

## **Instrucciones de uso**

# **RealStar<sup>®</sup> Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0**

02/2021 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)



164013



96



02 2021



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

## Contenido

<b>1.</b>	<b>Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Almacenamiento .....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Información general.....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descripción del producto.....</b>	<b>9</b>
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	11
<b>7.</b>	<b>Advertencias y precauciones .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimiento .....</b>	<b>14</b>
8.1	Preparación de las muestras .....	14
8.2	Preparación del Master Mix .....	15
8.3	Preparación de la reacción .....	17
<b>9.</b>	<b>Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>18</b>
9.1	Configuración.....	18
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	19
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	19
<b>10.</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>20</b>
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	21
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.2	Interpretación de los resultados .....	22
10.2.1	Análisis cualitativo.....	22
<b>11.</b>	<b>Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>23</b>

11.1	Sensibilidad analítica .....	23
11.2	Especificidad analítica.....	25
11.3	Exactitud .....	26
<b>12.</b>	<b>Limitaciones .....</b>	<b>28</b>
<b>13.</b>	<b>Control de calidad.....</b>	<b>29</b>
<b>14.</b>	<b>Asistencia técnica.....</b>	<b>29</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>29</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas comerciales y aviso legal.....</b>	<b>30</b>
<b>17.</b>	<b>Explicación de los símbolos .....</b>	<b>31</b>

## 1. Uso indicado

El kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado 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 de la 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

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

### 3. Almacenamiento

- El kit 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 (consulte el 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

**i**

***Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de análisis 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 un test diagnóstico *in vitro* basado 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<sub>nv</sub>).

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo (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 utiliza la transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias diana específicas y sondas específicas para la detección del ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captore de fluorescencia (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 Cy5 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 conectadas 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 de PCR en tiempo real.

El test 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)

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN-polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediada por PCR y la detección de ARN específico de gripe A, ARN específico de gripe B, ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09 y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

### 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos de 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 detenidamente las instrucciones de uso antes de usar el producto.*

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes en cuanto a:
  - Integridad
  - Si el número, el tipo y el relleno están completos (consulte el capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetado correcto
  - Si ha llegado congelado
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras siempre se deben tratar como infecciosas y/o con peligro biológico de conformidad con los procedimientos de laboratorio seguros.
- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasa (ADNasa/ARNasa) de las muestras y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Lleve siempre guantes protectores desechables sin polvo al manipular componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de forma unidireccional. Lleve siempre guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de entrar en una zona diferente.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de todos los demás componentes del kit.

- No abra las placas o los tubos de reacción después de la amplificación para evitar la contaminación con amplicones.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto no degradará el ácido nucleico amplificado y se corre el riesgo de contaminar la zona de laboratorio.
- No use componentes del kit cuya fecha de caducidad haya expirado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

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

La calidad del ARN afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología 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 ser apropiados otros sistemas y kits 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 se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aprox. 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando un nuevo tubo colector, 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 Preparación del 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 kit 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, prepare 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
<b>Master Mix de volumen</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ 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 del 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
<b>Master Mix de volumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>



**PRECAUCIÓN**

*Si se añadió el IC 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 Preparación de la reacción**

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ 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
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ 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 el 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 microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~3 000 rpm).

## 9. Programación de los 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 de 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 del detector	Reporter	Quencher
ARN específico de gripe A	gripe A	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de gripe B	gripe B	Cy5	(Ninguno)
ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09	gripe A (H1N1)pdm09	ROX™	(Ninguno)
Internal Control (control interno) (IC)	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 ciclos	Adquisición	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 kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 en diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

## 10.1 Validez de las series de tests diagnósticos

### 10.1.1 Serie válida de tests diagnósticos (cualitativa)

Una serie de tests diagnósticos **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

ID de control	Canal de detección			
	FAM™	Cy5	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 tests.

### 10.1.2 Serie no válida de tests diagnósticos (cualitativa)

Una serie de tests diagnósticos **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 tests diagnósticos **válida**.

En caso de una serie de tests diagnósticos **no válida**, repita los tests 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™	Cy5	ROX™	JOE™	
+	+	+	+	Se ha detectado ARN específico de gripe A, gripe B y gripe A (H1N1)pdm09.
+	-	-	+	Se ha detectado ARN específico de gripe A.
-	+	-	+	Se ha detectado ARN específico de gripe B.
-	-	+	+	Se ha detectado ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09. <sup>1</sup>
+	-	+	+	Se ha detectado ARN específico de gripe A (H1N1)pdm09. <sup>1,2</sup>
-	-	-	+	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.
-	-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

\* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en los canales de detección de FAM™, Cy5 o ROX™. Una elevada carga objetivo de ARN en la muestra puede dar lugar a una señal reducida o ausente del Internal Control (control interno).

<sup>1</sup> Debido a la sensibilidad diferente de los sistemas de detección para el objetivo de la gripe A (FAM™) y la gripe A (H1N1)pdm09 (ROX™), en raros casos las muestras con positivo débil pueden presentar una señal en el canal ROX™ pero no en el canal FAM™.

<sup>2</sup> Las cepas de (H1N1)pdm09 pertenecen al grupo del virus de la gripe A. Por tanto, las muestras positivas en (H1N1)pdm09 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 cuantificado 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).

### 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se define como la concentración (copias/ $\mu$ l 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:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ARN específico de gripe A

Conc. entrada [copias/ $\mu$ l]	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:** Resultados de RT-PCR 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:** Resultados de RT-PCR 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 kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se determinó mediante análisis de probit:

- Para la detección de ARN específico de gripe A, la sensibilidad analítica es 2,88 copias/μl [intervalo de confianza (CI) del 95 %: 1,70-6,55 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico de gripe B, la sensibilidad analítica es 0,39 copias/μl [intervalo de confianza (CI) del 95 %: 0,26-0,81 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico del virus gripe A (H1N1)pdm09, la sensibilidad analítica es 0,87 copias/μl [intervalo de confianza (CI) del 95 %: 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 que es probable que estén presentes en la misma matriz de muestra o que causan síntomas similares a los virus de la gripe.

El kit 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*
- *Chlamydophila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

### 11.3 Exactitud

La precisión del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basados en valores de ciclo umbral ( $C_t$ ). Se analizaron al menos **seis** replicados por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo 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 umbral promedio (C <sub>t</sub> )	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 interensayo	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
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 umbral promedio (C <sub>t</sub> )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	29,15	0,06	0,19
Variabilidad interensayo	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 limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo 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 este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de RT-PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del gripe A, gripe B o del genoma de gripe A (H1N1)pdm09 cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una o fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier test diagnóstico, los resultados del kit RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Algunas cepas del virus de la gripe porcina, como la gripe A/Parana/720/2015 (H1N2v) y la G4 EA H1N1 se tipificarán como gripe A (H1N1)pdm09, puesto que contienen 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 kit 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:

**email:** [support@altona-diagnostics.com](mailto: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.<sup>a</sup> 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); ATCC® (American Type Culture Collection); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); SmartCycler® (Cepheid); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); MinElute®, QIAamp®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados 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 no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2021 Altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

## 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» tests/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

**Notas:**



**Notas:**

**Notas:**



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

