabo mediante el análisis de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAs). Se analizaron un total de 110 muestras que contenían VHH-6 y VHH-8, entre otros virus no diana. Cada material de referencia se analizó una vez por carrera, incluyendo los controles positivo y negativo. Los paneles se extrajeron con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y se analizaron con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los resultados de las pruebas, que se muestran en la tabla siguiente, se compararon con los informes finales facilitados por los organizadores de los programas EQA.

Diana	Muestras positivas	ORA (%)	TP	FN	PPA (%)	TN	FP	NPA (%)
VHH-6	55	99,1	54	1	98,2	55	0	100
VHH-7	0	100	0	0	-	110	0	100
VHH-8	11	100	11	0	100	99	0	100
Total	66	99,7	65	1	98,5	264	0	100

Tabla 20. Resultados de exactitud utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. TP = Verdaderos positivos, FN = Falsos negativos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos positivos, PPA = Porcentaje de acuerdo positivo, NPA = Porcentaje de acuerdo negativo, ORA = Acuerdo global.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

En conclusión, el VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit ofrece una alta exactitud en la detección del DNA de VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8, con excelentes valores de NPA y PPA para todas las cepas testadas, cumpliendo con los criterios de aceptación para la validación.

12.5. Tasa de fallo de todo el sistema

El parámetro de la tasa de fallo de todo el sistema se analizó para determinar la robustez y la fiabilidad del sistema PCR en condiciones reales.

Para demostrar que los especímenes de DNA de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 con baja positividad se detectan con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, se prepararon muestras contaminando matriz negativa de EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y matriz negativa de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos con las siguientes cepas de referencia:

- 1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain (NIBSC code: 15/266).
- Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivada por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810071CFHI).
- Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivada por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810104CFHI).

Se prepararon un total de 100 muestras de DNA de baja positividad por diana con una concentración de virus equivalente a tres veces su LoD (3xLoD) y se testaron con el ensayo VIASURE. Las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras (EDTA-plasma y LCR) se analizaron con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

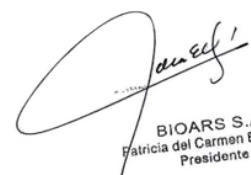
Los resultados del estudio con la matriz de EDTA-plasma y la matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos demuestran que todas las réplicas de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 fueron reactivas para su diana correspondiente, representando una tasa de fallo de todo el sistema del 0%. Por lo tanto, estos resultados cumplieron los criterios de aceptación establecidos.

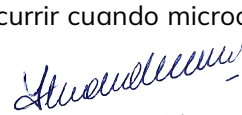
12.6. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit *in silico* y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, DNA/RNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

12.6.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay cuatro componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada, la coinfección, la interferencia microbiana y la interferencia de sustancias. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando microorganismos


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

genéticamente relacionados están presentes en una muestra de paciente, mientras que la interferencia microbiana puede ocurrir si esos microorganismos genéticamente relacionados alteran la detección de los microorganismos diana cuando estos están presentes. Del mismo modo, el estudio de coinfección pretende evaluar si los microorganismos diana en diferentes concentraciones en la misma muestra pueden alterar la detección entre ellos. Por último, la interferencia de sustancias puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la PCR en tiempo real.

Reactividad cruzada análisis *in silico*

La reactividad cruzada se evaluó utilizando secuencias de referencia de microorganismos relacionados pero diferentes de las dianas detectadas, descargadas de la base de datos NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), y con herramientas de alineamiento como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un software de análisis bioinformático interno. Los resultados a mostrar solo presentan secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%. Las secuencias alineadas con un porcentaje de homología inferior al 80% se consideraron improbables de ser detectadas.

Todas las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de homología inferior al 80% con el set de primers y sondas de VHH-6, VHH-7 y VHH-8, lo que sugiere que ninguna de las secuencias analizadas podría afectar a la correcta detección de estos virus.

Por lo tanto, se pudo concluir que **los diseños de las dianas de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit* no deberían causar falsos positivos en la detección de VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8 cuando otros organismos están presentes.**

Especificidad analítica ensayo experimental

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La **reactividad cruzada** de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit* fue confirmada probando un panel de diferentes microorganismos asociados con encefalitis, con los que la mayoría de la población puede haber estado infectada, negativo para las dianas objeto de estudio. Cuando fue posible y cuando se disponía de los datos de concentración, los microorganismos se evaluaron a niveles médicamente relevantes (generalmente 10^5 - 10^6 UFC/mL para bacterias y hongos, y 10^4 - 10^5 UFP/mL para virus). El panel de muestras se contaminó en matriz negativa de EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y en matriz negativa de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos. Las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras (EDTA-plasma y LCR) se analizaron con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). No se detectó reactividad cruzada en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit* con ninguno de los siguientes microorganismos analizados, excepto con los microorganismos diana.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> cepa 46	-	<i>Enterococcus faecalis</i> cepa tipo	-	Herpesvirus 8	+/-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> cepa tipo	-	<i>Enterococcus faecium</i> VRE resistente	-	Virus JC	-
Adenovirus	-	<i>Enterococcus faecium</i> vanA resistente	-	Virus JC tipo 1A	-
Adenovirus 1er Estándar Internacional de la WHO	-	Enterovirus D68	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus tipo 1	-	Enterovirus D68 cepa Fermon	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> cepa PCI 602	-
Adenovirus tipo 3	-	Enterovirus D68 cepa US/MO/14-18949	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-
Adenovirus tipo 2 (especie C)	-	Coxsackievirus B1 cepa Conn-5	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-
Adenovirus tipo 4	-	Coxsackievirus B4	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2	-
Adenovirus tipo 5 (especie C)	-	Echovirus humano 1	-	Virus del sarampión cepa Edmonston	-
Adenovirus tipo 6, cepa Tonsil 99	-	Echovirus 11	-	Virus de las paperas cepa Enders	-
Adenovirus tipo 7	-	Echovirus 4 cepa Pesascek	-	<i>Naegleria fowleri</i>	-
Adenovirus tipo 14	-	Enterovirus humano 71 cepa H	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa tipo	-
Adenovirus tipo 37	-	Virus Epstein-Barr	-	<i>Neisseria meningitidis</i> cepa M2091	-
Adenovirus tipo 40	-	Virus Epstein-Barr B95/8	-	Parechovirus humano	-
Adenovirus tipo 41	-	Virus Epstein-Barr Estándar de la WHO	-	Parechovirus humano 1 cepa Harris	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM 819	-	<i>Escherichia coli</i> cepa NCTC 9001	-	Parechovirus 3	-
<i>Aspergillus niger</i> Z105	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa L-378	-	Parvovirus B19	-
<i>Bacteroides fragilis</i> 2151, cepa tipo	-	Hepatitis B genotipo D, subtipo ayw2/3	-	Parvovirus B19 tipo 1	-
Virus BK	-	Virus de la hepatitis B	-	Parvovirus B19 1er Estándar Internacional	-
Virus BK tipo 1b-2	-	Virus de la hepatitis C	-	Parvovirus B19 3er Estándar Internacional	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	Virus del herpes humano 1 cepa MacIntyre	-	<i>Plasmodium falciparum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Virus del herpes humano 1 cepa HF	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus del herpes humano 1 cepa KOS	-	<i>Cutibacterium acnes</i> cepa tipo	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> cepa CM-1	-	Virus herpes simple 1	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa tipo	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> cepa H99	-	Virus herpes simple 2	-	Virus de la encefalitis de San Luis	-
Cytomegalovirus	-	Virus herpes simple 2 cepa MS	-	Virus Varicella-Zóster	-
Cytomegalovirus 1er Estándar Internacional	-	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	-	Virus Varicella-Zóster cepa Ellen	-
Cytomegalovirus cepa AD169	-	Herpesvirus 6 1er Estándar Internacional	+/-	Virus del herpes humano 3 cepa Ellen	-
Virus del Dengue 2 cepa New Guinea C	-	Virus del herpes humano 6 tipo A	+/-	Virus del herpes humano 3 cepa AV92-3:L	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	Virus del herpes humano 6 tipo B	+/-	Virus del Nilo Occidental	-

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca B	-	Herpesvirus 7	+/-	Virus de la fiebre amarilla	-
<i>Enterococcus durans</i>	-				

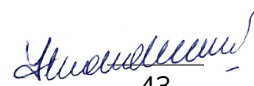
Tabla 21. Microorganismos de referencia utilizados en el ensayo de reactividad cruzada y procedentes de Programas EQA. El resultado "+/-" se refiere al resultado positivo o negativo obtenido en los diferentes canales en función de la diana detectada. Si el microorganismo analizado es una de las dianas detectadas por el dispositivo, se obtiene un resultado positivo en el canal correspondiente y un resultado negativo en los demás canales.

Además, la **interferencia microbiana** se testó con un panel de diferentes microorganismos asociados con síntomas neurológicos, con los que la mayoría de la población puede haber estado infectada, a altas concentraciones (10^5 - 10^6 UFC/mL para bacterias y 10^4 - 10^5 UFP/mL para virus), junto con la presencia de las dianas detectadas por el dispositivo VIASURE a una concentración de 3xLoD. Esto se hizo para verificar que la presencia de otros microorganismos asociados con síntomas neurológicos no altera la detección de las dianas identificadas con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para la preparación de muestras contaminadas en matriz de EDTA-plasma y LCR que para el ensayo de reactividad cruzada, y se incluyeron dos controles: Matriz Control Positivo (PMC) (una matriz biológica clínica verificada como negativa para el DNA diana, contaminada con el material de referencia positivo para cada diana a 3xLoD y sin microorganismos interferentes) y Matriz Control Negativo (NMC) (matriz negativa para el DNA sin microorganismos potencialmente interferentes ni microorganismos/material de referencia añadido). Las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras (EDTA-plasma y LCR) se analizaron con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Los resultados obtenidos mostraron que la detección del DNA de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 no se vio alterada cuando se analizó a bajas concentraciones en presencia de otros microorganismos relacionados con síntomas neurológicos.

Prueba de interferencia microbiana					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	Parvovirus B19	+	Enterovirus D68	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	+	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	+
Virus BK tipo IV	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	+	Parechovirus tipo 1	+
<i>Candida albicans</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RH 815	+	Virus de la encefalitis de San Luis	+
Cytomegalovirus tipo 1	+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+
<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285;O18:H7:K1	+	<i>Toxoplasma gondii</i>	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
<i>Klebsiella aerogenes</i>	+	<i>Treponema pallidum</i>	+	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	+
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	+	Virus Varicella-Zóster cepa Ellen	+	Virus del Nilo Occidental (Heja)	+
Virus Epstein-Barr Estándar de la WHO	+	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	+	Virus de la fiebre amarilla	+


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


43
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Prueba de interferencia microbiana					
Virus del herpes humano 1 cepa MacIntyre	+	Chikungunya	+	<i>Haemophilus influenzae</i>	+
Virus del herpes humano 2 MS	+	<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	+	Virus de las paperas cepa Enders	+
Virus JC tipo 1A	+	Echovirus tipo 4	+	Adenovirus 1er Estándar Internacional de la WHO	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	<i>Enterococcus durans</i>	+	PMC	+
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	NMC	-
<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	+				

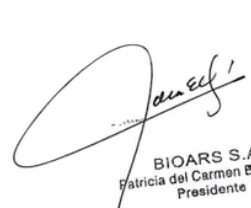
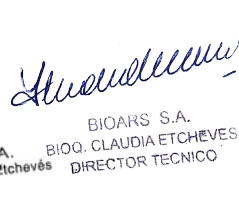
Tabla 22. Microorganismos de referencia utilizados en el ensayo de interferencia microbiana, analizados con el flujo de trabajo MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para la matriz EDTA-plasma y con el flujo de trabajo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para la matriz de LCR.

Por último, se realizó el ensayo de **coinfección** para determinar si VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit podía detectar de forma robusta y específica los microorganismos diana cuando estaban presentes en una coinfección con los otros microorganismos detectados en el dispositivo. Esto se demostró detectando diferentes combinaciones de una diana a baja concentración (3xLoD) y las otras dianas a muy alta concentración (generalmente 10^4 - 10^5 unidades/mL, si es posible). Se llevó a cabo el mismo procedimiento para la preparación de muestras contaminadas en matriz de EDTA-plasma y LCR que para el ensayo de reactividad cruzada, con diferentes concentraciones de las dianas objeto de estudio. Las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras (EDTA-plasma y LCR) se analizaron con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

	VHH-6	VHH-7	VHH-8
Control	3xLoD	3xLoD	3xLoD
Muestra 1	$5,62 \times 10^2$ UI/ μ L	3xLoD	3xLoD
Muestra 2	3xLoD	1,17 TCID ₅₀ / μ L	3xLoD
Muestra 3	3xLoD	3xLoD	7,24 TCID ₅₀ / μ L

Tabla 23. Composición de las muestras contaminadas con diferentes combinaciones de las dianas detectadas con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. UI = Unidades Internacionales, TCID₅₀ = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés).

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de VHH-7 a alta concentración (1.17 TCID₅₀/ μ L) inhibe la amplificación del DNA de VHH-6. Por lo tanto, se diseñaron dos experimentos para conocer cómo la presencia de VHH-7 afecta a la amplificación del DNA de VHH-6. En primer lugar, se evaluó el efecto inhibitorio de VHH-7 mediante la disminución de su concentración y con VHH-6 y VHH-8 a una concentración de 5xLoD. En segundo lugar, se llevó a cabo un experimento en el que se fijó la concentración de VHH-7 a una concentración inhibitoria y se utilizaron concentraciones crecientes de VHH-6 y VHH-8. La concentración seleccionada fue $1,17 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/ μ L, puesto que fue la concentración más baja que había demostrado la inhibición de la diana VHH-6 en el primer experimento.



 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés, Presidente
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES, DIRECTOR TÉCNICO

En conclusión, la presencia de VHH-7 a una concentración superior a $1,17 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/μL interfiere con la detección de VHH-6 a concentraciones bajas, cercanas al Límite de Detección (LoD). Sin embargo, no se ha observado ninguna interferencia con la detección de VHH-8. Por el contrario, una concentración elevada de VHH-6 daría lugar a una disminución del riesgo de interferencia.

En general, los resultados de los ensayos de reactividad cruzada cumplen con los criterios de aceptación para la validación e indican una alta especificidad de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit para la detección de los microorganismos diana, minimizando así el riesgo de resultados falsos positivos. La ausencia de amplificaciones inespecíficas en presencia de otros microorganismos relacionados corrobora aún más la capacidad del dispositivo para distinguir con exactitud los microorganismos diana.

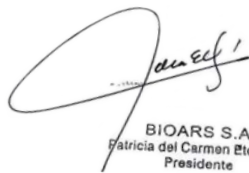
Interferencias e inhibidores de PCR

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia y reactividad cruzada de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. Se evaluaron un total de 32 sustancias potencialmente presentes en matriz de EDTA-plasma, 27 sustancias potencialmente presentes en matriz de suero y LCR, y 28 sustancias potencialmente presentes en matriz de EDTA-sangre completa. Los ensayos se realizaron con matriz biológica negativa contaminada con 1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain (NIBSC code: 15/266); Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivado por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810071CFHI); y Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivado por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810104CFHI), a una concentración de 3xLoD. Las muestras (excepto la matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) se extrajeron con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y se amplificaron con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Como control de la prueba se utilizó la mezcla de reacción rehidratada sin ninguna sustancia interferente, a la que se añadió posteriormente el ácido nucleico extraído de la muestra simulada (Matriz Control Positivo (PMC)). Además, se incluyó en el ensayo un control negativo, que consistió en una muestra de matriz de DNA negativa extraída y analizada en la PCR en tiempo real sin sustancias potencialmente interferentes ni microorganismos/material de referencia añadidos (Matriz Control Negativo (NMC)).

Tenga en cuenta que no se pudo realizar el estudio de sustancias interferentes de VHH-7 en la matriz de EDTA-sangre completa porque las muestras de EDTA-sangre completa de donantes sanos dieron positivo para este patógeno debido al fenómeno de latencia.

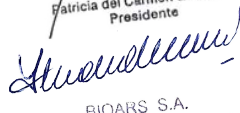
Ensayo de evaluación de interferencias sólo en PCR en tiempo real

Los siguientes resultados se obtuvieron cuando las sustancias potencialmente interferentes se añadieron directamente a la mezcla de reacción rehidratada, la cual también contiene el ácido nucleico previamente extraído de las muestras simuladas, o de la matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos:


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Matriz de EDTA-plasma		
17- α -Ethinilestradiol	$7,50 \times 10^{-9}$ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Azatioprina	$2,58 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$1,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ciclosporina	$2,81 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Cidofovir	$2,02 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$8,75 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	$4,125 \times 10^{-1}$ UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$3,13 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	2,50 mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$1,56 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	$4,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Prednisona	$9,90 \times 10^{-5}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	3,75 mg/mL	N.I.
Valganciclovir	$2,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Matriz de suero		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$4,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente

 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
 DIRECTOR TÉCNICO

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Sulfato/Fosfato de cloroquina	$6,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$7,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	$8,25 \times 10^{-1}$ UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$6,25 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$6,25 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$1,95 \times 10^5$ células/mL	N.I.
Omeprazol	$8,40 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	$1,50 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Zinc/Sulfato de zinc	$3,00 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Matriz de EDTA-sangre completa		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$1,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Sulfato/Fosfato de cloroquina	1,125 mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$1,75 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	$4,13 \times 10^{-1}$ UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$6,25 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	2,50 mg/mL	N.I.

[Firma]
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TÉCNICO

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$1,56 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	$4,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Omeprazol	$8,40 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	3,75 mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Zinc/Sulfato de zinc	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Matriz de LCR		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA-sangre completa/EDTA	1,25 % (v/v)	N.I.
Caseína	$6,25 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Cafeína	$1,08 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Difenhidramina	$7,74 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Flucitosina	$2,04 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Fluoxetina	$1,42 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$8,75 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Haloperidol	$7,35 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$6,25 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$1,56 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Triglicéridos	1,88 mg/mL	N.I.
Ácido valproico	$3,18 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.

Tabla 24. Sustancias potencialmente interferentes. N.I. = Interferencias no notificables, UI = Unidades Internacionales, v/v = volumen por volumen.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

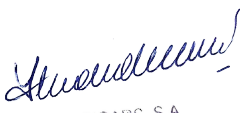

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Evaluación de la interferencia en todo el proceso (extracción y PCR en tiempo real)

Los siguientes resultados se obtuvieron cuando las sustancias potencialmente interferentes se añadieron a la muestra simulada que se iba a extraer (incluida la matriz de LCR), de la que se añadió el eluido obtenido al ensayo de PCR en tiempo real:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Matriz de EDTA-plasma		
17- α -Ethinilestradiol	$7,50 \times 10^{-9}$ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Azatioprina	$2,58 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$4,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ciclosporina	1,125 mg/mL	N.I.
Cidofovir	$8,10 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$7,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	3,30 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$2,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$6,25 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	$4,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Prednisona	$9,90 \times 10^{-5}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	$1,50 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Valganciclovir	$2,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Matriz de suero		


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$4,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Sulfato/Fosfato de cloroquina	$6,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$7,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	3,30 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$2,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$6,25 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Omeprazol	$8,40 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	$1,50 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Zinc/Sulfato de zinc	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Matriz de EDTA-sangre completa		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	$4,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Sulfato/Fosfato de cloroquina	1,125 mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$7,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Heparina	3,30 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	$2,19 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$2,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$6,25 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	$8,40 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Omeprazol	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$1,50 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Zinc/Sulfato de zinc	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Matriz de LCR		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido acetilsalicílico	$3,00 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA-sangre completa/EDTA	5,00 % (v/v)	N.I.
Caseína	$5,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Cafeína	$1,08 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	$8,40 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Dextrosa	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Difenhidramina	$7,74 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,80 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Flucitosina	$2,04 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Fluoxetina	$1,42 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$7,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Haloperidol	$7,35 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	$1,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	$2,00 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Lactato	$9,00 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	$1,23 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente

 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
 DIRECTOR TÉCNICO

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
Células mononucleares de EDTA-sangre completa periférica	$6,25 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Triglicéridos	$1,50 \times 10^1$ mg/mL	N.I.
Ácido valproico	$3,18 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	$1,20 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.

Tabla 25. Sustancias potencialmente interferentes. N.I. = Interferencias no notificables, UI = Unidades Internacionales, v/v = volumen por volumen.

En conclusión, diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido testadas con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. Los resultados obtenidos permiten concluir que no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas a las concentraciones indicadas para cada condición.

12.6.2. Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis *in silico* y experimentales.

Reactividad analítica análisis *in silico*

La Reactividad Analítica se evaluó utilizando secuencias descargadas de una base de datos de secuencias de nucleótidos de acceso público como NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), herramientas de búsqueda y/o alineación como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), y un software de análisis bioinformático interno, para demostrar que VHH-6, VHH-7 y/o VHH-8 pueden ser detectados correctamente por el dispositivo. Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Diana	% secuencias detectadas sin desajustes ("mismatches")	Nº secuencias
Virus del herpes humano 6	97,79	136
Virus del herpes humano 7	100	21
Virus del herpes humano 8	95,95	173

Tabla 26. Análisis *in silico* de la reactividad analítica.

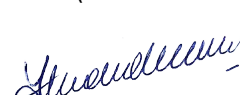
Por lo tanto, el análisis de la reactividad analítica mostró una correcta detección de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 con VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit.

Reactividad analítica ensayo experimental

La reactividad analítica de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a las siguientes cepas de referencia:

- 1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain (NIBSC code: 15/266).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivado por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810071CFHI).
- Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivado por calor) (ZeptoMetrix, Ref: 0810104CFHI).

Las cepas de referencia listadas fueron añadidas a la matriz de EDTA-plasma y LCR en una concentración de 3xLoD. Después, el ácido nucleico de todos los materiales de referencia se extrajo de las muestras de EDTA-plasma con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science) y se analizó con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), mientras que de las muestras de LCR se analizó directamente con CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Se obtuvieron resultados positivos utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit, tal y como era esperado:

Microorganismo	Concentración evaluada	Ct FAM (VHH-6)	Ct HEX (CI)	Ct ROX (VHH-8)	Ct Cy5 (VHH-7)
Matriz de EDTA-plasma					
1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain	3,00 UI/μL	34,50	21,43	Neg	Neg
Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivado por calor)	$1,20 \times 10^{-2}$ TCID ₅₀ /μL	Neg	21,04	Neg	35,34
Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivado por calor)	$6,00 \times 10^{-2}$ TCID ₅₀ /μL	Neg	21,15	33,79	Neg
Matriz de LCR no sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos					
1st WHO International Standard for Human Herpesvirus 6, HHV-6B Z-29 strain	6,00 UI/μL	33,05	21,43	Neg	Neg
Human Herpes Virus Type 7, Culture Fluid (inactivado por calor)	$2,40 \times 10^{-2}$ TCID ₅₀ /μL	Neg	21,04	Neg	33,71
Human Herpes Virus Type 8, Culture Fluid (inactivado por calor)	$1,20 \times 10^{-1}$ TCID ₅₀ /μL	Neg	21,15	32,19	Neg

Tabla 27. Resultados del ensayo de reactividad analítica utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit. Neg = negativo, UI = Unidades Internacionales, TCID₅₀ = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés).

Además, la reactividad analítica de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con material de referencia procedente de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAs), mostrando resultados positivos cuando se testaron muestras positivas para VHH-6, VHH-7 y VHH-8. Estos materiales de referencia contenían virus del herpes humano 6 tipo A y virus del herpes humano 6 tipo B.

12.7. Trazabilidad metrológica

No aplica. Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se probó utilizando muestras clínicas preparadas de suero y LCR similares a las humanas, así como muestras clínicas (muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, suero y LCR) de individuos (sin distinción de sexo o edad) tanto sintomáticos como asintomáticos (con sospecha clínica de infección por meningitis y/o signos y


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

síntomas similares a los de meningitis/encefalitis). Para determinar la precisión del diagnóstico clínico, se realizaron cinco evaluaciones clínicas en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los lugares, los tipos de muestras y los flujos de trabajo.

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) (Zaragoza, España)	Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	VHH-6
				VHH-7
				VHH-8
2.A	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España)	Muestras preparadas de suero similares a las humanas	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time Detection System (Bio-Rad)	VHH-6
2.B		Muestras preparadas de LCR similares a las humanas		VHH-7
3	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España)	Muestras clínicas de suero	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time Detection System (Bio-Rad)	VHH-6
				VHH-7
				VHH-8
4.A	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España)	Muestras clínicas de EDTA-plasma	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) o DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	VHH-6
4.B		Muestras clínicas de EDTA-sangre completa		VHH-7
4.C		Muestras clínicas emparejadas de EDTA-plasma y EDTA-sangre completa		VHH-8
5.A	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) (Zaragoza, España)	Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad)	VHH-6
5.B		Muestras de EDTA-plasma		VHH-7

Tabla 28. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores verdaderos positivos y verdaderos negativos, los valores falsos positivos y falsos negativos, la sensibilidad, la especificidad, los valores de PPV y NPV, y el cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1	CLART® ENTHERPEX (Genómica)	VHH-6	0	48	0	0	n.a.*	1 (0,93-1)	n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*
		VHH-7	1	47	0	0	1 (0,03-1)	1 (0,92-1)	1 (0,21-1)	1 (0,92-1)	72,00 (4,08-1.271)	0,25 (0,023-2,79)
		VHH-8	2	46	0	0	1 (0,16-1)	1 (0,92-1)	1 (0,34-1)	1 (0,92-1)	78,33 (4,75-1.292)	0,168 (0,013-2,12)
2.A	Caracterización inicial	VHH-6	172	96	0	2	0,99 (0,96-1)	1 (0,96-1)	0,99 (0,96-1)	1 (0,96-1)	191,23 (12,05-3.035)	0,01 (0,004-0,05)
		VHH-7	174	96	0	0	1 (0,98-1)	1 (0,96-1)	1 (0,98-1)	1 (0,96-1)	193 (12,19-3.070)	0,003 (0-0,05)

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
	2.B	VHH-8	174	96	0	0	1 (0,98-1)	1 (0,96-1)	1 (0,98-1)	1 (0,96-1)	193 (12,19-3.070)	0,003 (0-0,05)
VHH-6		141	97	0	1	0,99 (0,96-1)	1 (0,96-1)	0,99 (0,96-1)	1 (0,96-1)	193,94 (12,22-3.079)	0,01 (0-0,05)	
VHH-7		142	97	0	0	1 (0,97-1)	1 (0,96-1)	1 (0,97-1)	1 (0,96-1)	195,31 (12,303-3.100)	0,004 (0-0,06)	
VHH-8		142	97	0	0	1 (0,97-1)	1 (0,96-1)	1 (0,97-1)	1 (0,96-1)	195,31 (12,303-3.100)	0,004 (0-0,06)	
3	Métodos moleculares de referencia ^{1*}	VHH-6	1	15	0	0	1 (0,03-1)	1 (0,78-1)	1 (0,21-1)	1 (0,80-1)	24,00 (1,40-412,05)	0,26 (0,02-2,85)
		VHH-7	0	16	0	0	n.a.*	1 (0,81-1)	n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*
		VHH-8	11	5	0	0	0,98 (0,72-1)	1 (0,45-1)	1 (0,74-1)	1 (0,57-1)	11,50 (0,81-163,80)	0,05 (0,01-0,69)
4.A	Métodos moleculares de referencia ^{1*}	VHH-6	64	561	0	0	1 (0,94-1)	1 (0,99-1)	1 (0,94-1)	1 (0,99-1)	1.115 (69,84-17.047)	0,008 (0-0,122)
		VHH-7	0	625	0	0	n.a.*	1 (0,99-1)	n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*
		VHH-8	60	564	0	1	0,98 (0,91-1)	1 (0,99-1)	0,98 (0,91-1)	1 (0,99-1)	1.102 (69,04-17.612)	0,024 (0-0,118)
4.B		VHH-6	101	524	0	0	1 (0,96-1)	1 (0,99-1)	1 (0,96-1)	1 (0,99-1)	1.044 (64,43-16.683)	0,005 (0-0,078)
		VHH-7	309	316	0	0	1 (0,99-1)	1 (0,99-1)	1 (0,99-1)	1 (0,99-1)	632,98 (39,68-10.097)	0,002 (0-0,026)
		VHH-8	60	564	0	1	0,98 (0,91-1)	1 (0,99-1)	0,98 (0,91-1)	1 (0,99-1)	1.102 (69,04-17.612)	0,024 (0-0,118)
4.C	Resultados de matriz de EDTA-plasma ^{2*}	VHH-6	64	524	37	0	1 (0,94-1)	0,93 (0,91-0,95)	1 (0,94-1)	0,93 (0,91-0,95)	14,871 (10,91-20,28)	0,008 (0-0,130)
		VHH-7	0	316	309	0	n.a.*	0,51 (0,47-0,55)	n.a.*	n.a.*	n.a.*	n.a.*
5.A	Allplex™ Meningitis-V1 Assay (Seegene)	VHH-6	6	363	0	0	1 (0,54-1)	1 (0,99-1)	1 (0,61-1)	1 (0,99-1)	676,00 (42,042-10869,5)	0,072 (0,005-1,034)
		VHH-7	3	364	2	0	1 (0,29-1)	0,99 (0,98-0,99)	1 (0,43-1)	0,99 (0,98-0,99)	128,45 (36,369-466,49)	0,126 (0,009-1,682)
5.B		VHH-6	9	63	0	0	1 (0,66-1)	1 (0,94-1)	1 (0,70-1)	1 (0,94-1)	121,60 (7,661-1930,2)	0,050 (0,003-0,751)
		VHH-7	1	71	0	0	1 (0,02-1)	1 (0,94-1)	1 (0,20-1)	1 (0,94-1)	108,00 (6,088-1915,8)	0,252 (0,023-2,777)

Tabla 29. Valores verdaderos positivos (TP) y valores verdaderos negativos (TN), valores falsos positivos (FP) y valores falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV) y cocientes de verosimilitud (LR+ y LR-) para VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit.

* n.a. = no aplicable. Obsérvese que, dado que no se analizaron muestras verdaderas positivas para estos virus, no es posible calcular los valores de sensibilidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cocientes de verosimilitud (LR+ y LR-).

^{1*} Estas muestras se caracterizaron utilizando las técnicas moleculares de referencia: AltoStar® HHV-6 PCR Kit 1.5 (Altona Diagnostics) para VHH-6, GeneProof Human Herpesvirus 6/7 (HHV-6/7) PCR Kit - (IVDR) (GeneProof) para VHH-7, y GeneProof Human Herpesvirus 8 (HHV-8) PCR Kit - (IVDR) (GeneProof) para VHH-8.

^{2*} Los resultados obtenidos previamente con la matriz de EDTA-plasma (4.A) se utilizaron como valores de referencia para evaluar la ocurrencia de resultados falsos positivos en la matriz de EDTA-sangre completa. Esto nos permitió estudiar los fenómenos de latencia en el VHH-7 y la integración genómica en el VHH-6, que afectan a la detección en la matriz de EDTA-sangre completa.

En conclusión, los resultados demuestran un alto nivel de concordancia en la detección de VHH-6, VHH-7 y VHH-8 utilizando VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit.

14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento

El Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento de VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit puede descargarse de la página web: certest.es/viasure/labeling. Este resumen también se encontrará en el sitio web de EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>).


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 1

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

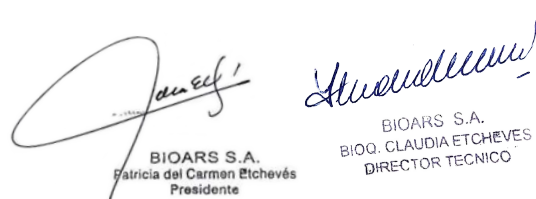
Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHV101L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHV101H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHV106L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHV106H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHV112L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHV112H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHV113L
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHV113H
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV101
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV136
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV172

Tabla A1.1. Referencias.

A1.1 Procedimiento

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹, así como un Control Interno (CI) para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “liofilizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.

Diana	Canal	Gen
Virus del herpes humano 6	FAM	Gen U65-U66
Virus del herpes humano 7	Cy5	Gen U57
Virus del herpes humano 8	ROX	Gen ORF73
Control Interno (CI)	HEX*	-

Tabla A1.2. Diana, canal y genes.

* Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>HHV 8-well strips (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	-	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV101L, VS-HHV101H, VS-HHV106L, VS-HHV106H, VS-HHV112L y VS-HHV112H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO 58

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>HHV 96-well plate (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV113L y VS-HHV113H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>HHV 4-well strips (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

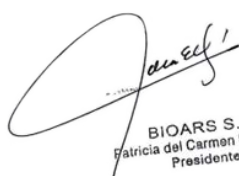
Tabla A1.5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV101, VS-HHV136 y VS-HHV172. Para usar con instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 mL (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

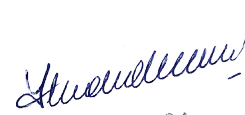
* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control Positivo liofilizado

El vial de *HHV Positive Control* contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *HHV Positive Control* liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μ L de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

No abra el vial de HHV Positive Control en el área pre-PCR.

Almacenar el Control Positivo a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o en una placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las tiras o de la placa que necesite para el ensayo.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de HHV Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial violeta) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o la placa de 96 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatibles con QIAGEN/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras o la placa en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador que se va a usar para conocer qué formato de tubo se debe utilizar.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1.6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHH-6), Cy5 (VHH-7), ROX (VHH-8) y HEX (Control Interno (CI)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHV196T

Tabla A2.1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹, así como un Control Interno (CI) para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus del herpes humano 6	FAM	Gen U65-U66
Virus del herpes humano 7	Cy5	Gen U57
Virus del herpes humano 8	ROX	Gen ORF73
Control Interno (CI)	HEX*	-

Tabla A2.2. Diana, canal y genes.

* Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "liofilizado" se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>HHV Reaction-Mix tube (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)</i>	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV196T.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control Positivo liofilizado

El vial de *HHV* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *HHV* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μ L de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

No abra el vial de *HHV* Positive Control en el área pre-PCR.

Almacenar el Control Positivo a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

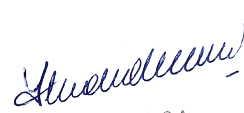
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular *HHV* Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción liofilizado (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 μ L de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez que el vial de mezcla de reacción ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C . Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ o $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas (ver la sección “Condiciones de transporte, almacenamiento y uso” para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

1) Añadir la mezcla de reacción rehidratada al número de pocillos necesarios.

Añadir 15 μL de HHV Reaction-Mix tube rehidratada (vial blanco) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μL de DNA extraído de cada muestra, de HHV Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial violeta) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados o sellar la placa. Se recomienda centrifugar brevemente.

Colocar las tiras, la placa o los tubos en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador que se va a usar para conocer qué formato de tubo se debe utilizar.

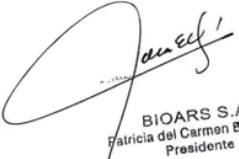
3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2.4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHH-6), Cy5 (VHH-7), ROX (VHH-8) y HEX (Control Interno (CI)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 3

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHV101LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHV101HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHV106LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHV106HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHV112LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHV112HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHV113LE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHV113HE
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV101E
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV136E
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHV172E

Tabla A3.1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que debe añadirse antes del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “liofilizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Diana	Canal	Gen
Virus del herpes humano 6	FAM	Gen U65-U66
Virus del herpes humano 7	Cy5	Gen U57
Virus del herpes humano 8	ROX	Gen ORF73
Control de Extracción (CE)	HEX*	-

Tabla A3.2. Diana, canal y genes.

* Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A3.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
1HHV 8-well strips (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
HHV Positive Control (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	-	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV101LE, VS-HHV101HE, VS-HHV106LE, VS-HHV106HE, VS-HHV112LE y VS-HHV112HE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
1HHV 96-well plate (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
HHV Positive Control (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2×10^4 copias/ μ L*	Verde	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV113LE y VS-HHV113HE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
1HHV 4-well strips (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
HHV Positive Control (<i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i>)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2×10^4 copias/ μ L*	Verde	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3.5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV101E, VS-HHV136E y VS-HHV172E. Para usar con instrumentos QIAGEN/Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 mL (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de Extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del Control Positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el HHV Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control Positivo liofilizado

El vial de HHV Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir HHV Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

No abra el vial de HHV Positive Control en el área pre-PCR.

Almacenar el Control Positivo a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A3.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

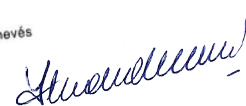
Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o en una placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las tiras o de la placa que necesite para el ensayo.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de HHV Positive Control reconstituido (vial rojo) en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Cerrar los pocillos con las tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o la placa de 96 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatibles con QIAGEN/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras o la placa en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador que se va a usar para conocer qué formato de tubo se debe utilizar.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3.6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHH-6), Cy5 (VHH-7), ROX (VHH-8) y HEX (Control de Extracción (CE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHV196TE

Tabla A4.1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que debe añadirse antes del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus del herpes humano 6	FAM	Gen U65-U66
Virus del herpes humano 7	Cy5	Gen U57
Virus del herpes humano 8	ROX	Gen ORF73
Control de Extracción (CE)	HEX*	-

Tabla A4.2. Diana, canal y genes.

* Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “liofilizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHES
DIRECTOR TÉCNICO

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
1HHV Reaction-Mix tube (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
HHV Positive Control (Human Herpes Virus 6, 7 & 8)	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojo	1 vial
Extracción Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2×10^4 copias/ μ L*	Verde	1 vial
Negative Control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHV196TE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de Extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del Control Positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 μ L del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el HHV Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control Positivo liofilizado

El vial de HHV Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir HHV Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μ L de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

No abra el vial de HHV Positive Control en el área pre-PCR.

Almacenar el Control Positivo a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular el 1HHV Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción liofilizado (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez que el vial de mezcla de reacción ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 4°C±2°C hasta 4 horas (ver la sección “Condiciones de transporte, almacenamiento y uso” para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un Control Positivo y un Control Negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

1) Añadir la mezcla de reacción rehidratada al número de pocillos necesarios.

Añadir 15 µL de 1HHV Reaction-Mix tube rehidratada (vial blanco) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de HHV Positive Control reconstituido (vial rojo) en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Cerrar los pocillos con las tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente.

Colocar las tiras, la placa o los tubos en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador que se va a usar para conocer qué formato de tubo se debe utilizar.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A4.4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHH-6), Cy5 (VHH-7), ROX (VHH-8) y HEX (Control de Extracción (CE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Bibliografía

- Auburn, H., Zuckerman, M., Broughton, S., Greenough, A., & Smith, M. (2011). Detection of nine respiratory RNA viruses using three multiplex RT-PCR assays incorporating a novel RNA internal control transcript. *Journal of virological methods*, 176(1-2), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.017>.
- Agut, H., Bonnafous, P., & Gautheret-Dejean, A. (2016). Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Microbiology spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015>.
- Cohen, J. I. (2020). Herpesvirus latency. *The Journal of clinical investigation*, 130(7), 3361–3369. <https://doi.org/10.1172/JCI136225>.
- Ginocchio, C. C., & McAdam, A. J. (2011). Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9 Suppl), S44–S48. <https://doi.org/10.1128/JCM.00698-11>.
- Logan, S. A., & MacMahon, E. (2008). Viral meningitis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 336(7634), 36–40. <https://doi.org/10.1136/bmj.39409.673657.AE>.
- McGill, F., Griffiths, M. J., Solomon, T. (2017). Viral meningitis: current issues in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(2):p 248-256. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000355>.
- Ogoina, D., Onyemelukwe, G., Musa, B. O., & Babadoko, A. (2011). Seroprevalence and determinants of human herpes virus 8 infection in adult Nigerians with and without HIV-1 infection. *African health sciences*, 11(2), 158–162.
- Pellett Madan, R., Hand, J., & AST Infectious Diseases Community of Practice (2019). Human herpesvirus 6, 7, and 8 in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical transplantation*, 33(9), e13518. <https://doi.org/10.1111/ctr.13518>.
- Richman, D. D., Whitley, R. J., & Hayden, F. G. (Eds.). (2016). *Clinical virology* (4th ed.). ASM Press.
- Tesini, B. L., Epstein, L. G., & Caserta, M. T. (2014). Clinical impact of primary infection with roseoloviruses. *Current opinion in virology*, 9, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.013>.
- Xu, H., Chen, P., Guo, S., Shen, X., & Lu, Y. (2023). Progress in etiological diagnosis of viral meningitis. *Frontiers in neurology*, 14, 1193834. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1193834>.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar en lugar seco		Fecha de caducidad		Fabricante		Número de lote
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura		Contiene <n> test		Identificación única de dispositivo		Número de referencia
	Marcado CE		Mantener fuera de la luz del sol		Control		Control Positivo		Control Negativo

Marcas registradas

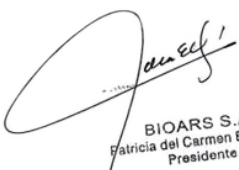
Derechos de modificación reservados. Todos los derechos reservados. © Certest Biotec, S.L.

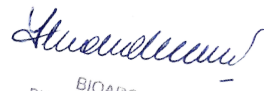
Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

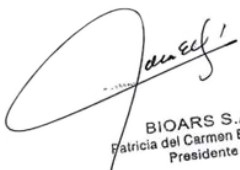
Control de Cambios		
Versión n°	Cambios	Fecha
00	Versión Original Esta versión es una traducción del documento en inglés: IUo-HHVen1225.00	05/12/2025

Tabla A5. Tabla de Control de Cambios.

Revisión: 5 de diciembre 2025.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

VIASURE

by **certest**



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO



 **Certest Biotec, S.L.**
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

 **(+34) 976 520 354**

 **viasure@certest.es**

 **www.certest.es**

certest

F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

VIASURE
by **certest**

Real Time PCR Detection Kit

Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus

Instrucciones de uso

CE IVD

2797

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ101L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ101H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ106L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ106H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ112L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ112H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHZ113L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHZ113H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ101
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ136
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ172

Tabla A 1. Referencias para productos Open format y Rotor-Gene format con control interno.

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHZ196T

Tabla A 2. Referencias para productos formato Tubo con control interno.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ101LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ101HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ106LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ106HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ112LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ112HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHZ113LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHZ113HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ101E
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ136E
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ172E

Tabla A 3. Referencias para productos Open format y Rotor-Gene format con control de extracción.

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHZ196TE

Tabla A 4. Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

EN For download IFUS from other languages, please enter in certest.es/viasure/labeling. Once you are there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

BG За да изтеглите IFUS на други езици, моля, отидете на certest.es/viasure/labeling. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout IFUS v jiných jazycích, přejděte na stránku certest.es/viasure/labeling. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.

DA Hvis du vil downloade IFUS på andre sprog, kan du gå til certest.es/viasure/labeling. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, kan du kontakte: viasure@certest.es.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

EL Για να κατεβάσετε το IFUS σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση **certest.es/viasure/labeling**. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

HU Az IFUS más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a **certest.es/viasure/labeling** weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

LT Norėdami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į **certest.es/viasure/labeling**. Ten atlikite nurodymus, kad pasiektumėte reikiamą kalbą. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu IFUS citās valodās, lūdzu, apmeklējiet **certest.es/viasure/labeling**. Pēc tam izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB For å laste ned IFUS fra andre språk, gå inn på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, kan du følge instruksjonene for å få tilgang til det språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du kontakte: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

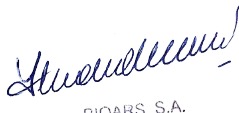
RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information, vänligen kontakta: viasure@certest.es.

SK Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Keď sa tam dostanete, postupujte podľa pokynov a získajte prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

FI Lataa suomeksi turvallinen käyttöopas osoitteesta **certest.es/viasure/labeling**. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



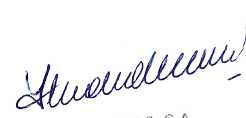
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Contenido

1.	Finalidad prevista.....	9
2.	Introducción y explicación.....	9
3.	Procedimiento.....	10
4.	Reactivos suministrados	11
5.	Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	11
6.	Condiciones de transporte, almacenamiento y uso	13
7.	Precauciones para el usuario	14
8.	Procedimiento del test.....	17
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	17
8.2.	Extracción de DNA	19
9.	Interpretación de resultados	20
9.1.	Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	20
9.2.	Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	22
10.	Limitaciones del test	24
11.	Control de calidad.....	26
12.	Características del funcionamiento analítico	27
12.1.	Linealidad analítica del ensayo.....	27
12.2.	Sensibilidad analítica.....	28
12.2.1.	Límite de Blanco (LoB).....	28
12.2.2.	Límite de Detección (LoD)	29
12.3.	Rango de medición	30
12.4.	Exactitud.....	30
12.4.1.	Veracidad (Sesgo)	30
12.4.2.	Precisión.....	32
12.4.3.	Exactitud.....	36
12.5.	Tasa de fallo de todo el Sistema	37
12.6.	Especificidad y reactividad analítica.....	38
12.6.1.	Especificidad analítica	38
12.6.2.	Reactividad analítica.....	48

12.7. Trazabilidad metrológica	50
13. Características del funcionamiento clínico	50
14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento	53
ANEXO 1	54
A1.1 Procedimiento	54
A1.2 Reactivos suministrados	55
A1.3 Procedimiento del test	56
A1.3.1 Control positivo liofilizado	56
A1.3.2 Protocolo PCR	56
ANEXO 2	58
A 2.1. Procedimiento	58
A 2.2. Reactivos suministrados	58
A 2.3. Procedimiento del test	59
A2.3.1 Control positivo liofilizado	59
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	59
A2.3.3 Protocolo PCR	60
ANEXO 3	61
A3.1 Procedimiento	61
A3.2 Reactivos suministrados	62
A3.3 Procedimiento del test	63
A3.3.1 Control de extracción liofilizado	63
A3.3.2 Control positivo liofilizado	63
A3.3.3 Protocolo PCR	64
A4.1 Procedimiento	66
A4.2 Reactivos suministrados	66
A4.3 Procedimiento del test	67
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	67
A4.3.2 Control positivo liofilizado	67
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	68
A4.3.4 Protocolo PCR	68


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Bibliografía.....	70
Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	71
Marcas registradas.....	71



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ESPAÑOL

1. Finalidad prevista

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit es un test de qPCR no automatizado diseñado para la detección cualitativa simultánea del DNA procedente de los virus del Herpes simple tipo 1, del Herpes simple tipo 2 y/o del virus Varicela Zóster, en muestras de líquido cefalorraquídeo, EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, hisopos de lesiones y muestras oculares, procedentes de individuos con signos y síntomas de infección por Herpes simple tipo 1, del Herpes simple tipo 2 y del virus Varicela Zóster.

Esta prueba está destinada a ser usada como ayuda en el diagnóstico de la infección por estos virus, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído de muestras clínicas, amplificado mediante PCR en tiempo real, y detectado mediante el uso de sondas marcadas con una molécula fluorescente específicas para Herpes simple tipo 1, del Herpes simple tipo 2 y/o del virus Varicela Zóster. El DNA es extraído de muestras clínicas y posteriormente amplificado mediante PCR en tiempo real, y detectado mediante el uso de sondas marcadas con una molécula fluorescente específicas para cada patógeno.

El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).

2. Introducción y explicación

Los Virus Herpes Simple humano (VHS) tipos 1 y 2 son dos de los virus humanos más prevalentes en el mundo, comúnmente asociados con enfermedades como herpes labial, herpes genital, queratitis estromal herpética, meningitis y encefalitis (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). VHS afecta primariamente a la piel y las membranas de las mucosas, causando infecciones persistentes que consisten en periodos de quiescencia (latencia) y de enfermedad recurrente (reactivación) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). La transmisión tanto de VHS-1 como de VHS-2 se produce a través del contacto oral, mientras que las infecciones por VHS-2 ocurren más tarde, normalmente mediante transmisión sexual, siendo las manifestaciones clínicas de estos virus muy variables: asintomáticas, leves o potencialmente mortales (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). En la mayoría de las personas inmunocompetentes, VHS causa una enfermedad leve que se resuelve sola (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Sin embargo, la infección por VHS también se asocia con una morbilidad y mortalidad alta en ciertos individuos, como pacientes inmunocomprometidos que sufren infección recurrente por VHS (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Se ha observado que la infección con un tipo de VHS normalmente induce inmunidad en cuanto a la reinfección con el mismo serotipo, pero no con el otro (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

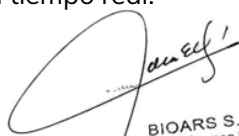
El virus Varicela Zóster (VVZ) es el agente responsable de producir dos condiciones clínicas distintas: varicela y herpes zóster (culebrilla) (Gershon et al., 2015; Gilden et al., 2010; Kennedy & Gershon, 2018). La varicela es altamente contagiosa y causa una infección aguda caracterizada por un sarpullido vesículo-pustular cutáneo (Gilden et al., 2010). Esta enfermedad se produce principalmente en niños, y se presenta como una erupción vesicular pruriginosa que comienza en el rostro, cuero cabelludo y tronco, para después extenderse al resto del cuerpo (Kennedy & Gershon, 2018). VVZ permanece en un estado latente en las neuronas sensoriales, pudiendo reactivarse posteriormente, causando la enfermedad del herpes zóster (Gershon et al., 2015; Gilden et al., 2010; Kennedy & Gershon, 2018). El herpes zóster es una enfermedad dolorosa que puede darse en adultos mayores que no están inmunizados, o que tienen una baja inmunidad para el VVZ, así como en pacientes con la inmunidad celular dañada (Gilden et al., 2010). Existe un espectro de enfermedades dentro del herpes zóster, que abarca desde dolor sin erupción a erupción moderada, hasta erupción severa con diseminación (Gershon et al., 2015; Kennedy & Gershon, 2018).

Las pruebas para la diferenciación entre VHS-1 y VHS-2 son siempre recomendables, porque afecta a la prognosis y asistencia derivada, y la CDC recomienda confirmar este diagnóstico clínico empleando virología y pruebas serológicas tipo-específicas (Cole, 2020). La detección del DNA de VHS-1 y VHS-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una buena aproximación a realizar por los laboratorios para el diagnóstico de infecciones genitales agudas por VHS (Cole, 2020). En cuanto al VVZ, el diagnóstico comienza por la evaluación de los signos y síntomas, seguido de la evaluación del fluido contenido en las vesículas, lesiones sin costra y/o sangre. La PCR es una técnica que ofrece el mayor rendimiento en comparación con otras técnicas comunes utilizadas para diagnosticar varicela/herpes zóster, como los cultivos virales, serología para la detección de IgM y IgG, inmunohistoquímica (IHQ), ELISA, etc. (Saleh & Kumar, 2025). Esta es la razón por la que las últimas se emplean en caso de que la PCR no sea viable.

3. Procedimiento

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit es un test de qPCR no automatizado diseñado para la detección simultánea cualitativa del DNA procedente de los virus Herpes simple tipo 1 (VHS-1), del Herpes simple tipo 2 (VHS-2) y/o del virus Varicela Zóster (VVZ) en líquido cefalorraquídeo (LCR), hisopos de lesión, muestras oculares y en muestras de EDTA-plasma y EDTA-sangre completa recogidas en tubos de EDTA-K2 (a partir de ahora nombradas como muestras de EDTA-plasma y de EDTA-sangre completa). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de las secuencias diana se realiza mediante la amplificación de una región conservada del gen *US4* (VHS-1), el gen *US6* (VHS-2) y del gen *ORF29* (VVZ), usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se basa en la actividad exonucleasa 5' de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevès
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
 DIRECTOR TÉCNICO

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en un formato estabilizado¹, así como un **control interno o de extracción** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

El control interno (CI) verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

El control de extracción (CE) controla la eficiencia del método de extracción y verifica la reacción PCR. Se suministra en un vial adicional y debe añadirse antes del proceso de extracción.

4. Reactivos suministrados

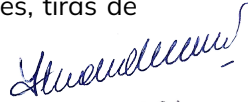
VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para productos "open format" y "rotor-gene format" con control interno, el Anexo 2 para productos formato de tubo con control interno, el Anexo 3 para productos "open format" y "rotor-gene format" con control de extracción, y el Anexo 4 para productos formato de tubo con control de extracción.

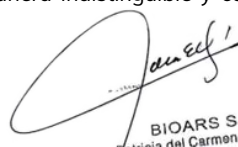
5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor-Gene® (Anexos 1 y 3).
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "lío-filizado" se utilizan de manera indistinguible y como sinónimos en todo el documento.


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

- Blanco de muestra (Ver sección 8.2 Extracción DNA).

VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se ha testado con diferentes flujos de trabajo, aunque se han seleccionado seis principales para llevar a cabo la evaluación y validación analítica y/o clínica del dispositivo. Estos kits de extracción/instrumentos son los que se han considerado como validados para el uso de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con las matrices indicadas:

	Matriz	Instrumentos
1	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Hisopos de lesión Muestras oculares LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
2	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Hisopos de lesión Muestras oculares LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
3	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Hisopos de lesión Muestras oculares LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
4	EDTA-plasma EDTA-sangre completa Hisopos de lesión Muestras oculares LCR	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
5	LCR ¹	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ²
6	LCR ¹	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)

Tabla 1. Matriz de la muestra-métodos de extracción-amplificación (flujo de trabajo) validados empleando VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. LCR = Líquido cefalorraquídeo.

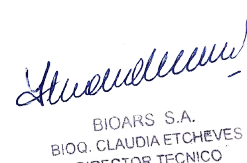
¹ La matriz líquido cefalorraquídeo fue validada también sin llevar a cabo previamente la extracción de ácidos nucleicos.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición en el equipo de DNA-Technology:

- DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX – 1000, canal ROX – 1000, canal Cy5 – 1000.

* Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje el valor de exposición indicado anteriormente hasta 150.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

² Ambos equipos, el CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) son equivalentes y tienen las mismas características operativas.

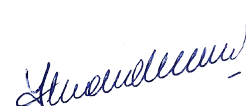
Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- Una vez que el control positivo ha sido resuspendido, debe guardarse a -20° C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado y establecido la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial de la mezcla de reacción ha sido reconstituido, pueden mantenerse a 25°C±5°C o 4°C±2°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos). Una vez abierto o rehidratado el tubo, debe guardarse para mantener el vial alejado de la luz.
- Para kits de formato abierto (tiras y placas): Para un uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar pocillos adicionales que no necesiten ser utilizados. Si no se utilizan todos los pocillos provistos en una tira de 8 pocillos o placa de 96 pocillos, la cantidad requerida de pocillos de reacción se puede cortar fácilmente de dichas tiras o placas. Si no se utilizan todos los pocillos, se recomienda que los no utilizados se almacenen en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro para evitar el contacto con la luz hasta su uso. La bolsa abierta con pocillos no rehidratados a 2-40°C es estable hasta la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Para tiras, placas y tubos: Una vez que los pocillos o el/los tubo(s) a emplear se hayan rehidratado, tanto la adición del ácido nucleico como la realización de la qPCR deben realizarse inmediatamente.
- Una vez el vial de Control de Extracción ha sido reconstituido, se recomienda emplearlo inmediatamente o almacenarlo a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- Una vez extraído el ácido nucleico de las matrices validadas, el eluido se puede almacenar hasta 24 horas a 4 °C o 25 °C, o hasta 6 meses a -20 °C antes de agregarlo al ensayo qPCR.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit	2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit	Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> well-strip o well plate (Ver Anexos 1 y 3)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Tubo de <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> reaction mix (Ver Anexos 2 y 4)		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Tubo rehidratado: 25°C±5°C o 4°C±2°C hasta 4 horas. Para un periodo más largo, almacenar directamente a -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Vial <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Positive Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.
Rehydration Buffer		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Negative Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Vial Water RNase/DNase free		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Temperatura ambiente.
Extraction Control		Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Uso inmediato a temperatura ambiente.

Tabla 2. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit y cada uno de sus componentes.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las instrucciones de uso.
- No usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.

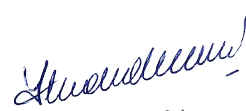

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio de los reactivos una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-HHZ113L, VS-HHZ113H, VS-HHZ136 y VS-HHZ172, VS-HHZ113LE, VS-HHZ113HE, VS-HHZ136E y VS-HHZ172E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- Una vez retirado el aluminio protector de las tiras o placa o abiertos los tubos, el usuario final deberá utilizar las tiras, placa o el tubo en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para las referencias VS-HHZ101, VS-HHZ136, VS-HHZ172, VS-HHZ101E, VS-HHZ136E y VS-HHZ172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación cruzada.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Una vez abierto el sobre del control positivo, del control de extracción, o el/los de la mezcla de reacción en formato tubo, rehidratar los viales inmediatamente, utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos correctamente. No se recomienda dejar el vial abierto sin resuspender, ya que esto puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- Una vez retirado el sello protector de aluminio de las tiras o placa, utilícelas inmediatamente para el ensayo qPCR (rehidrate los pocillos, agregue las muestras y coloque las tiras o placa en el termociclador). No se recomienda dejar las tiras o placa abiertas sin resuspender. Asimismo, una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe añadir el ácido nucleico en cada pocillo y llevarse a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. Se puede solicitar a Certest Biotec una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Asegúrese de que la configuración y las condiciones de los ajustes en el termociclador se realizan siguiendo las instrucciones de la sección "Protocolo PCR" en los Anexos 1, 2, 3 y 4 (protocolo DNA/RNA, número de ciclos, temperaturas, etc.). Del mismo modo, revisar las características técnicas del termociclador a usar para conocer el formato del tubo a utilizar.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede solicitar a Certest Biotec en caso de necesidad.



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para productos “open format” y “rotor-gene format” con control interno, el Anexo 2 para productos formato tubo con control interno, el Anexo 3 para productos “open format” y “rotor-gene format” con control de extracción, y el Anexo 4 para productos formato tubo con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue testado empleando muestras de EDTA-plasma y de EDTA-sangre completa recogidas en tubos de EDTA-K2, así como con muestras de LCR, muestras de hisopos de lesiones recogidos con hisopos flexibles recubiertos de nylon en medio de transporte y conservación aprobado, como por ejemplo los sistemas de recogida y transporte UTM® Universal Transport Medium™ (Copan), y muestras oculares recogidas con hisopos en UTM (Copan) o en recipientes estériles, dependiendo de la muestra. Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger lo antes posible, durante la fase aguda de la enfermedad o en cualquier momento durante el curso clínico, y antes de comenzar el tratamiento, si es posible. Particularmente para la detección de VHS-1, VHS-2 y/o VVZ en plasma, la sangre completa debe recogerse en tubos EDTA para prevenir la degradación del ácido nucleico, ya que el EDTA actúa como un anticoagulante y protege la integridad del DNA/RNA. Las muestras deberían obtenerse evitando secreciones biológicas que no sean de interés, y recogerse posteriormente en contenedores limpios y estériles, con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra). Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre y el número de identificación de la persona de la que proceden, el origen de la muestra, la fecha y la hora en la que fue tomada. Tras la recogida, las muestras deben guardarse en una bolsa de bioseguridad, transportarse y procesarse con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes enviados para pruebas moleculares deben conservarse en condiciones controladas para que los ácidos nucleicos no se degraden durante el almacenamiento. Se recomienda el uso de muestras frescas para el ensayo, por lo que el plasma debería separarse de la sangre completa en las 6 primeras horas para minimizar la degradación celular y la liberación de ácidos nucleicos celulares que puedan interferir en el ensayo, mientras que las muestras de EDTA-sangre completa deberían procesarse rápidamente si se necesita para separar el EDTA-plasma o los leucocitos. Tanto para el transporte (si fuera necesario) como para el almacenaje de las muestras clínicas hasta su procesamiento, se debería considerar la temperatura a la que tienen que conservarse, y la duración, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patogénico. En el caso de las muestras de EDTA-plasma, los especímenes pueden estar a 4°C hasta 72 horas, mientras que las muestras de EDTA-sangre completa pueden



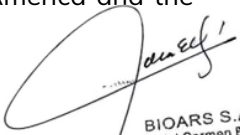
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

permanecer a 4°C hasta 24 horas³, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. En el caso de que el tiempo hasta producirse el procesamiento de las muestras (teniendo en cuenta tanto el transporte y/o el almacenamiento) exceda 72 horas para las muestras de EDTA-plasma, éstas deberían congelarse a -20 °C para su conservación (hasta dos semanas), o a -70°C (más de un año) para asegurar la estabilidad del ácido nucleico sin una degradación significativa³. Sin embargo, las muestras de EDTA-sangre completa congeladas sin haberse procesado previamente puede comprometer la calidad del material genético³. En cuanto a las muestras de LCR, se debe considerar su recogida en tubos sin aditivos para preservar el DNA viral. El DNA viral en LCR puede permanecer estable hasta 24 horas a 4°C, pero se recomienda congelarlo a -20°C para conservar las muestras hasta una semana, y a -70°C para una conservación a largo plazo (más de un año)⁴. En cuanto a las muestras de hisopos de lesión, se recomienda su recogida en hisopos estériles de dacrón o de nailon con mangos de plástico en Medio de Transporte Universal (UTM) aprobado, como el UTM® Universal Transport Medium™ (Copan). Estas muestras permanecen estables a 4°C hasta 48 horas, pero si se requiere de un almacenado más prolongado, deberían congelarse a -20°C hasta 1 semana, o a -70°C para periodos que excedan los 6 meses⁵. Finalmente, las muestras oculares de líquido lagrimal y raspados conjuntivales deben recogerse con hisopos en UTM⁵, mientras que las muestras de fluido intraocular (acuosas o vítreas) deben almacenarse en tubos estériles sin aditivos⁶. Las condiciones de almacenamiento pueden ser a 4°C hasta 24 horas, a -20°C hasta 1 semana, y a -70°C para una conservación a largo plazo (mayor de 6 meses), lo que minimiza la degradación y garantiza la integridad del ácido nucleico⁵. Debe tenerse en cuenta que las muestras oculares deberían protegerse de la exposición lumínica directa, ya que puede degradar los ácidos nucleicos. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recogerse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio. Como ejemplos, puede consultar las referencias Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J., & Orta Mira, N. (2019). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>; o Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., Theel, E. S., Thomson, R. B., Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the



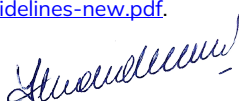
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente

³ CLSI. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods, 2nd ed. CLSI guideline MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

⁴ Teunissen, C. E., Petzold, A., Bennett, J. L., Berven, F. S., Brundin, L., Comabella, M., Franciotta, D., Federiksen, J. L., Fleming, J. O., Furlan, R., Hintzen, R. Q., Hughes, S. G., Johnson, M. H., Krasulova, E., Kuhle, J., Magnone, M. C., Rajda, C., Rejdak, K., Schmidt, H. K., ... Giovannoni, G. (2009). A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73, 1914–1922. <https://doi.org/10.1177/1352458509356368>.

⁵ <https://www.copanusa.com/products/sample-collection-transport-kits/utm-universal-transport-medium/>

⁶ Johns Hopkins Medicine Pathology. (2024). *Johns Hopkins Medical Microbiology Specimen Collection Guidelines – Updated 11 / 2024* (pp. 1–34). <https://pathology.jhu.edu/build/assets/department/files/Specimen-Collection-Guidelines-new.pdf>.



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHES
DIRECTOR TÉCNICO

American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1–e94. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>.

Nota: las condiciones de recolección, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras EDTA-plasma y EDTA-sangre completa, así como para LCR, hisopos de lesión y muestras oculares destinadas a ser utilizadas para la detección de ácidos nucleicos, que aparecen en la bibliografía referenciada, la guía SEIMC, y en la guía autorizada de la IDSA. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o el manual de políticas del laboratorio para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

8.2. Extracción de DNA

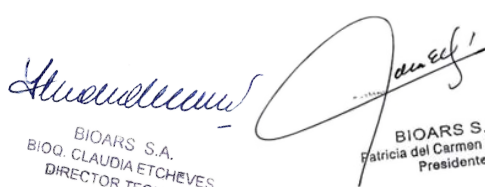
Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Debido a que VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit está también disponible con Control de Extracción (las referencias se incluyen en los Anexos 3 y 4), si el Control de Extracción (CE) se usa para monitorear el aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µL del CE reconstituido por muestra. Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µL del CE reconstituido por pocillo/reacción.

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue validado con muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR, hisopos de lesión y/o matrices oculares, extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y analizadas con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) o Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Además, VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue validado con LCR sin previa extracción de ácidos nucleicos, y analizado con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Tener en cuenta: el control positivo y el control negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la muestra clínica. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para las dianas de interés.

En caso de emplear un flujo de trabajo distinto a los arriba mencionados, la validación de este nuevo flujo de trabajo debe ser realizada por parte del usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso del control positivo y el control negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal para VHS-1, VHS-2 y VVZ en el pocillo del control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

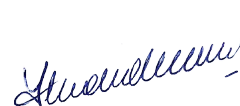
Controles	VHS-1 (FAM) ¹	VHS-2 (ROX) ¹	VVZ (Cy5) ¹	Control Interno (HEX) ¹	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	20-30	20-30	20-30	20-30	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	20-30	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo del control positivo para los canales diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct 20-30) en los pocillos del CP y CN.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados del control positivo y control negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione en el termociclador solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

VHS-1 (FAM)	VHS-2 (ROX)	VVZ (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1, VHS-2, y VVZ Detectado
≤40	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 Detectado, DNA VHS-2 y VVZ no Detectado
>40 o sin señal	≤40	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-2 Detectado, DNA VHS-1 y VVZ no Detectado
>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VVZ Detectado, DNA VHS-1 y VHS-2 no Detectado
≤40	≤40	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 y VHS-2 Detectado, DNA VVZ no Detectado
≤40	>40 o sin señal	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 y VVZ Detectado, DNA VHS-2 no Detectado
>40 o sin señal	≤40	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-2 y VVZ Detectado, DNA VHS-1 no Detectado
>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	DNA de las dianas no detectado ²
>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido – Repita el test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct sin señal = sin curva de amplificación.

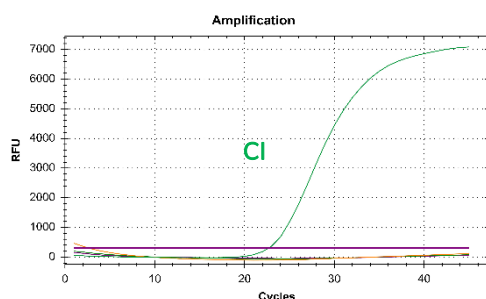
1 El Control Interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤35). En ocasiones, la detección del control interno no ocurre ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción se considera 'Inválida' y se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

2 En el caso de que los genes diana del VHS-1, VHS-2 y VVZ resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del Control Interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

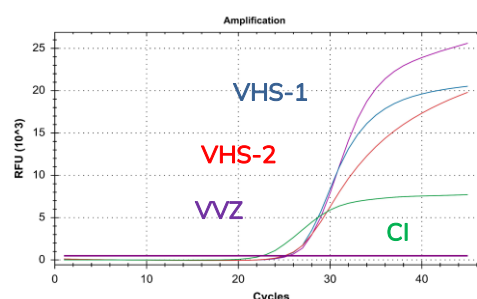
En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



Control Negativo



Control Positivo

9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para VHS-1, VHS-2 y VVZ en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Controles	VHS-1 (FAM) ¹	VHS-2 (ROX) ¹	VVZ (Cy5) ²	Control de Extracción (HEX) ¹	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	20-30	20-30	20-30	20-35	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	20-35	Válido

Tabla 5. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Ct 20-35) en los pocillos del CP y CN. Se debe añadir 1µL de CE al CP y CN antes de comenzar la qPCR (ver sección "Protocolo PCR" de los Anexos 3 y 4).

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

VHS-1 (FAM)	VHS-2 (ROX)	VVZ (Cy5)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	≤40	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1, VHS-2, y VVZ Detectado
≤40	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 Detectado, DNA VHS-2 y VVZ no Detectado
>40 o sin señal	≤40	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-2 Detectado, DNA VHS-1 y VVZ no Detectado
>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VVZ Detectado, DNA VHS-1 y VHS-2 no Detectado
≤40	≤40	>40 o sin señal	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 y VHS-2 Detectado, DNA VVZ no Detectado
≤40	>40 o sin señal	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-1 y VVZ Detectado, DNA VHS-2 no Detectado
>40 o sin señal	≤40	≤40	≤35 ¹	Válido	DNA VHS-2 y VVZ Detectado, DNA VHS-1 no Detectado
>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	DNA de las dianas no detectado ²
>40 o sin señal	>40 o sin señal	>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido – Repita el test ²

Tabla 6. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores sin señal = sin curva de amplificación.

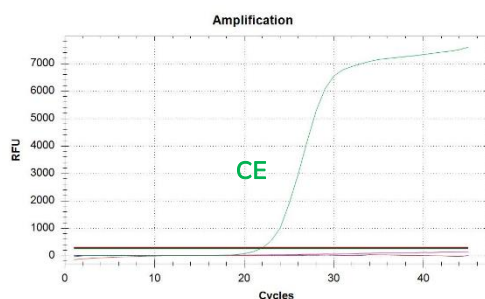
1 El Control de Extracción (CE) debe mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 35$). En ocasiones, la detección del control de extracción no ocurre ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción se considera 'Inválida' y se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología. Se pueden observar diferencias en los valores de C_t de los controles de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

2 En el caso de que los genes diana de VHS-1, VHS-2 y VVZ resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con $C_t \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $C_t > 35$ del Control de Extracción, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición, siguiendo las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

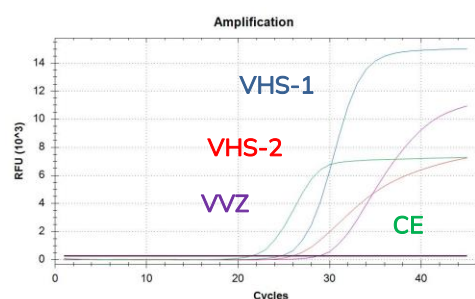
En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



Control Negativo



Control Positivo

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras EDTA-plasma y de muestras EDTA-sangre completa recogidas en tubos de EDTA-K2, así como de LCR, hisopos de lesión y de muestras oculares.
- Pueden producirse interferencias por coinfección. El VVZ a una concentración superior a $4,60 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/μL puede interferir con la detección de VHS-1 y VHS-2 a bajas concentraciones (cercasas al LoD), pero niveles elevados de VHS-1 y VHS-2 disminuyen este riesgo.

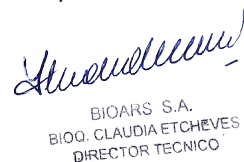
- Aunque este ensayo se podría utilizar con diferentes métodos de extracción/amplificación, sólo ha sido validado con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology) y Rotor-Gene® Q (QIAGEN). Además, la matriz LCR sin previa extracción de ácidos nucleicos se ha validado con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y con QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- En el caso de que se utilicen los equipos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®, solo debe utilizarse un producto VIASURE por análisis, para evitar así posibles fenómenos “crosstalk” entre canales. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que los valores de las muestras por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por VHS-1, VHS-2, y/o VVZ, ya sea a causa del *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control, muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o contaminación debido a productos de PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos se debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.

- Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de VHS-1, VHS-2, y/o VVZ.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones o durante el tratamiento de las mismas.
 - El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.6.1 de estas Instrucciones de Uso (Interferencias e inhibidores de PCR). Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción qPCR. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que dichos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana.
 - Resultados negativos no excluyen padecer infección por VHS-1, VHS-2, y/o VVZ, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por VHS-1, VHS-2, y/o VVZ. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los virus.
 - Si las pruebas de diagnóstico para otras Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) y/o enfermedades neurológicas y/o patologías cutáneas son negativas, y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por el/los virus VHS-1, VHS-2, y/o VVZ, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
 - Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
 - El Control Positivo y el Control Negativo no deben extraerse, pero se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y qPCR para descartar posibles contaminaciones. Podrían quedarse sin detectar resultados falsos positivos probables si se omite el blanco de muestra.

11. Control de calidad

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene un control positivo y un control negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

los resultados. Además, el Control Interno (CI) o el Control de Extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del funcionamiento analítico

12.1. Linealidad analítica del ensayo

La linealidad del ensayo se estableció y confirmó analizando tanto la variante del producto con control interno como con control de extracción con diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (entre 10^7 y 10 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a VHS-1, VHS-2, o VVZ, utilizando el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A continuación, se incluye un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo llevado a cabo en los termocicladores Bio-Rad:

Figura 3. Diluciones seriadas de un DNA molde de VHS-1 (10^7 -10 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

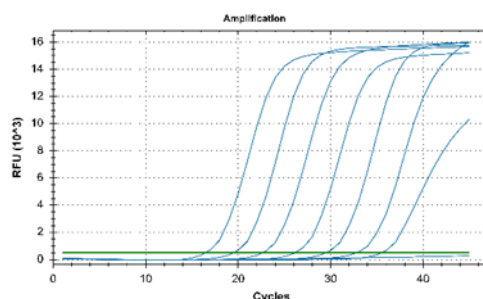


Figura 4. Diluciones seriadas de un DNA molde de VHS-2 (10^7 -10 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

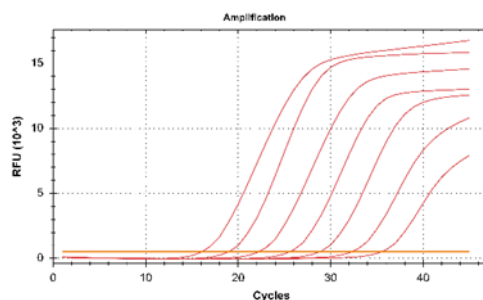
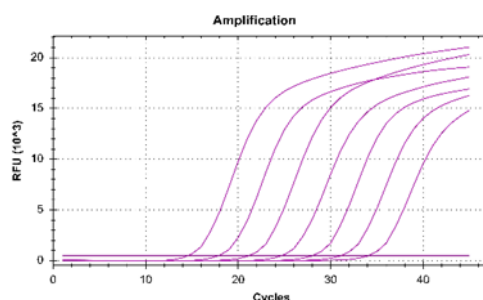


Figura 5. Diluciones seriadas de un DNA molde de VVZ (10^7 -10 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal Cy5).



[Signature]
BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente

[Signature]
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

La linealidad del ensayo también se determinó con la variante del producto con control interno utilizando los equipos Rotor-Gene® Q (Qiagen), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 y 10 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a VHS-1, VHS-2, o VVZ. Los resultados permitieron confirmar que la linealidad, la regresión lineal, la eficiencia y el nivel de detección observado para todas las dianas detectadas con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit, y utilizando los cuatro termocicladores mencionados, cumplen con los criterios de aceptación.

12.2. Sensibilidad analítica

La Sensibilidad Analítica normalmente suele hacer referencia al límite de detección (LoD). En la práctica, los parámetros de LoD y el límite de blanco (LoB) se establecen como parte de la evaluación de la sensibilidad analítica.

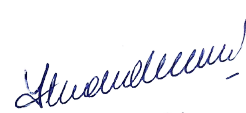
12.2.1. Límite de Blanco (LoB)

Para la determinación del “límite de blanco” (LoB), se llevó a cabo un ensayo de control sin muestra. Para ello, se reconstituyeron placas de 96 pocillos con buffer de rehidratación, y posteriormente, se añadieron 5 µL a cada pocillo de agua libre de RNAsa/DNAsa o ácido nucleico negativo para el DNA de VHS-1, VHS-2 y VVZ. Este ácido nucleico se obtuvo de matrices negativas (EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, hisopos de lesión, muestras oculares, LCR o LCR sin haber sido sometido a una extracción previa de los ácidos nucleicos).

En primer lugar, el ensayo de control sin muestra se realizó con agua libre de RNAsa/DNAsa como espécimen, la cual se añadió a los pocillos correspondientes de las placas de 96 pocillos. Utilizando la variante del producto con control interno, las muestras se analizaron con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), mientras que, empleando la variante del producto con control de extracción, las muestras se testaron con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Del mismo modo, los ácidos nucleicos procedentes de muestras negativas de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, hisopos de lesión, muestras oculares y LCR, extraídos con el kit MagDEA Dx SV Kit empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), se añadieron a los pocillos de la qPCR, la cual se realizó, empleando la variante del producto con control interno, con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology), y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). El LCR no sometido a una extracción previa de los ácidos nucleicos también se evaluó con los termocicladores CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), con el objeto de estudiar el impacto de la ausencia de este paso en los resultados del LoB.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

No se observaron amplificaciones inespecíficas en ninguno de los termocicladores utilizados. Por tanto, el producto cumple con las premisas inicialmente establecidas.

12.2.2. Límite de Detección (LoD)

El Límite de detección (LoD) de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue analizado utilizando matriz verificada como negativa de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR, hisopos de lesión y matriz ocular, contaminada con las siguientes cepas de referencia.

- Human Herpesvirus 1, Strain MacIntyre (ATCC ref: VR-539).
- Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Strain MS (Zeptomatrix ref: 0810006CF).
- Human Herpesvirus 3, Strain Ellen (ATCC ref: VR-1367).

Las muestras se extrajeron y analizaron con los siguientes flujos de trabajo:

	Extracción	Amplificación
1	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/ CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
3	MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)	DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)
4	—*	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
5	—*	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)

Tabla 7. Métodos de extracción y amplificación (flujos de trabajo) validados utilizando VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit.

*NOTA: Estos flujos de trabajo se realizaron únicamente con LCR para comparar los resultados con aquellos obtenidos con el procedimiento de referencia (extracción + amplificación PCR).

VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit mostró tener un límite de detección indicado en la siguiente tabla, con una tasa de positividad del $\geq 95\%$. En el caso de la matriz LCR, puesto que es la más restrictiva, se procedió al estudio del LoD siguiendo el flujo de trabajo 1 y 4 y utilizando tanto LCR sintético como real, para verificar que ambos eran equivalentes. Se obtuvieron valores similares de LoD, lo que permitió utilizar LCR sintético para testar el resto de los flujos de trabajo.

El LoD final del producto para cada diana y matriz validada se corresponderá con el valor LoD más restrictivo de todos los obtenidos, ya que todos cumplieron con el criterio de aceptación de encontrarse en un rango 1-3xLoD.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

	LoD					
	EDTA-plasma	LCR	LCR SE	EDTA-sangre completa	Matriz ocular	Hisopos de lesión
VHS-1	0,008 TCID50/μL	0,016 TCID50/μL	0,064 TCID50/μL	0,032 TCID50/μL	0,002 TCID50/μL	0,002 TCID50/μL
VHS-2	0,001 TCID50/μL	0,001 TCID50/μL	0,006 TCID50/μL	0,001 TCID50/μL	$2,5 \times 10^{-4}$ TCID50/μL	$2,5 \times 10^{-4}$ TCID50/μL
VVZ	5×10^{-6} TCID50/μL	10^{-5} TCID50/μL	4×10^{-5} TCID50/μL	5×10^{-6} TCID50/μL	5×10^{-6} TCID50/μL	5×10^{-6} TCID50/μL

Tabla 8. Resultados LoD obtenidos con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit, utilizando los flujos validados con EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR, hisopos de lesión y matriz ocular, contaminadas con material de referencia para VHS-1, VHS-2 y VVZ. TCID50 = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés). LCR = Líquido cefalorraquídeo, SE = sin proceso de extracción de ácidos nucleicos.

En conclusión, los valores finales de LoD por diana y matriz validada cumplen con los criterios de aceptación inicialmente establecidos.

12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico y sintético perteneciente a VHS-1, VHS-2, y VVZ, y matizado con los experimentos de LoD. Tras utilizar el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), los resultados permitieron confirmar la correcta detección de las dianas en el rango de medición indicado en la siguiente tabla.

	Rango de medición (copias/rxn)	
Virus Herpes simple 1	10^7	1,29
(Ct)	12,26	37,13
Virus Herpes simple 2	10^7	2,44
(Ct)	15,17	37,87
Virus Varicela Zóster	10^7	13,1
(Ct)	15,55	36,28

Tabla 9. Rango de medición de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit.

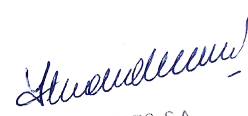
Como conclusión, el rango de medición de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue determinado satisfactoriamente según los criterios de aceptación para la validación inicialmente establecidos, asegurando la fiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados en un amplio espectro de cargas virales, y afirmando su utilidad en varios escenarios de diagnóstico clínico.

12.4. Exactitud

12.4.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue evaluada testando el material de referencia listado a continuación. Las cepas de referencia se añadieron en matriz EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y en LCR no sujeto al proceso de extracción de ácidos nucleicos. Después, las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Science Co.), y analizadas con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). En el caso de DNA/RNA de referencia y/o cepas de referencia añadidas a la matriz LCR, se analizaron directamente con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todas las muestras se detectaron correctamente, cumpliendo así con los criterios de aceptación inicialmente establecidos.

1. Fragmentos de DNA sintético:

- Nombre del fragmento de DNA sintético para Virus Herpes simple 1 (gen *US4*): HSVXPC, canal FAM.
- Nombre del fragmento de DNA sintético para Virus Herpes simple 2 (gen *US6*): HSVXPC, canal ROX.
- Nombre del fragmento de DNA sintético para Virus Varicela Zóster (gen *ORF29*): VZVXPC, canal Cy5.

2. La Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC®"):

Referencia Externa	Microorganismo	Variedad
VR-733	Herpesvirus 1 humano	Cepa F
VR-3393	Herpesvirus 2 humano	Cepa G
VR-1779	Herpesvirus 2 humano	Cepa ATCC-2011-2
VR-1433	Herpesvirus 3 humano	Cepa AV92-3:L
VR-1367	Herpesvirus 3 humano	Cepa Ellen
VR-1832	Herpesvirus 3 humano	Cepa Oka

Tabla 10. Cepas de referencia de Virus Herpes simple 1 y 2, y Virus Varicela Zóster procedentes de la ATCC.

3. The International Reagent Resource (IRR™):

Referencia Externa	Microorganismo	Variedad
FR-311	Herpesvirus 1 humano	Cepa MacIntyre

Tabla 11. Cepa de referencia de Virus Herpes simple 1 procedentes de IRR.

4. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC):

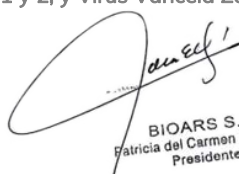
Referencia Externa	Microorganismo	Variedad
17/122	Virus Herpes simple tipo-2 (HSV-2)	-
16/368	Virus Herpes simple tipo-1 (HSV-1)	-
19/164	Virus Varicela Zóster (VZV)	-

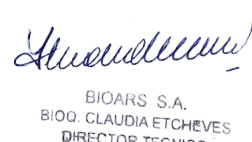
Tabla 12. Cepas de referencia de Virus Herpes simple 1 y 2, y Virus Varicela Zóster procedentes del NIBSC.

5. Controles:

Referencia Externa	Procedencia	Microorganismo	Nombre Producto	Variedad
NATVZV-STQ	ZeptoMetrix	Virus Varicela Zóster	NATrol™ Varicella-Zoster Virus	-
0810006CF	ZeptoMetrix	Virus Herpes simple tipo-2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) (Strain:MS) Culture Fluid	Cepa MS
NATMEP-BIO	ZeptoMetrix	Virus Herpes simple tipo-1 Virus Herpes simple tipo-2 Virus Varicela Zóster	NATrol™ Meningitis/Encephalitis Panel	-
VZ VDNA17S-01	QCMD	Virus Varicela Zóster	-	Cepa OKA

Tabla 13. Material de referencia de Virus Herpes simple 1 y 2, y Virus Varicela Zóster procedente de ZeptoMetrix Corporation y de un panel EQA QCMD.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

6. Material de referencia procedentes de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAs)

Se analizaron un total de 72 muestras que contenían Virus Herpes simple 1, Virus Herpes simple 2, y Virus Varicela Zóster, entre otros virus que no eran objetivo, procedentes de los programas QCMD y NEQAS, mostrando una concordancia del 100%.

12.4.2. Precisión

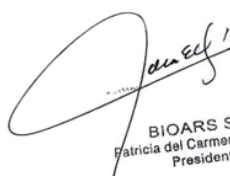
Para determinar la precisión de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit, se realizaron ensayos intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo, inter-lote, e inter-termociclador (reproducibilidad). El panel de muestras se contaminó en matriz EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y en LCR no sujeto al proceso de extracción de ácidos nucleicos. Después, las muestras de EDTA-plasma fueron extraídas con MagDEA Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestras se analizaron directamente con el termociclador indicado en cada subsección.

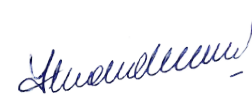
Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando diez réplicas de todas las muestras en la misma carrera, utilizando el kit VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit y el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los ensayos mostraron amplificación para el Control Interno (CI) con un valor Ct ≤ 35 , incluyendo el CI de la muestra negativa y el Control Negativo. Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,60	0,23	0,73
	VHS-2	ROX	34,82	0,49	1,40
	VVZ	Cy5	33,60	0,38	1,12
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,63	0,37	1,14
	VHS-2	ROX	35,91	0,72	2,01
	VVZ	Cy5	34,64	0,49	1,42
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,78	0,33	1,51
Control Positivo	VHS-1	FAM	24,59	0,08	0,31
	VHS-2	ROX	24,22	0,19	0,79
	VVZ	Cy5	21,92	0,10	0,45
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,82	0,30	1,35

Tabla 14. Resultados intra-ensayo de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,63	0,66	2,09
	VHS-2	ROX	34,34	0,74	2,15
	VVZ	Cy5	32,74	0,35	1,08
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,58	0,65	2,00
	VHS-2	ROX	35,89	0,68	1,91
	VVZ	Cy5	34,01	0,57	1,66
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,44	0,18	0,86
Control Positivo	VHS-1	FAM	18,36	0,31	1,66
	VHS-2	ROX	21,78	0,24	1,10
	VVZ	Cy5	22,03	0,12	0,55
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,44	0,18	0,86

Tabla 15. Resultados intra-ensayo de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.

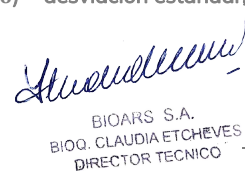
Inter-ensayo

El inter-ensayo se probó analizando las diferentes muestras en tres días diferentes por tres técnicos distintos con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit y el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los ensayos mostraron amplificación para el Control Interno (CI) con un valor Ct ≤ 35 , incluyendo el CI de la muestra negativa y el Control Negativo. En las siguientes tablas se muestran un resumen de los resultados.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,58	0,28	0,89
	VHS-2	ROX	35,17	0,53	1,51
	VVZ	Cy5	33,49	0,35	1,06
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,56	0,31	0,96
	VHS-2	ROX	36,10	0,66	1,82
	VVZ	Cy5	34,57	0,49	1,42
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,87	0,18	0,82
Control Positivo	VHS-1	FAM	24,27	0,48	1,98
	VHS-2	ROX	23,87	0,69	2,90
	VVZ	Cy5	22,07	1,10	4,98
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,80	0,12	0,55

Tabla 16. Resultados inter-ensayo de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,37	0,68	2,18
	VHS-2	ROX	33,77	0,58	1,72
	VVZ	Cy5	32,08	0,48	1,48
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,64	0,80	2,44
	VHS-2	ROX	35,41	0,87	2,45
	VVZ	Cy5	33,41	0,57	1,70
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,79	0,01	0,06
Control Positivo	VHS-1	FAM	18,38	0,32	1,73
	VHS-2	ROX	21,47	0,14	0,63
	VVZ	Cy5	21,81	0,24	1,12
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,68	0,04	0,20

Tabla 17. Resultados inter-ensayo de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.

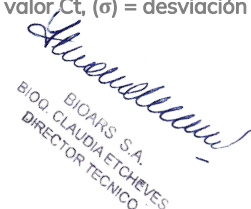
Inter-lote

Los valores inter-lote se determinaron analizando tres réplicas de diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit en la misma carrera, utilizando el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los ensayos mostraron amplificación para el Control Interno (CI) con un valor Ct ≤ 35 , incluyendo el CI de la muestra negativa y el Control Negativo. Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,39	0,29	0,92
	VHS-2	ROX	35,08	0,54	1,55
	VVZ	Cy5	33,69	0,32	0,95
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,77	0,32	0,96
	VHS-2	ROX	35,92	0,40	1,11
	VVZ	Cy5	34,75	0,55	1,58
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,34	0,19	0,90
Control Positivo	VHS-1	FAM	24,52	0,22	0,88
	VHS-2	ROX	24,15	0,04	0,15
	VVZ	Cy5	22,03	0,09	0,39
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,66	0,46	2,10

Tabla 18. Resultados inter-lote de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
Claudia Etchevés
DIRECTOR TÉCNICO

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	32,14	0,67	2,09
	VHS-2	ROX	34,21	0,39	1,13
	VVZ	Cy5	32,48	0,32	0,99
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	33,28	1,21	3,64
	VHS-2	ROX	35,45	0,67	1,88
	VVZ	Cy5	33,77	0,35	1,02
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	22,42	0,41	1,83
Control Positivo	VHS-1	FAM	19,51	0,62	3,18
	VHS-2	ROX	21,73	0,10	0,44
	VVZ	Cy5	22,02	0,12	0,55
Control Negativo	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,46	0,35	1,61

Tabla 19. Resultados inter-lote de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-termociclador

Los valores inter-termociclador fueron determinados con tres réplicas de las mismas muestras utilizadas para el intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. El DNA extraído de las muestras, y los controles positivo y negativo fueron analizados juntos en la misma carrera. Cuando se utilizó matriz EDTA-plasma, las muestras se analizaron utilizando los equipos CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y DTPPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). En el caso de la matriz LCR, las muestras se analizaron con el CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los ensayos mostraron amplificación para el Control Interno (CI) con un valor Ct ≤ 35 , incluyendo el CI de la muestra negativa y el Control Negativo. Los resultados se describen en las siguientes tablas.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,81	0,49	1,55
	VHS-2	ROX	34,50	0,40	1,15
	VVZ	Cy5	33,68	0,39	1,15
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,88	0,83	2,52
	VHS-2	ROX	35,86	0,50	1,40
	VVZ	Cy5	35,07	0,50	1,43
Muestra negativa	VHS-1 VHS-2 VVZ	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	Control Interno	HEX	21,45	0,42	1,96
Control Positivo	VHS-1	FAM	24,94	0,50	2,01
	VHS-2	ROX	23,89	0,30	1,27

	VVZ	Cy5	21,93	0,26	1,18
Control Negativo	VHS-1	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	VHS-2				
	VVZ				
	Control Interno	HEX	21,44	0,46	2,14

Tabla 20. Resultados inter-termociclador de VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de EDTA-plasma. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Muestra	Diana	Canal Viasure	$\bar{x}$ (Ct)	σ	CV %
Positiva 1 (6xLoD)	VHS-1	FAM	31,74	1,54	4,84
	VHS-2	ROX	33,87	0,40	1,17
	VVZ	Cy5	30,75	1,41	4,58
Positiva 2 (3xLoD)	VHS-1	FAM	32,58	1,57	4,82
	VHS-2	ROX	35,44	1,43	4,04
	VVZ	Cy5	32,35	1,57	4,84
Muestra negativa	VHS-1	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	VHS-2				
	VVZ				
	Control Interno	HEX	20,62	0,58	2,81
Control Positivo	VHS-1	FAM	17,36	0,61	3,49
	VHS-2	ROX	21,38	0,59	2,75
	VVZ	Cy5	21,06	0,55	2,59
Control Negativo	VHS-1	FAM/ROX/Cy5	Neg	n.a.	n.a.
	VHS-2				
	VVZ				
	Control Interno	HEX	20,67	0,48	2,33

Tabla 21. Resultados inter-termociclador de VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit utilizando muestras negativas de LCR. (Ct) = Ciclo umbral, ($\bar{x}$) = media aritmética del valor Ct, (σ) = desviación estándar, (CV) = coeficiente de variación. Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Como conclusión, el estudio de precisión confirmó el funcionamiento fiable del ensayo VIASURE, sugiriendo que las capacidades de detección del dispositivo son robustas y no se ven significativamente influenciadas por el tipo de muestra y/o flujo de trabajo, siempre que los criterios de precisión se cumplan.

12.4.3. Exactitud

El experimento de exactitud se llevó a cabo mediante el análisis de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAs). Se analizaron un total de 72 muestras que contenían VHS-1, VHS-2 y/o VVZ, entre otros virus que no eran objetivo, y cada material de referencia se testó una vez por carrera, incluyendo los controles positivo y negativo. Los paneles se extrajeron utilizando el procedimiento MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y se analizaron en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos los resultados de las pruebas, mostrados en la siguiente tabla, se calcularon en base a los recogidos en los informes finales facilitados por los organizadores de los EQAs:


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

Diana	Muestras positivas	ORA%	TP	FN	PPA (%)	TN	FP	NPA (%)
VHS-1	17	100	17	0	100	60	0	100
VHS-2	16	100	16	0	100	62	0	100
VVZ	29	100	29	0	100	48	0	100
Total	62	100	62	0	100	170	0	100

Tabla 22. Resultados de exactitud utilizando VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. TP = Verdaderos positivos, FN = Falsos negativos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos positivos, PPA = Porcentaje de acuerdo positivo, NPA = porcentaje de acuerdo negativo, ORA = Acuerdo global.

En conclusión, VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real-Time PCR Detection Kit ofrece una alta exactitud en la detección de VHS-1, VHS-2 y/o VVZ, con excelentes valores de NPA y PPA para todas las cepas testadas, cumpliendo con los criterios de aceptación para la validación.

12.5. Tasa de fallo de todo el Sistema

El parámetro de la tasa de fallo de todo el sistema se analizó para determinar la robustez y la fiabilidad del sistema PCR en condiciones reales.

Para demostrar que los especímenes de DNA de VHS-1, VHS-2 y VVZ con baja positividad se detectan con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit, se testaron muestras de EDTA-plasma (como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos) y de LCR no sujetas al proceso de extracción de ácidos nucleicos, ambas matrices de partida verificadas como negativas para las dianas detectadas, contaminadas con las siguientes cepas de referencia:

- Human Herpesvirus 1, Strain MacIntyre (ATCC ref: VR-539).
- Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Strain MS (Zeptomatrix ref: 0810006CF).
- Human Herpesvirus 3, Strain Ellen (ATCC ref: VR-1367).

Se prepararon 100 muestras de DNA de baja positividad por diana, a una concentración vírica equivalente a tres veces su LoD (3xLoD), y después se testaron con el ensayo VIASURE. Las muestras de EDTA-plasma se extrajeron con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y ambos tipos de muestra (EDTA-plasma y LCR) se amplificaron con el equipo CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Los resultados del estudio con matriz EDTA-plasma indicaron que todas las réplicas de Virus Herpes Simple 1 y Virus Varicela Zóster fueron reactivas a su correspondiente diana, representando una tasa de fallo de todo el sistema de 0%. En el caso del Virus Herpes Simple 2, el 99% de las muestras se detectaron correctamente. Por tanto, estos resultados cumplieron con los criterios de aceptación.

Del mismo modo, los resultados del estudio con matriz LCR indicaron que todas las réplicas de Virus Herpes Simple 1, Virus Herpes Simple 2 y Virus Varicela Zóster fueron reactivas a su correspondiente diana, representando una tasa de fallo de todo el sistema de 0%. Por lo tanto, estos resultados cumplen con los criterios de aceptación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

12.6. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit *in silico*, y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, DNA/RNAs certificados de referencia, así como material procedente de programas EQA.

12.6.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay cuatro componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada, la coinfección, la interferencia microbiana y la interferencia de sustancias. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando secuencias/microorganismos relacionados genéticamente imitan la diana prevista, mientras que la interferencia de microorganismos puede ocurrir si tales secuencias/microorganismos relacionados alteran la detección de los microorganismos diana cuando éstos últimos están presentes. De modo similar, el estudio de coinfección trata de comprobar si los microorganismos/secuencias diana a diferentes concentraciones y en la misma muestra pueden alterar la detección de estas entre ellas, y la interferencia de sustancias puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la qPCR.

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La reactividad cruzada se analizó empleando secuencias de referencia de microorganismos relacionados pero diferentes de las dianas detectadas, procedentes de la base de datos NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y/o con herramientas de búsqueda y/o de alineamiento como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un software de análisis bioinformático interno. Los resultados a mostrar solo se refieren a secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%. Las secuencias alineadas con un porcentaje de alineamiento inferior al 80% de homología se consideraron improbables de ser detectadas.

Todas las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de homología menor del 80% con el set de primers y sonda de VHS-1, VHS-2 y VVZ, revelando que ninguna de las secuencias analizadas puede afectar a la correcta detección de estos virus.

Por todo ello, se pudo concluir que los diseños para las dianas de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit no deberían causar falsos positivos para la detección de VHS-1, VHS-2 y VVZ cuando otros organismos están presentes.


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

Especificidad analítica: ensayo experimental

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La reactividad cruzada de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel de diferentes cepas de referencia y/o ácidos nucleicos procedentes de cepas de referencia asociadas a síntomas neurológicos/lesiones cutáneas, negativas para las dianas en estudio. Cuando fue posible, y cuando se disponía de los datos de concentración, los microorganismos se evaluaron a niveles médicamente relevantes (generalmente 10^5 - 10^6 UFC/mL para bacterias y hongos, y 10^4 - 10^5 UFP/mL para virus). El material de referencia fue utilizado para contaminar matriz relevante a nivel clínico (EDTA-plasma como matriz representativa sujeta al proceso de extracción de ácidos nucleicos, y LCR no sujeto al proceso de extracción de ácidos nucleicos, ambas verificadas como negativas para las dianas detectadas). Las muestras de EDTA-plasma se extrajeron con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science) y ambos tipos de muestras (EDTA-plasma y LCR) se analizaron con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Cuando solo estaban disponibles los ácidos nucleicos, se realizó directamente una qPCR. Las muestras se analizaron una vez por ensayo. No se detectaron reacciones cruzadas de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los microorganismos diana.

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i> cepa NCTC 7844	-	<i>Enterococcus faecium</i> Serotipo 11, NCTC 7171	-	Parvovirus B19	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> DSM 819	-	<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	Parechovirus Tipo 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i> EN-2, VPI 2553	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	-
BK virus tipo 1b-2	-	Virus Herpes Simple 1 (VHS-1)	+/-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo 1A	-
BK virus tipo IV	-	VHS-1 (95/1906)	+/-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-
<i>Candida albicans</i>	-	Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) cepa MacIntyre	+/-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa ATCC 27853	-
Chikungunya virus S27 Petersfield	-	Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) cepa F	+/-	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> cepa ATCC 25923	-
<i>Cryptococcus gatti</i> cepa Z156	-	VHS-1 (Clinical)	+/-	Virus Encefalitis San Luis	-
Citomegalovirus (AD169)	-	Virus Herpes Simple 2 (VHS-2)	+/-	<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	Virus Herpes Simple 2 (VHS-2) cepa MS	+/-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	Virus Herpes Simple 2 (VHS-2) cepa G	+/-	Virus encefalitis transmitida por garrapatas cepa Neudorfi	-
<i>Enterococcus durans</i> NCTC 8307	-	Virus Herpes Simple 2 (VHS-2) cepa ATCC-2011-2	+/-	<i>Toxoplasma gondii</i> Tipo II	-
Enterovirus (Coxsackie A4)	-	VHS-2 (Clinical)	+/-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24	-	Herpesvirus 6 humano cepa Z29	-	VVZ (9/84)	+/-
Enterovirus Coxsackievirus B3	-	Virus Herpes humano 6 (tipo A)	-	Virus Varicela-Zóster cepa Ellen	+/-
Enterovirus Coxsackievirus A9	-	Virus Herpes humano 6 (tipo B)	-	Virus Varicela-Zóster cepa OKA	+/-
Enterovirus Echovirus 7	-	JC virus 1A	-	Virus Varicela-Zóster clado 3	+/-
Enterovirus Echovirus 11	-	JC virus Tipo 2B	-	Virus Varicela-Zóster cepa AV92-3:L	+/-
Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa CCUG 15717	-	VVZ (Clinical)	+/-
Enterovirus Echovirus 68	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	Virus del Nilo Occidental Heja	-
Enterovirus 71	-	<i>Listeria ivanovii subsp. ivanovii</i> serovar 5	-	Virus del Nilo Occidental Ug37	-

Epstein-Barr virus	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2b	-	Virus de la Fiebre Amarilla	-
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa NCIMB 775	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i> VZA1 (vanA resistente)	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-		

Tabla 23. Microorganismos de referencia utilizados en este estudio, en ausencia de los microorganismos diana, analizados con el flujo matriz EDTA-plasma / MagDEA / magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) / CFX96 Touch™ (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ (Bio-Rad) y el flujo LCR / CFX96 Touch™ (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ (Bio-Rad).

Además, la interferencia microbiana se testó con altas concentraciones (10^5 - 10^6 UFC/mL para bacterias y 10^4 - 10^5 UFP/mL para virus) de una selección de diferentes microorganismos asociados a síntomas neurológicos/lesiones cutáneas, junto con la presencia de las dianas detectadas por el dispositivo VIASURE a una concentración cercana al LoD, con el objeto de verificar que la presencia de otros microorganismos relacionados y asociados a sintomatología neurológica/lesiones cutáneas no alterará la detección de las dianas identificadas con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. Se llevó a cabo el mismo procedimiento de preparación de muestras en EDTA-plasma y matriz LCR que para los ensayos de reactividad cruzada, y se incluyeron dos controles: Matriz Control Positivo (PMC) (matriz biológica clínica verificada como negativa para el DNA diana, contaminada con el material de referencia positivo para cada virus diana a 3xLoD, sin microorganismos interferentes), y Matriz Control Negativo (NMC) (matriz DNA negativa sin microorganismos interferentes potenciales ni microorganismos/material de referencia diana añadido). Los resultados obtenidos mostraron que la detección del DNA de VHS-1, VHS-2 y VVZ no se vio alterada cuando dicha detección se analizó a bajas concentraciones en presencia de otros microorganismos relacionados con síntomas neurológicos/lesiones cutáneas.

Prueba de interferencia microbiana					
PMC	+	Enterovirus	+	Parechovirus	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	Epstein-Barr virus	+	<i>Plasmodium falciparum</i>	+
Adenovirus	+	<i>E. coli</i>	+	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	<i>Haemophilus influenzae</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	Virus Herpes humano 6	+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+
BK virus	+	Virus Herpes humano 7	+	Virus Encefalitis San Luis	+
<i>Candida albicans</i>	+	Virus Herpes humano 8	+	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+
Chikungunya virus	+	JC virus	+	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
<i>Cryptococcus gatti</i>	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	Virus encefalitis transmitida por garrapatas	+
Cytomegalovirus	+	<i>Listeria innocua</i>	+	<i>Toxoplasma gondii</i>	+
Echovirus Humano Tipo 4	+	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	+	<i>Treponema pallidum</i>	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Virus del Nilo Occidental	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	Virus de las Paperas	+	Virus de la Fiebre Amarilla	+
<i>Enterococcus durans</i>	+	<i>Neisseria meningitidis</i>	+	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Parvovirus	+	NMC	-
<i>Enterococcus faecium</i>	+				

Tabla 24. Microorganismos de referencia en presencia de los microorganismos diana utilizados en este estudio, y analizados con el flujo de trabajo matriz EDTA-plasma / MagDEA / magLEAD® 12gC (Precision System Science) / CFX96 Touch™ (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ (Bio-Rad) y con el flujo LCR / CFX96 Touch™ (Bio-Rad) / CFX Opus 96™ (Bio-Rad).

Finalmente, se evaluó si la presencia de las dianas de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit a diferentes concentraciones dentro de la misma muestra pudiera alterar la detección entre ellas. Se prepararon el mismo número de muestras por matriz validada (EDTA-


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

plasma y muestras LCR no sujetas al proceso de extracción de ácidos nucleicos), con diferentes concentraciones de material de referencia positivos para VHS-1, VHS-2 y VVZ:

	VHS-1	VHS-2	VVZ
Control	3xLoD	3xLoD	3xLoD
Muestra 1	$8,9 \times 10^2$ TCID ₅₀ /μL	3xLoD	3xLoD
Muestra 2	3xLoD	$6,31 \times 10^3$ TCID ₅₀ /μL	3xLoD
Muestra 3	3xLoD	3xLoD	0,92 TCID ₅₀ /μL

Tabla 25. Composición de las muestras contaminadas con diferentes combinaciones de dianas detectadas con VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. TCID₅₀ = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés).

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de VVZ a concentraciones altas inhibe la amplificación del DNA de VHS-1 y VHS-2, aun obteniéndose señal de amplificación del CI con un $Ct \leq 35$. Por tanto, se diseñaron dos experimentos para conocer cómo la presencia de VVZ afecta a las otras dianas. En primer lugar, se estudió el efecto inhibitorio de VVZ mediante el aumento de su concentración, en presencia de VHS-1 y VHS-2 a la concentración de 3xLoD. En segundo lugar, se llevó a cabo un experimento en el que se fijó la concentración de VVZ a una concentración inhibitoria mientras que se aumentaban las concentraciones de VHS-1 y VHS-2. La menor concentración inhibitoria observada de VVZ que impedía la amplificación de VHS-1 y VHS-2 ($4,6 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/μL), conocida tras estudiar los resultados obtenidos en el primer experimento, fue la que se mantuvo durante el segundo experimento.

En conclusión, la presencia de VVZ a una concentración superior a $4,6 \times 10^{-2}$ TCID₅₀/μL puede interferir con la detección de VHS-1 y VHS-2 a bajas concentraciones, cercanas al límite de detección (LoD). No obstante, una concentración elevada de estos dos últimos virus mencionados resultaría en una disminución del riesgo de interferencia, por lo que, en conjunto con el hecho de que los ensayos de coinfección muestran amplificación del CI con un valor $Ct \leq 35$, se concluye que los criterios de aceptación se cumplieron.

Como resumen, los resultados de los ensayos de reactividad cruzada cumplen con los criterios de aceptación de la validación, e indican una alta especificidad de VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit para la detección de los virus diana, minimizando así el riesgo de falsos positivos. Puesto que no se observan amplificaciones inespecíficas con otros microorganismos relacionados, esto sugiere que el dispositivo es capaz de distinguir con exactitud los virus diana.

Interferencias e inhibidores de PCR

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia y reactividad cruzada de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit. Se evaluaron un total de 32 sustancias potencialmente presentes en matriz EDTA-plasma y en matriz EDTA-sangre completa, mientras que en LCR se evaluaron 27, en matriz hisopos de lesión fueron 30, y en matriz ocular, 12. La matriz biológica negativa se contaminó con los materiales Human Herpesvirus 1, Strain MacIntyre (ATCC ref: VR-539), Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Strain MS (Zeptomatrix ref: 0810006CF), y con Human Herpesvirus 3, Strain Ellen (ATCC ref: VR-1367),

todos a una concentración de 3xLoD. Posteriormente, se extrajeron (cuando aplicaba) empleando MagDEA Dx SV Kit junto con el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.), y se amplificaron con el termociclador CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Como control de la prueba se utilizó la mezcla de reacción rehidratada sin ninguna sustancia interferente añadida, añadiéndose posteriormente el ácido nucleico extraído de la muestra simulada (Control Matriz Positiva (PMC)). Además, se incluyó en el ensayo un control negativo, que consistió en una muestra de matriz negativa extraída y analizada en la qPCR sin sustancias interferentes potenciales ni microorganismos/material de referencia añadidos (Control Matriz Negativa (NMC)).

Ensayo de evaluación de interferencias sólo en qPCR

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió directamente la mezcla de reacción rehidratada, la cual también contiene el ácido nucleico previamente extraído de las muestras simuladas, o de las muestras LCR no sujetas a la extracción de ácido nucleico:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
EDTA-plasma		
17- α -Ethinilestradiol	7,5x10 ⁻⁹ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56x10 ⁻¹ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	6,6x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Ampicilina	7,5x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Azatioprina	2,58x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	0,1 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Ciclosporina	0,281 mg/mL	N.I.
Cidofovir	2,02x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Dexametasona	1,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	1,8x10 ⁻² mg/mL	N.I.
EDTA	9,9x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Foscarnet	0,175 mg/mL	N.I.
Ganciclovir	0,032 mg/mL	N.I.
DNA genómico	3,5x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Heparina	0,412 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	0,312 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	0,219 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	2,5 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Lorazepam	7,2x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	1,56x10 ⁶ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	0,042 mg/mL	N.I.
Oseltamivir	3,99x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Prednisona	9,90x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I.
Valganciclovir	0,022 mg/mL	N.I.

Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
EDTA-sangre completa		
17- α -Ethinilestradiol	$7,5 \times 10^{-9}$ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,5 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Azatioprina	$2,58 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	0,1 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Ciclosporina	0,281 mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Cidofovir	$2,02 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,8 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
EDTA	$9,90 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	0,0875 mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,2 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Heparina	0,412 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	0,312 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	0,219 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	2,5 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	$1,56 \times 10^6$ células/mL	N.I.
Lorazepam	$7,20 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	$4,2 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Oseltamivir	$3,99 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Prednisona	$9,9 \times 10^{-5}$ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	3,75 mg/mL	N.I.
Valganciclovir	$2,2 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
LCR		
4-Acetamidofenol	$1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	$6,60 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ampicilina	$7,5 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Sangre/EDTA	1,25% (v/v)	N.I.
Caseína	$6,25 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Cafeína	0,108 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Dexametasona	$1,20 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Difenidramina	$7,74 \times 10^{-4}$ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	$1,8 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Flucitosina	0,204 mg/mL	N.I.
Fluoxentina	$1,42 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Foscarnet	$8,75 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,2 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.

Haloperidol	7,35x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	0,625 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	1,56x10 ⁶ células/mL	N.I.
Lorazepam	7,20x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Triglicéridos	1.875 mg/mL	N.I.
Ácido Valproico	0,318 mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
Hisopos de lesión		
Aciclovir	0,0666 mg/mL	N.I.
Clotrimazol	2,5 mg/mL	N.I.
Conceptrol Gel anticonceptivo	2,5 mg/mL	N.I.
Estradiol	7,50x10 ⁻⁹ mg/mL	N.I.
Desodorante femenino en aerosol	5 % (v/v)	N.I.
Leucocitos/monocitos	2,5x10 ⁵ células/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Nitrato de miconazol	2,5 mg/mL	N.I.
Premeno duo (Ácido hialurónico y ácido láctico)	2,5 mg/mL	N.I.
Hemoal (benzocaína y efedrina)	2,5 mg/mL	N.I.
Progesterona	6x10 ⁻⁶ mg/mL	N.I.
Cumlaude (Lubricante vaginal)	2,5 mg/mL	N.I.
Semen	5 % (v/v)	N.I.
Tioconazol	2,5 mg/mL	N.I.
Crema vaginal contra el picor	2,5 mg/mL	N.I.
Líquido lubricante vaginal – base acuosa	50 µL/mL	N.I.
Líquido lubricante vaginal – base oleosa	50 µL/mL	N.I.
EDTA-sangre completa	0,3125 % (v/v)	N.I.
Bacitracina (Rinobanedif)	2,5 mg/mL	N.I.
Caseína	7 mg/mL	N.I.
Difenidramina (Cream Neosayomol)	2,5 mg/mL	N.I.
Heces	0.22%	N.I.
Orina femenina	10%	N.I.
Albúmina humana	10 mg/mL	N.I.
Crema hidrocortisona	2,5 mg/mL	N.I.
Letibalm (bálsamo labial)	2,5 mg/mL	N.I.
Orina masculina	10%	N.I.
Mucina	2,5 mg/mL	N.I.
Talquistina (Talco)	0.33 % (v/v)	N.I.
Pomada de óxido de zinc	2,5 mg/mL	N.I.
Matriz ocular		
Ampicilina	7,50x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Colágeno	2x10 ² µg/mL	N.I.
Solución para lentes de contacto	5 % (v/v)	N.I.
Corticosteroides	5 µg/mL	N.I.
Ganciclovir	3,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
DNA genómico	3,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Hemoglobina	0,313 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	2,5 mg/mL	N.I.

Triglicéridos	3,75 mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.

Tabla 26. Sustancias potencialmente interferentes. N.I.: Interferencias no notificables. UI = Unidades Internacionales. v/v = volumen/volumen.

Evaluación de la interferencia en todo el proceso (extracción y qPCR)

Los resultados obtenidos fueron los siguientes cuando la sustancia potencialmente interferente se añadió a la muestra simulada que iba a extraerse (incluida la matriz LCR), de la que el eluido obtenido fue añadido al ensayo qPCR:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
EDTA-plasma		
17- α -Ethinilestradiol	7,5x10 ⁻⁹ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56x10 ⁻¹ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	6,6x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Ampicilina	7,5x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Azatioprina	2,58x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	0,4 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Ciclosporina	1,125 mg/mL	N.I.
Cidofovir	0,081 mg/mL	N.I.
Dexametasona	1,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	1,8x10 ⁻² mg/mL	N.I.
EDTA	9,9x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Foscarnet	0,7 mg/mL	N.I.
Ganciclovir	0,032 mg/mL	N.I.
DNA genómico	3,5x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Heparina	3,3 IU/mL	N.I.
Hemoglobina humana	10 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	0,219 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	20 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Lorazepam	7,2x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	6.25x10 ⁶ células/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	0,042 mg/mL	N.I.
Oseltamivir	3,99x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Prednisona	9,90x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I.
Valganciclovir	0,022 mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
EDTA-sangre completa		
17- α -Ethinilestradiol	7,5x10 ⁻⁹ mg/mL	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56x10 ⁻¹ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	6,60x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Ampicilina	7,5x10 ⁻² mg/mL	N.I.

Azatioprina	2,58x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Bilirrubina	0,4 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Ciclosporina	1,125 mg/mL	N.I.
Dexametasona	1,20x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Cidofovir	8,1x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	1,8x10 ⁻² mg/mL	N.I.
EDTA	9,90x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Foscarnet	0,7 mg/mL	N.I.
Ganciclovir	3,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
DNA genómico	3,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Heparina	3,3 UI/mL	N.I.
Hemoglobina humana	10 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Ibuprofeno	0,219 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	20 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	6,25x10 ⁶ células/mL	N.I.
Lorazepam	7,20x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Micofenolato mofetilo	4,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Oseltamivir	3,99x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Prednisona	9,9x10 ⁻⁵ mg/mL	N.I.
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I.
Valganciclovir	2,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
LCR		
4-Acetamidofenol	1,56x10 ⁻¹ mg/mL	N.I.
Ácido Acetilsalicílico	0,03 mg/mL	N.I.
Aciclovir	6,60x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Ampicilina	7,5x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Sangre/EDTA	5% (v/v)	N.I.
Caseína	0,5 mg/mL	N.I.
Cafeína	0,108 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	0,84 mg/mL	N.I.
Dexametasona	1,20x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Difenidramina	7,74x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Doxiciclina hclato	1,8x10 ⁻² mg/mL	N.I.
Flucitosina	0,204 mg/mL	N.I.
Fluoxentina	1,42x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Foscarnet	0,7 mg/mL	N.I.
Ganciclovir	3,2x10 ⁻² mg/mL	N.I.
DNA genómico	3,50x10 ⁻³ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Haloperidol	7,35x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	20 mg/mL	N.I.
Lactato	0,9 mg/mL	N.I.
Células mononucleares de sangre periférica	6,25x10 ⁶ células/mL	N.I.
Lorazepam	7,20x10 ⁻⁴ mg/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.

Triglicéridos	15 mg/mL	N.I.
Ácido Valproico	0,318 mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.
Hisopos de lesión		
Aciclovir	0.0666 mg/mL	N.I.
Clotrimazol	2,5 mg/mL	N.I.
Conceptrol Gel anticonceptivo	2,5 mg/mL	N.I.
Estradiol	$7,50 \times 10^{-9}$ mg/mL	N.I.
Desodorante femenino en aerosol	5 % (v/v)	N.I.
Leucocitos/monocitos	10^6 células/mL	N.I.
Metronidazol	0,123 mg/mL	N.I.
Nitrato de miconazol	2,5 mg/mL	N.I.
Premeno duo (Ácido hialurónico y ácido láctico)	2,5 mg/mL	N.I.
Hemoal (benzocaína y efedrina)	2,5 mg/mL	N.I.
Progesterona	6×10^{-6} mg/mL	N.I.
Cumlaude (Lubricante vaginal)	2,5 mg/mL	N.I.
Semen	5 % (v/v)	N.I.
Tioconazol	2,5 mg/mL	N.I.
Crema vaginal contra el picor	2,5 mg/mL	N.I.
Líquido lubricante vaginal – base acuosa	50 µL/mL	N.I.
Líquido lubricante vaginal – base oleosa	50 µL/mL	N.I.
EDTA-sangre completa	5 % (v/v)	N.I.
Bacitracina (Rinobanedif)	2,5 mg/mL	N.I.
Caseína	7 mg/mL	N.I.
Difenidramina (Cream Neosayomol)	2,5 mg/mL	N.I.
Heces	0,22%	N.I.
Orina femenina	10%	N.I.
Albúmina humana	10 mg/mL	N.I.
Crema hidrocortisona	2,5 mg/mL	N.I.
Letibalm (bálsamo labial)	2,5 mg/mL	N.I.
Orina masculina	10%	N.I.
Mucina	2,5 mg/mL	N.I.
Talquistina (Talco)	2,64 % (v/v)	N.I.
Pomada de óxido de zinc	2,5 mg/mL	N.I.
Matriz ocular		
Ampicilina	$7,50 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
Colágeno	2×10^2 µg/mL	N.I.
Solución para lentes de contacto	5 % (v/v)	N.I.
Corticosteroides	5 µg/mL	N.I.
Ganciclovir	$3,2 \times 10^{-2}$ mg/mL	N.I.
DNA genómico	$3,50 \times 10^{-3}$ mg/mL	N.I.
Glucosa	10 mg/mL	N.I.
Hemoglobina	10 mg/mL	N.I.
Albúmina sérica humana	10 mg/mL	N.I.
Inmunoglobulina G	20 mg/mL	N.I.
Triglicéridos	15 mg/mL	N.I.
Vancomicina	0,12 mg/mL	N.I.

Tabla 27. Sustancias potencialmente interferentes. N.I.: Interferencias no notificables. UI = Unidades Internacionales. v/v = volumen/volumen.

En conclusión, diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido testadas con VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection

Kit. Los resultados obtenidos permiten concluir que, a las concentraciones evaluadas no se observan interferencias para ninguna de las sustancias a las concentraciones indicadas para cada condición.

12.6.2. Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan un lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis *in silico* y experimentales.

Reactividad analítica: análisis *in silico*

La Reactividad Analítica se evaluó utilizando bases de datos públicas como el NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y un software de análisis bioinformático interno, para demostrar que VHS-1, VHS-2 y/o VVZ pueden detectarse correctamente por el dispositivo. Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Diana	Secuencias detectadas sin desajustes ("mismatches")	Nº secuencias
Virus Herpes simple 1	13,66	505
Virus Herpes simple 2	94,49	526
Virus Varicela Zóster	97,18	284

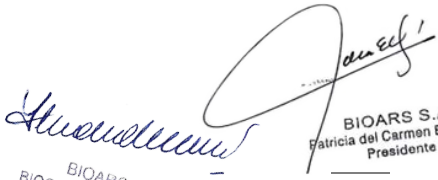
Tabla 28. Análisis *in silico* de la reactividad analítica de las secuencias de VHS-1, VHS-2 y VVZ.

Aunque la mayoría de las secuencias probadas de Virus Herpes simple 1 se detectaron con desajustes ("mismatches"), los análisis de la reactividad analítica mostraron una correcta detección de VHS-1, VHS-2 y/o VVZ con VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad analítica de VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente al DNA de las siguientes cepas de referencia certificadas:

- Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Strain MacIntyre (Zeptomatrix ref: NATMEP-BIO).
- 1st WHO International Standard for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) DNA (NIBSC code 16/368).
- Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Strain F (ATCC ref: VR-733).
- Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Strain MS (Zeptomatrix ref: NATMEP-BIO).
- 1st WHO International Standard for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) DNA (NIBSC code 17/122).
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2) Strain G (ATCC ref: VR-3393).
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2) Strain ATCC-2011-2 (ATCC ref: VR-1779).
- Varicella Zoster Virus, Strain Ellen (Zeptomatrix ref: NATMEP-BIO).
- Varicella Zoster Virus from QCMD Varicella-Zoster Virus (DNA) 2017 EQA Programme.
- 1st WHO International Standard for Varicella Zoster Virus (VZV) NAT assays (NIBSC code: 19/164).
- Human herpesvirus 3, strain OKA (ATCC ref: VR-1832).
- Human herpesvirus 3, strain AV92-3:L (ATCC ref: VR-1433).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

- NATtrol™ Varicella-Zoster Virus, strain Ellen (ZeptoMetrix ref: NATVZV-STQ).

Las cepas de referencia listadas fueron añadidas a una concentración 3xLoD en EDTA-plasma y LCR. Después, el ácido nucleico de todos los materiales de referencia utilizados se extrajo de las muestras EDTA-plasma con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science) y se analizó con el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), mientras que las muestras LCR se analizaron directamente con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)/CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Cuando se utilizó el kit VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se obtuvieron resultados positivos, tal y como era esperado:

Cepa	Concentración testada	Ct FAM (VHS-1)	Ct HEX (CI)	Ct ROX (VHS-2)	Ct Cy5 (VVZ)
Matriz EDTA-plasma					
Virus Herpes simple 1 (VHS-1) cepa F	4,8x10 ⁻² TCID50/μL	32,51	21,32	Neg	Neg
1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (VHS-1)	4,8x10 ⁻² UI/μL	33,13	21,12	Neg	Neg
Virus Herpes simple 1 (VHS-1) cepa MacIntyre	NA	33,13	22,18	Neg	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa G	1,50x10 ⁻³ TCID50/μL	Neg	22,04	36,51	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa ATCC-2011-2	1,50x10 ⁻³ TCID50/μL	Neg	21,13	35,45	Neg
1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	1,5x10 ⁻³ UI/μL	Neg	21,02	35,01	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa MS	NA	Neg	22,25	36,41	Neg
Herpesvirus 3 humano, cepa AV92-3:L	1,5x10 ⁻⁵ TCID50/μL	Neg	21,56	Neg	31,84
Herpesvirus 3 humano (Virus Varicela-Zóster), cepa Ellen	1,5x10 ⁻⁵ TCID50/μL	Neg	21,81	Neg	31,88
1st WHO IS for Varicella Zoster Virus (VZV)	1,5x10 ⁻⁵ UI/μL	Neg	21,03	Neg	32,02
Virus Varicela-Zóster, cepa Ellen	NA	Neg	22,22	Neg	32,02
Herpesvirus 3 humano, cepa OKA	1,50x10 ⁻⁵ TCID50/μL	Neg	21,8	Neg	32,11
Virus Varicela-Zóster, cepa OKA	NA	Neg	22,09	Neg	38,03
Matriz LCR sin extraer ácido nucleico					
Virus Herpes simple 1 (VHS-1) cepa F	0,192 TCID50/μL	33,13	22,32	Neg	Neg
1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	0,192 UI/μL	32,25	21,12	Neg	Neg
Virus Herpes simple 1 (VHS-1) cepa MacIntyre	NA	31,57	21,18	Neg	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa G	1,20x10 ⁻² TCID50/μL	Neg	21,04	35,44	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa ATCC-2011-2	1,20x10 ⁻² TCID50/μL	Neg	20,13	34,75	Neg
1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	1,20x10 ⁻² UI/μL	Neg	22,02	34,70	Neg
Virus Herpes simple 2 (VHS-2) cepa MS	NA	Neg	23,25	33,89	Neg
Herpesvirus 3 humano, cepa AV92-3:L	1,2x10 ⁻⁴ TCID50/μL	Neg	22,56	Neg	33,01
Herpesvirus 3 humano (Virus Varicela-Zóster), cepa Ellen	1,2x10 ⁻⁴ copies/μL	Neg	21,81	Neg	32,28
1st WHO IS for Varicella Zoster Virus (VZV)	1,2x10 ⁻⁴ UI/μL	Neg	20,03	Neg	33,07

Varicella Zoster Virus, Strain Ellen	NA	Neg	22,22	Neg	32,40
Herpesvirus 3 humano, cepa OKA	1,2x10 ⁻⁴ TCID50/μL	Neg	22,8	Neg	32,6
Virus Varicela-Zóster, cepa OKA	NA	Neg	21,09	Neg	32,98

Tabla 29. Resultados del análisis experimental de la reactividad analítica. (UI) = Unidades Internacionales, (Neg) = Negativo, (TCID50) = dosis infectiva de cultivo de tejido 50% (de sus siglas en inglés). NA = no disponible (de sus siglas en inglés).

Además, la reactividad analítica de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con material de referencia procedente de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAs), mostrando resultados positivos cuando se testaron muestras positivas a VHS-1, VHS-2 y VVZ. Estos materiales de referencia contenían VHS-1 (95/1906), VHS-1 (Clínica), VHS-2, VHS-2 (Clínica), VVZ (9/84), VVZ (Ellen), VVZ (OKA) y VVZ (Clínica).

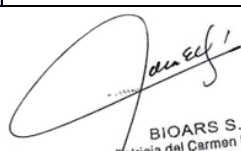
12.7. Trazabilidad metrológica

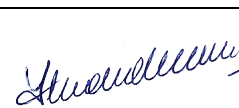
No aplica. Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se probó utilizando muestras de EDTA-plasma, EDTA-sangre completa, LCR, hisopos de lesión y muestras oculares, procedentes de individuos afectados (sin distinción entre sexo o edad), o con sospecha de estar infectados por uno o varios de los virus diana bajo estudio. Para determinar la precisión del diagnóstico clínico, se realizaron diferentes evaluaciones clínicas en colaboración con entidades nacionales e internacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado.

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) (Zaragoza, España)	Muestras de líquido cefalorraquídeo	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology) y ausencia de extracción de DNA + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)	VHS-1
				VVZ
2	Certest Biotec S.L (Zaragoza, España), en colaboración con Cerba Xpert (París, Francia)	Muestras de úlceras de mucosa/ hisopos de lesión y de úlceras genitales/hisopos de lesión	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)	VHS-1
				VHS-2
				VVZ
3	Certest Biotec S.L (Zaragoza, España), en colaboración con Cerba Xpert (París, Francia)	Muestras de hisopos de lesión cutánea	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)	VHS-1
				VHS-2
				VVZ
4.A	Certest Biotec S.L (Zaragoza, España), en colaboración con Eurofins Biomnis (Lyon, Francia)	Muestras de hisopos de lesión	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)	VHS-1
4.B		Muestras de EDTA-sangre completa		VHS-2
	VVZ			
5.A	Certest Biotec S.L (Zaragoza, España), en	Muestras de hisopos de lesión	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX Opus 96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	VHS-1
5.B		Muestras de EDTA-sangre completa		VHS-2


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

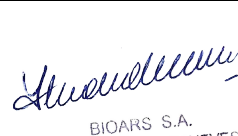
5.C	colaboración con Cerba Xpert (París, Francia)	Muestras de EDTA-plasma		VVZ
6	Certest Biotec S.L (Zaragoza, España), en colaboración con el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (Zaragoza, España)	Muestras de hisopos de lesión	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology)	VHS-1
				VHS-2
				VVZ
7.A	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) (Zaragoza, España)	Muestras de líquido cefalorraquídeo	MagDEA Dx SV Kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	VHS-1
7.B		Muestras oculares		VHS-2
7.C		Muestras de hisopos de lesión		
7.D		Muestras de EDTA-plasma		VVZ

Tabla 30. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores positivos y negativos verdaderos, los falsos negativos y falsos positivos, la sensibilidad, la especificidad, el PPV, los valores de NPV y el cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1	CLART® ENTHERPEX (Genómica)*	VHS-1	2	46	0	0	1(0,16-1)	1(0,92-1)	1(0,16-1)	1(0,92-1)	78,33(4,75-1292)	0,168(0,013-2,12)
		VVZ	1	47	0	0	1(0,03-1)	1(0,92-1)	1(0,03-1)	1(0,92-1)	72(4,08-1271)	0,25(0,023-2,79)
2	RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VHS-1	181	102	5	1	0,99 (0,97-1)	0,95 (0,89-0,98)	0,97 (0,94-0,99)	0,99 (0,95-0,99)	21,28 (9,04-50,1)	0,006 (0,001-0,04)
		VHS-2	113	170	6	0	1(0,97-1)	0,97(0,93-0,99)	0,95(0,89-0,98)	1(0,98-1)	27,11(12,75-57,7)	0,005(0-0,07)
		VVZ	0	289	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1(0,99-1)	n.a~	n.a~
3	VZV Real-TM (Sacace Biotechnologies) + RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VHS-1	0	30	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1 (0,88-1)	n.a~	n.a~
		VHS-2	0	30	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1 (0,88-1)	n.a~	n.a~
		VVZ	30	0	0	0	n.a\$	n.a\$	1 (0,88-1)	n.a\$	n.a\$	n.a\$
4.A	Diagnóstico inicial ** + RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VHS-1	0	42	0	0	n.a\$	n.a\$	n.a\$	1(0,92-1)	n.a\$	n.a\$
		VHS-2	0	42	0	0	n.a\$	n.a\$	n.a\$	1(0,92-1)	n.a\$	n.a\$
		VVZ	41	1	0	0	1(0,96-1)	1(0,16-1)	1(0,21-1)	1(0,91-1)	3,95(0,72-21,58)	0,01(0,002-0,12)
4.B	Diagnóstico inicial ** + RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VHS-1	0	3	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1(0,44-1)	n.a~	n.a~
		VHS-2	0	3	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1(0,44-1)	n.a~	n.a~
		VVZ	2	1	0	0	1(0,34-1)	1(0,16-1)	1(0,34-1)	1(0,21-1)	3,33 (0,59-18,89)	0,22 (0,03-1,45)
5.A	HSV I/II Real-TM (Sacace Biotechnologies)	VHS-1	113	162	1	2	0,98 (0,94-1)	0,99 (0,97-1)	0,98(0,94-1)	0,99(0,97-1)	160,17(22,69-1130)	0,01(0,004-0,07)
		VHS-2	106	171	0	1	0,99(0,95-1)	0,99(0,98-1)	0,99(0,95-1)	1(0,98-1)	339,22(21,30-5402)	0,01(0,003-0,07)


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

5.B	+ VZV Real-TM (Sacace Biotechnologies) + RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VVZ	55	223	0	0	0,94 (0,94-1)	0,99(0,98-1)	1(0,94-1)	1(0,98-1)	444,00(27,85-7077)	0,01(0,001-0,14)
		VHS-1	9	15	1	1	0,90 (0,56-1)	0,94(0,67-1)	0,90(0,60-0,98)	0,94(0,72-0,99)	14,40(2,14-97,14)	0,11(0,02-0,69)
		VHS-2	0	26	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1(0,87-1)	n.a~	n.a~
5.C		VVZ	2	24	0	0	1(0,16-1)	1(0,86-1)	1(0,34-1)	1(0,86-1)	41,67(2,56-678,53)	0,17(0,01-2,14)
		VHS-1	1	1	0	0	1(0,03-1)	1(0,03-1)	1(0,21-1)	1(0,21-1)	3,00(0,24-37,67)	0,33(0,03-4,19)
		VHS-2	0	2	0	0	n.a.*	n.a.*	n.a.*	1(0,34-1)	n.a.*	n.a.*
6	Allplex™ Genital ulcer Assay (Seegene)+ RealStar® alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	VVZ	1	1	0	0	1(0,03-1)	1(0,03-1)	1(0,21-1)	1(0,21-1)	3,00(0,24-37,67)	0,33(0,03-4,19)
		VHS-1	55	328	3	1	0,98 (0,90-1)	0,99 (0,97-1)	0,94(0,86-0,98)	0,99(0,98-0,99)	108,36(35,1-334)	0,018(0,003-0,12)
		VHS-2	50	334	1	2	0,96(0,86-0,99)	0,99(0,98-1)	0,98(0,89-0,99)	0,99(0,98-0,99)	322,12(45-2281)	0,039(0,01-0,15)
7.A	Allplex™ Meningitis-V1 Assay (Seegene)	VVZ	37	345	2	3	0,92(0,79-0,98)	0,99(0,97-0,99)	0,94(0,83-0,99)	0,99(0,97-0,99)	160,49(40,1-640)	0,075(0,025-0,22)
		VHS-1	8	361	0	0	1 (0,63-1)	1 (0,99-1)	1 (0,67-1)	1 (0,99-1)	683,78(42,658-10960,6)	0,056(0,004-0,823)
		VHS-2	5	364	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,99-1)	1 (0,56-1)	1 (0,99-1)	669,17(41,497-10790,7)	0,083(0,006-1,186)
7.B	Allplex™ Genital ulcer Assay (Seegene)	VVZ	4	365	0	0	1 (0,39-1)	1 (0,99-1)	1 (0,51-1)	1 (0,99-1)	658,80(40,655-10675,5)	0,100(0,007-1,389)
		VHS-1	9	202	0	0	1 (0,66-1)	1 (0,98-1)	1(0,70-1)	1 (0,98-1)	385,70(24,119-6167,9)	0,050(0,003-0,747)
		VHS-2	0	211	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1 (0,98-1)	n.a~	n.a~
7.C	Allplex™ Genital ulcer Assay (Seegene)	VVZ	7	204	0	0	1 (0,59-1)	1 (0,98-1)	1 (0,64-1)	1 (0,98-1)	384,38(23,985-6160,0)	0,063(0,004-0,917)
		VHS-1	27	104	0	0	1 (0,87-1)	1 (0,96-1)	1 (0,87-1)	1 (0,96-1)	206,25(12,980-3277,2)	0,018(0,001-0,280)
		VHS-2	4	127	0	0	1 (0,39-1)	1 (0,97-1)	1 (0,51-1)	1 (0,97-1)	230,40(14,268-3720,5)	0,100(0,007-1,392)
7.D	Allplex™ Meningitis-V1 Assay (Seegene)	VVZ	13	118	0	0	1 (0,75-1)	1 (0,96-1)	1 (0,77-1)	1 (0,96-1)	229,50(14,412-3654,5)	0,036(0,002-0,545)
		VHS-1	0	52	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1(0,93-1)	n.a~	n.a~
		VHS-2	0	52	0	0	n.a~	n.a~	n.a~	1 (0,93-1)	n.a~	n.a~
		VVZ	3	49	0	0	1 (0,29-1)	1 (0,92-1)	1 (0,43-1)	1 (0,92-1)	89,250(5,521-1442,9)	0,126(0,009-1,688)

Tabla 31. Valores verdaderos positivos (TP) y valores verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit.

* Estas muestras se caracterizaron utilizando los procedimientos para cultivos de bacterias causantes de meningitis, y el ensayo de diagnóstico molecular CLART® ENTHERPEX (Genomica) para el diagnóstico de meningitis viral.

** qPCR interna validada que detecta la secuencia genómica UL41, junto con el equipo the QuantStudio™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) para VZV (solo).

~ Debido a la ausencia de valores verdaderos positivos, no se pudo realizar el cálculo de los valores de la sensibilidad, especificidad, PPV y LR.

§ Debido a la ausencia de valores verdaderos negativos, no se pudo realizar el cálculo de los valores de la sensibilidad, especificidad, NPV y LR.

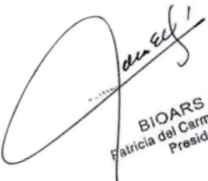
Además, durante la realización de la evaluación clínica 4, se evaluó una muestra de suero (matriz no validada), de la que se obtuvieron resultados concordantes con la caracterización inicial. Asimismo, durante el transcurso de la evaluación clínica 7, se evaluó el funcionamiento con matrices no validadas, como los lavados broncoalveolares, líquido amniótico, líquido ascítico, y muestras orofaríngeas, con el fin de comprender el comportamiento del ensayo en diferentes ambientes biológicos, asegurando así una aplicabilidad más extensa e identificando efectos potenciales asociados a matriz. Se obtuvieron resultados

satisfactorios para las tres dianas testadas, proporcionando una valiosa perspectiva en cuanto a la adaptabilidad del test en diferentes tipos de muestra.

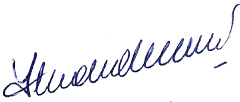
En conclusión, los resultados muestran una alta concordancia para detectar VHS-1, VHS-2 y/o VVZ utilizando VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit.

14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento

El Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento de VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit puede descargarse de la página web: certest.es/viasure/labeling. Este resumen también se encontrará en el sitio web de EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>).



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 1

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ101L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ101H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ106L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ106H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ112L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ112H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHZ113L
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHZ113H
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ101
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ136
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ172

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado¹, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Herpes simple 1	FAM	US4
Virus Herpes simple 2	ROX	US6
Virus Varicela-Zóster	Cy5	ORF29
Control Interno	HEX*	-

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "liofilizado" se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> 8-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojos	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	-	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

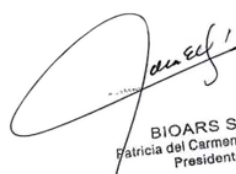
Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ101L, VS-HHZ101H, VS-HHZ106L, VS-HHZ106H, VS-HHZ112L y VS-HHZ112H.

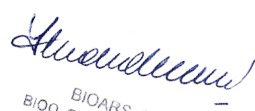
* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> 96-well plate	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojos	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ113L y VS-HHZ113H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etcheves
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHES
DIRECTOR TECNICO

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 4-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1.5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ101, VS-HHZ136 y VS-HHZ172. Para uso en Qiagen/Corbett Rotor-Gene® y compatible con accesorios con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las tiras o placa que necesite para el ensayo.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 μL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial violeta) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o la placa de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras o la placa en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador a usar para conocer el formato del tubo a utilizar.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1.6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHS-1), ROX (VHS-2), Cy5 (VVZ) y HEX (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOG. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHZ196T

Tabla A2. 1 Referencias

A 2.1. Procedimiento

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado¹, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Herpes simple 1	FAM	US4
Virus Herpes simple 2	ROX	US6
Virus Varicela-Zóster	Cy5	ORF29
Control Interno	HEX*	-

Tabla A2. 2 Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A 2.2. Reactivos suministrados

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "liofilizado" se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Reaction-Mix tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3 Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ196T.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A 2.3. Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

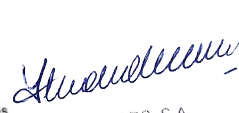
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 μL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ o $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo para verificar la funcionalidad de la mezcla de reacción y la ausencia de inhibidores de PCR.

- 1) Añadir la mezcla de reacción rehidratada al número de pocillos necesarios.

Añadir 15 μL de mezcla de reacción rehidratada (vial blanco) en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μL de DNA extraído de cada muestra, de *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial violeta) y cerrar los tubos con los tapones, o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o los tubos en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador a usar para conocer el formato del tubo a utilizar.

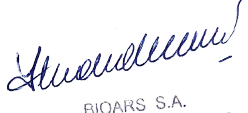
- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHS-1), ROX (VHS-2), Cy5 (VVZ) y HEX (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).



 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 3

OPEN FORMAT Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ101LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ101HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ106LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ106HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HHZ112LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HHZ112HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HHZ113LE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HHZ113HE
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ101E
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ136E
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HHZ172E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

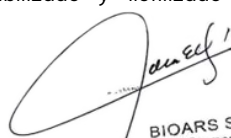
VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que debe añadirse antes del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

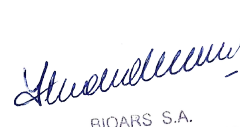
Diana	Canal	Gen
Virus Herpes simple 1	FAM	US4
Virus Herpes simple 2	ROX	US6
Virus Varicela-Zóster	Cy5	ORF29
Control de Extracción	HEX*	-

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “lío-filizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A3.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> 8-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ101LE, VS-HHZ101HE, VS-HHZ106LE, VS-HHZ106HE, VS-HHZ112LE y VS-HHZ112HE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> 96-well plate	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	1 placa
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ113LE y VS-HHZ113HE.

* Para el componente En formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 4-well strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	±13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2x10 ⁴ copias/μL*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strip	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	-	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ101E, VS-HHZ136E y VS-HHZ172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 μL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

A3.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo.

Tener en cuenta: En caso de que el número de reacciones requeridas/necesitadas sea menor que el suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recortar cuidadosamente los pocillos necesarios y guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retirar el sello protector de aluminio de las placas o tiras necesarias para el ensayo.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras o placa en el termociclador. Tenga en cuenta las características técnicas del termociclador a usar para conocer el formato del tubo a utilizar.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



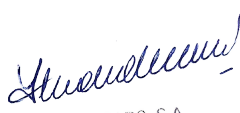
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHS-1), ROX (VHS-2), Cy5 (VVZ) y HEX (Control de Extracción). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HHZ196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado¹. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que debe añadirse antes del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Herpes simple 1	FAM	US4
Virus Herpes simple 2	ROX	US6
Virus Varicela-Zóster	Cy5	ORF29
Control de Extracción	HEX*	-

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

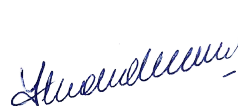
*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

¹ Tenga en cuenta que los términos “estabilizado” y “liofilizado” se emplean indistintamente, y como sinónimos, durante todo el documento


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevès
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÈS
DIRECTOR TÉCNICO

Reactivo/Material	Descripción	Rango de Concentración	Color	Cantidad
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Reaction-Mix tube	Lioprotectores y estabilizadores	± 6 g/100 mL*	Blanco (Opaco)	4 viales
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	± 1 mM*		
	Primers y sondas	0,2-1 nMol/ μ L*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer	Mezcla de solución salina	± 13 mM	Azul	1 vial x 1,8 mL
	Tampon (TRIS, pH)	± 67 mM		
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado ¹ no infeccioso	$1,9 \times 10^4$ copias/ μ L*	Rojos	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	2×10^4 copias/ μ L*	Verde	1 vial
Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HHZ196TE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

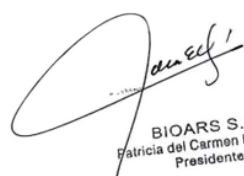
Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 μ L del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 μ L de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 4°C±2°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Varicella Zoster Virus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de Certest www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VHS-1), ROX (VHS-2), Cy5 (VVZ) y HEX (Control de Extracción). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

Bibliografía

- Cole, S. (2020). Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nursing Clinics of North America*, 55(3), 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.05.004>
- Gershon, A. A., Breuer, J., Cohen, J. I., Cohrs, R. J., Gershon, M. D., Gilden, D., Grose, C., Hambleton, S., Kennedy, P. G. E., Oxman, M. N., Seward, J. F., & Yamanishi, K. (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.16>
- Gilden, D., Cohrs J., R., Mahalingam, R., & Nagel, M. A. (2010). Neurological Disease Produced by Varicella Zoster Virus Reactivation Without Rash. *Curr Top Microbiol Immunol*, 342, 243–253. https://doi.org/10.1007/82_2009_3
- Kennedy, P. G. E., & Gershon, A. A. (2018). Clinical features of varicella-zoster virus infection. *Viruses*, 10(609). <https://doi.org/10.3390/v10110609>
- Minaya, M. A., Jensen, T. L., Goll, J. B., Korom, M., Datla, S. H., Belshe, R. B., & Morrison, L. A. (2017). Molecular Evolution of Herpes Simplex Virus 2 Complete Genomes: Comparison between Primary and Recurrent Infections. *American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
- Saleh, H., & Kumar, S. (2025). Varicella-Zoster Virus (Chickenpox). In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448191/>
- WHO. (2023). *Herpes Simplex Virus*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
- Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>


 BIOARS S.A.
 Patricia del Carmen Etchevés
 Presidente


 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 Producto para diagnóstico *in vitro*

 Almacenar en lugar seco

 Fecha de caducidad

 Fabricante

 Número de lote

 Consultar las instrucciones de uso

 Limitación de temperatura

 Contiene <n> test

 Identificación única de dispositivo

 Número de referencia

 Marcado CE

 Mantener fuera de la luz del sol

Marcas registradas

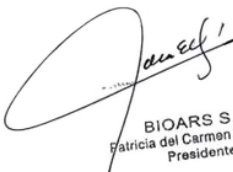
Derechos de modificación reservados. Todos los derechos reservados. © Certest Biotec, S.L.

Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

Control de Cambios		
Versión nº	Cambios	Fecha
00	Versión Original Esta versión es una traducción del documento en inglés: IUo-HHZen0925.00	18/08/2025

Tabla A 5. Tabla de Control de Cambios.

Revisión: 18 agosto 2025.


BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

VIASURE

by **certest**



BIOARS S.A.
Patricia del Carmen Etchevés
Presidente



BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO



 **Certest Biotec, S.L.**
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

 **(+34) 976 520 354**

 **viasure@certest.es**

 **www.certest.es**

certest

F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.

PROYECTO DE ROTULOS EXTERNOS

Nombre del producto:

A. VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

I. 1. Perfil bajo

I. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, Low Profile CE 2797 IVD 48 Σ 2°C 40°C certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV106L LOT HHVXXXXXX yyyy-mm 6 x HHV 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 6 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440208761 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV106L v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV106L VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHV106L HHVXXXXXX DD.MM.AAAA
---	---

I. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, Low Profile CE 2797 IVD 96 Σ 2°C 40°C certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV112L LOT HHVXXXXXX yyyy-mm 12 x HHV 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440208785 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV112L v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV112L VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHV112L HHVXXXXXX DD.MM.AAAA
---	---

I. 1. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, Low Profile CE 2797 IVD 96 Σ 2°C 40°C certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV113L LOT HHVXXXXXX yyyy-mm 1 x HHV 96-well plate 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440208808 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV113L v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV113L VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHV113L HHVXXXXXX DD.MM.AAAA
--	---

I. 2. Perfil alto

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

I. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos	Sobre-Rótulo
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile        certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV106H LOT HHVXXXXXX yyyy-mm   6 x HHV 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 6 x Tear-off 8-cap strips (01)08435440208778 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit  CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV106H v.01	 Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV106H VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)  VS.HHV106H HHVXXXXXX DD.MM.AAAA
I. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos	Sobre-Rótulo
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile        certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV112H LOT HHVXXXXXX yyyy-mm   12 x HHV 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips (01)08435440208792 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit  CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV112H v.01	 Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV112H VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)  VS.HHV112H HHVXXXXXX DD.MM.AAAA
I. 2. c. Placa de 96 pocillos	Sobre-Rótulo
VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile        certest.es/ viasure/labeling REF VS-HHV113H LOT HHVXXXXXX yyyy-mm   1 x HHV 96-well plate 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips (01)08435440208815 (17)991231 (10)HHVXXXXXX VIASURE <i>Human Herpes Virus 6, 7 & 8</i> Real Time PCR Detection Kit  CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV113H v.01	 Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHV113H VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)  VS.HHV113H HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

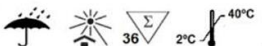
Claudia Etchevés

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

I. 3. a. 9 tiras de 4 pocillos	Sobre-Rótulo
--------------------------------	--------------

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling
REF VS-HHV136 LOT HHVXXXXXX yyyy-mm

9 x HHV 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
9 x Tear-off 4-cap strips



UDI

(01)08435440211976
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV136 v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV136 VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

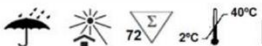


VS.HHV136 HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

I. 2. b. 18 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling
REF VS-HHV172 LOT HHVXXXXXX yyyy-mm

18 x HHV 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips



UDI

(01)08435440211983
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV172 v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV172 VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



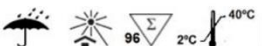
VS.HHV172 HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

I.4. Tubos con mezcla de reacción

I. 4. a. 4 tubos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling
REF VS-HHV196T LOT HHVXXXXXX yyyy-mm

4 x HHV Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)



UDI

(01)08435440215363
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV196T v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV196T VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV196T HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

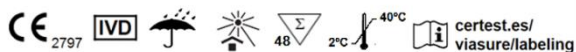
II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

II. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile



REF VS-HHV106LE

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

6 x 1HHV 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1.8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440228899
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV106LE v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV106LE VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

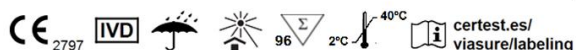


VS.HHV106LE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile



REF VS-HHV112LE

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

12 x 1HHV 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1.8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440228905
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV112LE v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV112LE VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

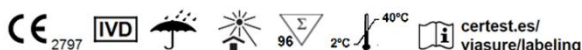


VS.HHV112LE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 1. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile



REF VS-HHV113LE

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

1 x 1HHV 96-well plate
1 x Rehydration Buffer (1.8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440228912
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV113LE v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV113LE VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV113LE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia E. Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

II. 2. Perfil alto

II. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



6 x 1HHV 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440213413
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV106HE v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV106HE VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV106HE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



12 x 1HHV 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440228875
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV112HE v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV112HE VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV112HE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 2. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



1 x 1HHV 96-well plate
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



(01)08435440228882
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

VS-HHV113HE v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV113HE VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV113HE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

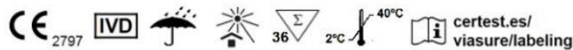
Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

II. 3. a. 9 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene



REF VS-HHV136E

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

9 x 1HHV 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
9 x Tear-off 4-cap strips



UDI

(01)08435440228936
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV136E v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV136E VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

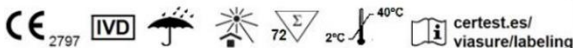


VS.HHV136E HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 2. b. 18 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene



REF VS-HHV172E

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

18 x 1HHV 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips



UDI

(01)08435440228943
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV172E v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV172E VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



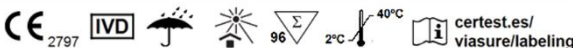
VS.HHV172E HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

II.4. Tubos con mezcla de reacción

II. 4. a. 4 tubos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8*
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format



REF VS-HHV196TE

LOT HHVXXXXXX

yyyy-mm

4 x 1HHV Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)



UDI

(01)08435440228929
(17)991231
(10)HHVXXXXXX

VIASURE *Human Herpes Virus 6, 7 & 8* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHV196TE v.01



Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHV196TE VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8
Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHV196TE HHVXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

B. VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

I. 1. Perfil bajo

I. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ106L LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

6 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

UDI

(01)08435440208709
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ106L v.01

Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

**VS-HHZ106L VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

VS.HHZ106L HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

I. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ112L LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

12 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

UDI

(01)08435440208723
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ112L v.01

Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

**VS-HHZ112L VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

VS.HHZ112L HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

I. 1. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ113L LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

1 x HHZ 96-well plate
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

UDI

(01)08435440208747
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ113L v.01

Importador: **BIOARS S.A.** Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

**VS-HHZ113L VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

VS.HHZ113L HHZXXXXXX DD.MM.AAAA


BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

I. 2. Perfil alto

I. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



REF VS-HHZ106H **LOT** HHZXXXXXX **yyyymm**

6 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440208716
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ106H v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHZ106H VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHZ106H HHZ106H.xxx DD.MM.AAAA

I. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



REF VS-HHZ112H **LOT** HHZXXXXXX **yyyymm**

12 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440208730
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ112H v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHZ112H VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHZ112H HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

I. 2. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, High Profile



REF VS-HHZ113H **LOT** HHZXXXXXX **yyyymm**

1 x HHZ 96-well plate
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips



UDI

(01)08435440208754
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ113H v.01



Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.

C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601

www.bioars.com.ar

VS-HHZ113H VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428

Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)



VS.HHZ113H HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

I. 3. a. 9 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ136 LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

9 x HHZ 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
9 x Tear-off 4-cap strips

UDI

(01)08435440211952
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ136 v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ136 VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& **Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

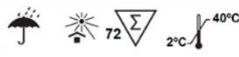
Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

VS.HHZ136 HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

I. 2. b. 18 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ172 LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

18 x HHZ 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips

UDI

(01)08435440211969
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ172 v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ172 VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& **Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

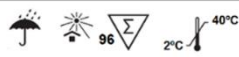
VS.HHZ172 HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

I.4. Tubos con mezcla de reacción

I. 4. a. 4 tubos

Sobre-Rótulo

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format

CE 2797 IVD  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ196T LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

4 x HHZ Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)

UDI

(01)08435440213369
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ196T v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ196T VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2
& **Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit**

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)

VS.HHZ196T HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

II. 1. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD   48  2°C  40°C  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ106LE LOT HHZXXXXXX  yyyy-mm

6 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
6 x Tear-off 8-cap strips

 UDI
(01)08435440212126
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ106LE v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ106LE VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ106LE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 1. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD   96  2°C  40°C  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ112LE LOT HHZXXXXXX  yyyy-mm

12 x HHZ 8-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

 UDI
(01)08435440212140
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ112LE v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ112LE VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ112LE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 1. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Low Profile

CE 2797 IVD   96  2°C  40°C  certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ113LE LOT HHZXXXXXX  yyyy-mm

1 x HHZ 96-well plate
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
12 x Tear-off 8-cap strips

 UDI
(01)08435440212164
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

CERTEST BIOTEC S.L Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ113LE v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ113LE VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ113LE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia E. Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

II. 2. Perfil alto

II. 2. a. 6 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile CE 2797 IVD 48 2°C 40°C certest.es/viasure/labeling REF VS-HHZ106HE LOT HHZXXXXXX yyyy-mm 6 x HHZ 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Extraction Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 6 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440212133 (17)991231 (10)HHZXXXXXX VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ106HE v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHZ106HE VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHZ106HE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA
---	---

II. 2. b. 12 tiras de 8 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile CE 2797 IVD 96 2°C 40°C certest.es/viasure/labeling REF VS-HHZ112HE LOT HHZXXXXXX yyyy-mm 12 x HHZ 8-well strips 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Extraction Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440212157 (17)991231 (10)HHZXXXXXX VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ112HE v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHZ112HE VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHZ112HE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA
---	---

II. 2. c. Placa de 96 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit, High Profile CE 2797 IVD 96 2°C 40°C certest.es/viasure/labeling REF VS-HHZ113HE LOT HHZXXXXXX yyyy-mm 1 x HHZ 96-well plate 1 x Rehydration Buffer (1,8 mL) 1 x Positive Control 1 x Extraction Control 1 x Negative Control (1 mL) 1 x Water RNase/DNase free (1 mL) 12 x Tear-off 8-cap strips UDI (01)08435440212171 (17)991231 (10)HHZXXXXXX VIASURE <i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Real Time PCR Detection Kit CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ113HE v.01	Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A. C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601 www.bioars.com.ar VS-HHZ113HE VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428 Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028) VS.HHZ113HE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA
--	---

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

II. 3. a. 9 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD   36  2°C   certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ136E LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

9 x HHZ 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
9 x Tear-off 4-cap strips

 UDI
(01)08435440228950
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ136E v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ136E VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ136E HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

II. 2. b. 18 tiras de 4 pocillos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Rotor-Gene

CE 2797 IVD   72  2°C   certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ172E LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

18 x HHZ 4-well strips
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)
18 x Tear-off 4-cap strips

 UDI
(01)08435440228967
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ172E v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ172E VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ172E HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

II.4. Tubos con mezcla de reacción

II. 4. a. 4 tubos

Sobre-Rótulo

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus*
Real Time PCR Detection Kit, Tube Format

CE 2797 IVD   96  2°C   certest.es/
viasure/labeling

REF VS-HHZ196TE LOT HHZXXXXXX yyyy-mm

4 x HHZ Reaction-Mix tubes
1 x Rehydration Buffer (1,8 mL)
1 x Positive Control
1 x Extraction Control
1 x Negative Control (1 mL)
1 x Water RNase/DNase free (1 mL)

 UDI
(01)08435440228974
(17)991231
(10)HHZXXXXXX

VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit
CERTEST BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) VS-HHZ196TE v.01

Importador: BIOARS S.A. Estomba 961 - C.A.B.A.
C.P.: C1427COU Tel.: (011) 4555 4601
www.bioars.com.ar

VS-HHZ196TE VIASURE *Herpes virus 1, Herpes virus 2*
& *Varicella Zoster Virus* Real Time PCR Detection Kit

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO
Autorizado por la A.N.M.A.T. - Certificado PM-1127-428
Directora Técnica: Dra. Claudia E. Etchevés (m.n. 7028)


VS.HHZ196TE HHZXXXXXX DD.MM.AAAA

Claudia Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVES
DIRECTOR TÉCNICO

PROYECTO DE ROTULOS INTERNOS

A. VIASURE Human Herpes Virus 6, 7 & 8 Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

I. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio

I. 2. Perfil alto

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio

I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio

I. 4. Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo

Claudia Etcheves
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
1HHV 8-well strip VS-1HHV1SL v.01 REF VS-1HHV1SL LOT 1HHV1SL-xxx yyyy-mm 2°C 40°C 8 CerFest Biotec, S.L. VIASURE	1HHV 96-well plate VS-1HHV1PL v.01 REF VS-1HHV1PL LOT 1HHV1PL-xxx yyyy-mm 2°C 40°C 96 CerFest Biotec, S.L. VIASURE

II. 2. Perfil alto

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
1HHV 8-well strip VS-1HHV1SH v.01 REF VS-1HHV1SH LOT 1HHV1SH-xxx yyyy-mm 2°C 40°C 8 CerFest Biotec, S.L. VIASURE	1HHV 96-well plate VS-1HHV1PH v.01 REF VS-1HHV1PH LOT 1HHV1PH-xxx yyyy-mm 2°C 40°C 96 CerFest Biotec, S.L. VIASURE

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio
1HHV 4-well strip VS-1HHV1RG v.01 REF VS-1HHV1RG LOT 1HHV1RG-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 36 CerFest Biotec, S.L. VIASURE

II. 4. Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo
1HHV Reaction-Mix Tube VS-1HHV1TB_P v.01 REF VS-1HHV1TB LOT 1HHV1TB-xxx yyyy-mm 2°C 40°C 1 CerFest Biotec, S.L. VIASURE	1HHV Reaction-Mix tube VS-1HHV1TB v.01 REF VS-1HHV1TB LOT 1HHV1TB-xxx yyyy-mm 24 2°C 40°C CERTEST BIOTEC S.L.

III. Control positivo

Control positivo – Sobre de aluminio	Control positivo - Tubo
HHV Positive Control VS-HHV1C_P v.01 REF VS-HHV1C LOT HHV1C-xxx yyyy-mm CONTROL + 2°C 40°C 80 CerFest Biotec, S.L. VIASURE	HHV Positive Control VS-HHV1C v.01 REF VS-HHV1C LOT HHV1C-xxx yyyy-mm CONTROL + 80 2°C 40°C CERTEST BIOTEC S.L.

Handwritten signature

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

B. VIASURE Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Real Time PCR Detection Kit

I. Sin control de extracción

I. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 8-well strip VS-HHZ1SL v.01 REF VS-HHZ1SL LOT HHZ1SL-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 8 CerTest Biotec, S.L. VIASURE	<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 96-well plate VS-HHZ1PL v.01 REF VS-HHZ1PL LOT HHZ1PL-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 96 CerTest Biotec, S.L. VIASURE

I. 2. Perfil alto

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 8-well strip VS-HHZ1SH v.01 REF VS-HHZ1SH LOT HHZ1SH-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 8 CerTest Biotec, S.L. VIASURE	<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 96-well plate VS-HHZ1PH v.01 REF VS-HHZ1PH LOT HHZ1PH-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 96 CerTest Biotec, S.L. VIASURE

I. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> 4-well strip VS-HHZ1RG v.01 REF VS-HHZ1RG LOT HHZ1RG-XXX yyyy-mm 2°C 40°C 36 CerTest Biotec, S.L. VIASURE

I. 4. Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo
<i>Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus</i> Reaction-Mix tube VS-HHZ1TB v.01 REF VS-HHZ1TB LOT HHZ1TB-xxx yyyy-mm 1 CerTest Biotec, S.L. VIASURE	HHZ Reaction-Mix tube VS-HHZ1TB v.01 REF VS-HHZ1TB LOT HHZ1TB-xxx yyyy-mm 24 40°C

Handwritten signature
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVEZ
DIRECTOR TÉCNICO

II. Con control de extracción

II. 1. Perfil bajo

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus 8-well strip REF VS-1HHZ1SL LOT 1HHZ1SL-XXX yyyy-mm 20°C 40°C 8 CerTest Biotech, S.L. VIASURE	Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus 96-well plate REF VS-1HHZ1PL LOT 1HHZ1PL-XXX yyyy-mm 20°C 40°C 96 CerTest Biotech, S.L. VIASURE

II. 2. Perfil alto

Tira de pocillos – Sobre de aluminio	Placa – Sobre de aluminio
Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus 8-well strip REF VS-1HHZ1SH LOT 1HHZ1SH-XXX yyyy-mm 20°C 40°C 8 CerTest Biotech, S.L. VIASURE	Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus 96-well plate REF VS-1HHZ1PH LOT 1HHZ1PH-XXX yyyy-mm 20°C 40°C 96 CerTest Biotech, S.L. VIASURE

II. 3. Perfil para instrumentos Rotor-Gene

Tira de pocillos – Sobre de aluminio
Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus 4-well strip REF VS-1HHZ1RG LOT 1HHZ1RG-XXX yyyy-mm 20°C 40°C 36 CerTest Biotech, S.L. VIASURE

II. 4. Tubo de reacción

Tubo de reacción – Sobre de aluminio	Tubo de reacción - Tubo
Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Reaction-Mix tube REF VS-1HHZ1TB LOT 1HHZ1TB-xxx yyyy-mm 20°C 40°C 1 CerTest Biotech, S.L. VIASURE	HHZ Reaction-Mix tube REF VS-1HHZ1TB LOT 1HHZ1TB-xxx yyyy-mm 20°C 40°C 24 VS-1HHZ1TB, V v.01

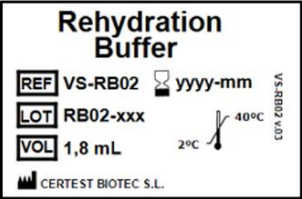
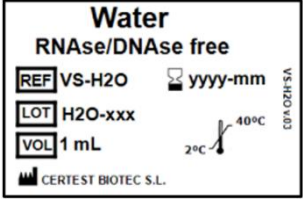
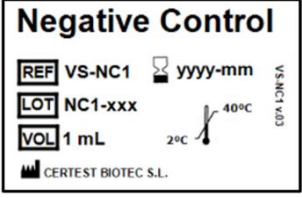
III. Control positivo

Control positivo – Sobre de aluminio	Control positivo - Tubo
Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Varicella Zoster Virus Positive Control REF VS-HHZ1C LOT HHZ1C-xxx yyyy-mm CAUTION Do not open in pre-PCR environment 20°C 40°C 80 CerTest Biotech, S.L. VIASURE	HHZ Positive Control REF VS-HHZ1C LOT HHZ1C-xxx yyyy-mm 20°C 40°C 80 VS-HHZ1C, V v.01 HHZ Positive Control REF VS-HHZ1C LOT HHZ1C-xxx yyyy-mm 20°C 40°C 80 VS-HHZ1C, V v.01

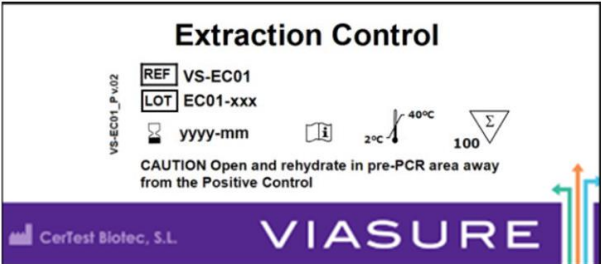
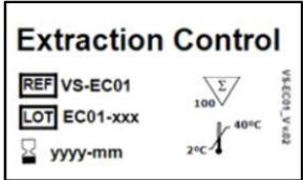
Handwritten signature

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

III. Componentes comunes a todas las presentaciones en todos los productos

Tampón de rehidratación - Tubo		Agua libre de RNAasa/DNAasa - Tubo	
 Rehydration Buffer REF VS-RB02 LOT RB02-xxx VOL 1,8 mL CERTEST BIOTEC S.L.		 Water RNAse/DNAse free REF VS-H2O LOT H2O-xxx VOL 1 mL CERTEST BIOTEC S.L.	
Control negativo - Tubo			
 Negative Control REF VS-NC1 LOT NC1-xxx VOL 1 mL CERTEST BIOTEC S.L.			

IV. Componente Control de extracción (incluido solo en las presentaciones mencionadas en II, “con control de extracción”, de todos los productos)

Control de extracción – Sobre de aluminio		Control de extracción - Tubo	
 Extraction Control REF VS-EC01 LOT EC01-xxx VOL yyyy-mm CAUTION Open and rehydrate in pre-PCR area away from the Positive Control CerTest Biotec, S.L. VIASURE		 Extraction Control REF VS-EC01 LOT EC01-xxx VOL yyyy-mm	

Claudia Etcheves
 BIOARS S.A.
 BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
 DIRECTOR TECNICO



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Año de la Grandeza Argentina

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Rótulo y Manual de instrucciones 59035

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 165 pagina/s.