

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

04/2019 ES

RealStar®

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CE

IVD

REF

164013

Σ

96

📖

04 2019

🏭

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	6
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5.	Información general.....	8
6.	Descripción del producto.....	8
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
7.	Advertencias y precauciones	10
8.	Procedimiento	12
8.1	Preparación de las muestras	12
8.2	Configuración de Master Mix	13
8.3	Configuración de reacción	15
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	16
9.1	Configuración.....	16
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	16
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	17
10.	Análisis de datos.....	17
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	18
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.2	Interpretación de los resultados	19
10.2.1	Análisis cualitativo.....	19
11.	Evaluación de rendimiento	20

11.1	Sensibilidad analítica	20
11.2	Especificidad analítica.....	22
11.3	Exactitud	23
12.	Limitaciones	24
13.	Control de calidad.....	26
14.	Asistencia técnica.....	26
15.	Bibliografía	26
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	27
17.	Explicación de los símbolos	28

1. Uso indicado

El kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ARN específico de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe A (H1N1)pdm09.

2. Componentes del kit

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

3. Almacenamiento

- El RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de escritorio con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Bastoncillos adecuados para la toma de muestras
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA



Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

La gripe es una enfermedad infecciosa provocada por virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae* (virus de la gripe). Los virus de la gripe se caracterizan por el continuo cambio de sus antígenos superficiales principales hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (variación antigénica). Infectan a aves y mamíferos a través de aerosoles. Los virus de la gripe A y B humanos causan infecciones graves, fundamentalmente en el conducto respiratorio, siendo los síntomas principales la fiebre y la tos. En casos más graves, la gripe causa neumonía, que puede resultar mortal en particular para niños y ancianos.

NOTA



Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de pruebas basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo pueda provocar resultados de falsos negativos.

6. Descripción del producto

El kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ARN específico de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe A (H1N1)pdm09 (anteriormente designado como virus de la gripe A H1N1_{nv}).

La prueba incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real, utilizando una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de secuencias objetivo específicas y sondas objetivo específicas para la detección de ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Las sondas específicas para el ARN de gripe A se marcan con el fluoróforo FAM™, las sondas específicas para el ARN de gripe B se marcan con el fluoróforo Cy®5 y las sondas específicas para el ARN de gripe A (H1N1)pdm09 se marcan con el fluoróforo ROX™. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela del ARN específico de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de tres procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Master A y Master B contienen todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, transcriptasa inversa, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, amplificación con mediación de PCR y la detección de ARN específico de gripe A, ARN específico de gripe B, ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 y del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe lo siguiente en el producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Marcado correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y *procedimientos* de diagnóstico in vitro.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio.

- Utilice guantes protectores desechables sin polvo, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los mueva de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden realizarse pruebas a controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las leyes locales, estatales o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad haya vencido.
- Descarte muestras y residuos de productos conforme a las regulaciones locales de seguridad.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 .

La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento de todo el sistema de pruebas. Se recomienda garantizar que el sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Configuración de Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl de IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Configuración de reacción

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

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

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y al menos un control negativo por Master Mix y por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtítulos durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
gripe A específico ARN	gripe A	FAM™	(Ninguno)
gripe B específico ARN	gripe B	Cy®5	(Ninguno)
gripe A (H1N1)pdm09 específico ARN	gripe A (H1N1) pdm09	ROX™	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

► Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturaliza- ción	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección			
	FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™
Control positivo [gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09]	+	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección				Interpretación del resultado
FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+*	ARN específico de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09 detectado.
+	-	-	+*	ARN específico de gripe A detectado .
-	+	-	+*	ARN específico de gripe B detectado .
-	-	+	+	ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 detectado . ¹
+	-	+	+*	ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 detectado . ^{1,2}
-	-	-	+	No se ha detectado ARN específico de gripe A, ni de gripe B ni de gripe A (H1N1) pdm09. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09 virus.
-	-	-	-	RT-PCR Fallo de reactivo o inhibición. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección FAM™, Cy®5 ni ROX™. Una carga alta de ARN diana en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

¹ Debido a una sensibilidad diferente de los sistemas de detección para la gripe A (FAM) y para la diana de gripe A H1N1pdm09(ROX), en casos poco frecuentes las muestras débilmente positivas podrían mostrar una señal en el canal ROX pero no en el canal FAM.

² Las cepas (H1N1)pdm09 pertenecen al grupo del virus de la gripe A. En consecuencia, las muestras (H1N1)pdm09 positivas generan una señal positiva en los canales FAM™ y ROX™.

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se realizó utilizando ARN de virus de la gripe A H1N1 pdm09 (cepa A/ NY/02/2009), ARN de virus de la gripe A H3N2 (cepa Wisconsin/67/05) y ARN de virus de la gripe B (cepa Florida/04/06) cuantificados.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 o gripe A o gripe B que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de ARN de gripe A (H1N1)pdm09, ARN de gripe A y ARN de gripe B cuantificados.

Tabla 1: RT-PCR resultados utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de gripe A

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	23	96
1,000	24	18	75
0,316	24	12	50
0,100	24	2	8
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tabla 2: RT-PCR resultados utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de gripe B

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	88
0,100	24	13	54
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tabla 3: RT-PCR resultados utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	8	33
0,032	24	2	8
0,010	24	2	8
0,003	24	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN específico de gripe A, la sensibilidad analítica es de 2,88 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 1,70-6,55 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico de gripe B, la sensibilidad analítica es de 0,39 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,26-0,81 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico del virus gripe A (H1N1)pdm09, la sensibilidad analítica es de 0,87 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,51-1,97 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se asegura mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se verificaron mediante análisis de comparación de secuencias frente a las secuencias disponibles públicamente con el fin de asegurar la detección de todos los genotipos relevantes de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1) pdm09.

La especificidad analítica del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de patógenos relacionados con Plasmodium y otros patógenos que es probable que estén presentes en la misma matriz de la muestra o que causen síntomas similares a los del virus de la gripe.

El RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Enterovirus (Coxsackie)
- Adenovirus humano
- Metapneumovirus humano
- Virus de la parainfluenza humana
- Virus respiratorio sincitial humano A
- Rinovirus
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*

- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Exactitud

La precisión para el RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basándose en los valores del ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos **seis** replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 4: Datos de precisión para la detección de ARN específico de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09

gripe A, gripe B y gripe A (H1N1) pdm09		Ciclo de umbral medio (C_t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	gripe A	30,44	0,18	0,60
	gripe B	33,59	0,19	0,57
	gripe A (H1N1) pdm09	32,30	0,07	0,22
Variabilidad intertest	gripe A	30,45	0,13	0,42
	gripe B	33,82	0,28	0,83
	gripe A (H1N1) pdm09	32,14	0,10	0,31

gripe A, gripe B y gripe A (H1N1) pdm09		Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad interlote	gripe A	30,31	0,17	0,57
	gripe B	34,61	0,60	1,74
	gripe A (H1N1) pdm09	32,09	0,08	0,24
Variabilidad total	gripe A	30,35	0,18	0,59
	gripe B	34,27	0,70	2,04
	gripe A (H1N1) pdm09	32,13	0,09	0,28

Tabla 5: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	29,15	0,06	0,19
Variabilidad intertest	29,09	0,08	0,28
Variabilidad interlote	29,09	0,08	0,28
Variabilidad total	29,11	0,08	0,27

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta prueba de valoración tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y

las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.

- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta prueba de valoración no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración .
- La presencia de inhibidores de RT-PCR (p. ej., heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de gripe A, gripe B o gripe A (H1N1)pdm09 cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Algunas cepas raras del virus de la gripe B (como la cepa Lee o sus recombinaciones) portan una mutación específica y por este motivo se detectan con una sensibilidad ligeramente más baja si se compara con las cepas del virus de la gripe B, que no portan esta mutación.
- La cepa de gripe A/Parana/720/2015 (H1N2v) se tipificará como gripe AH1N1_{nv}, ya que contiene la misma secuencia objetivo de genes matriz.

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

E-mail: **support@altona-diagnostics.com**

Teléfono: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10.^a edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

16. Marcas comerciales y aviso legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIA Symphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia de Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© altona Diagnostics GmbH 2019; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

