

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

01/2017 ES

RealStar®

Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0

Para utilizar con

m2000rt (Abbott Diagnostics)

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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



163013



96



01 2017



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

MAN-163010-ES-S01

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.....	9
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
6.2 Cebadores y sondas	11
7. Advertencias y precauciones	12
8. Procedimiento	13
8.1 Preparación de las muestras	13
8.2 Preparación de la Master Mix	15
8.3 Preparación de la reacción	16
9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....	17
9.1 Configuración	17
9.2 Detectores de fluorescencia	18
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	18
10. Análisis de datos.....	19
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas	19
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas	19
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas	20
10.2 Interpretación de los resultados	20
10.2.1 Análisis cualitativo.....	20

11. Evaluación de rendimiento	22
11.1 Sensibilidad analítica	22
11.1.1 Análisis Probit	22
11.2 Especificidad analítica.....	23
11.2.1 Cepas de la gripe	23
11.2.2 Sensibilidad clínica.....	26
12. Limitaciones	27
13. Control de calidad.....	28
14. Servicio técnico.....	28
15. Bibliografía	28
16. Marcas comerciales e información legal	29
17. Explicación de los símbolos	30

1. Uso indicado

El RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y diferenciación del ARN específico de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe A H1N1_{nv}.

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen[μl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	120
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control H1N1nv	1	250
Naranja	Positive Control Influenza A	1	250
Amarillo	Positive Control Influenza B	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben 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 alta 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 del producto. 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
- Centrífuga de mesa 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 filtro (desechables)
- Bastoncillos adecuados para la toma de muestras
- Guantes sin talco (desechables)

NOTA

i

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

i

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 (también conocida como influenza) es una enfermedad infecciosa causada por un virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae* (virus gripales). Los virus gripales se caracterizan por el cambio constante de la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) de sus principales antígenos superficiales (deriva antigénica). Infectan a aves y mamíferos por vía aérea. Los virus gripales A y B provocan varias infecciones graves, predominantemente del tracto respiratorio, con fiebre y tos como síntomas más frecuentes. En casos más graves, la gripe provoca neumonía, que puede resultar mortal, particularmente en niños y personas mayores.

En abril de 2009, evolucionó una nueva cepa gripal que combinaba genes de cepas humanas, porcinas y aviarias. Surgió en México, Estados Unidos y otros países de todo el mundo, y se conoció, inicialmente, como “gripe porcina”. Actualmente, estas cepas se denominan cepas de gripe A H1N1_{nv}.

Los conjuntos de cebadores/sondas utilizados en el RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 para la detección de cepas estacionales de gripe humana A y gripe humana B se basan en el gen de las proteínas matriz del genoma de la gripe como región objetivo.

El conjunto de cebadores/sondas para la detección de las cepas de gripe A H1N1_{nv} se basa en una alineación múltiple de todas las cepas de gripe porcina conocidas, en combinación con todas las secuencias conocidas de los «nuevos» aislados H1N1 pandémicos.

NOTA



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 RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y diferenciación del ARN específico de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe A H1N1_{nv}. 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 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 detectar el ADN amplificado. Las sondas están marcadas con fluorocromos (reporter) y captos de fluorescencia (quencher)

Las sondas específicas para ARN de gripe A están marcadas con un fluorocromo que muestra similares características de Cy[®]5, las sondas específicas para el ARN de gripe B se marcan con un fluoróforo ROX™ y las sondas específicas para el ARN de gripe A H1N1_{nv} están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el Control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ARN específico del gripe A, gripe B y gripe A H1N1_{nv}, así como del Control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de tres procesos en un solo tubo:

- Transcripción inversa del ARN diana y del 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 RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Tres Controles positivos:
 - Control positivo gripe A
 - Control positivo gripe B
 - Control positivo gripe A H1N1_{nv}
- Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediante la PCR y la detección del ARN específico de gripe A, el ARN específico de gripe B, el ARN específico de gripe A H1N1_{nv}, y el Control interno en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Cebadores y sondas

Los cebadores y las sondas para cepas de gripe A y H1N1_{nv} humana estacional utilizados en el Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 de RealStar® fueron diseñados por el Prof. Dr. Christian Drosten, del Instituto de virología de la Universidad de Bonn, Alemania. Las secuencias de estos cebadores y sondas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Cebador y sondas utilizados para la amplificación y la detección específicos de cepas de gripe A y H1N1_{nv}

Objetivo	Secuencia 5'- 3'	Oligo
Matriz	AGAGACTTGAAGATGTATTTGCTGGGAAGAT	Sonda 1
Matriz	TCCTGCAAAGACACTTTCCAGT	Sonda 2
Matriz	CAGGCCCCCTCAAAGC	Cebador 1
Matriz	CGTCAGGCCTCCTCAAAGC	Cebador 2
Matriz	ATTCCATGAGAGCCTCAAGATC	Sonda 3

Los cebadores y las sondas fijan como objetivo la misma región dentro del gen matriz de gripe A y H1N1_{nv}. Pero las sondas marcadas de forma diferente compiten entre sí. En presencia de un ARN específico de gripe A, la sonda marcada con un fluoróforo que muestre características similares a Cy[®]5 se unirá, mientras que en presencia del ARN específico de gripe A H1N1_{nv}, la sonda FAM[™] marcada se unirá. Por tanto, a pesar del hecho de que la cepa de A H1N1_{nv} pertenezca al grupo de virus de la gripe A, también con las muestras positivas de gripe A H1N1_{nv} solo habrá una señal en el canal FAM[™], pero no en el canal Cy[®]5. Mientras que con las muestras positivas de gripe A estacional humana solo habrá una señal en el canal Cy[®]5, pero no en el canal FAM[™].

7. Advertencias y precauciones

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

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetaje correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto está 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 de seguridad en el laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNsas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de ADNAs/RNAsas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas 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 translade 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 utilizarse controles adicionales utilizando de acuerdo con las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después de la 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.
- Descarte muestras y residuos del test conforme a las regulaciones locales de seguridad.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material inicial para el RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

La calidad del ARN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento del test. Debe garantizarse que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico 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 RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya tampones 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.

Para lograr la sensibilidad más alta, el ARN debe eluirse utilizando 30 µl tampón de elución precalentada (~70 °C).

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones 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 de la PCR en tiempo real.



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 muestras, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

8.2 Preparación de la Master Mix

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

El RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 contiene un Control interno 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 Control interno como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de muestras, prepare la Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volumen de Master Mix	16 µl	192 µl

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra y tampón de lisis. El volumen del Control interno que debe añadirse dependerá siempre 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 tampón de elución o agua, deberán añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra/tampón de lisis.

- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	10 µl	120 µl
Volumen de Master Mix	15 µl	180 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación, al menos el control negativo debe incluir el Control interno.



Sin importar que método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el Control interno directamente a la muestra.

8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 15 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl del control (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	15 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	25 µl

- ▶ Asegúrese de que se utilicen cada control positivo y al menos uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras 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 lámina 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 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

Para obtener información básica sobre la preparación y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	25 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de gripe A	Gripe A	Cy [®] 5	(Ninguno)
ARN específico de gripe B	Gripe B	ROX™	(Ninguno)
ARN específico de gripe A H1N1 _{nv}	Gripe A H1N1 _{nv}	FAM™	(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	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	50	10:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
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 sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

Para que una serie de pruebas diagnósticas sea **válida**, deben cumplirse las siguientes condiciones de control:

Id. de control	Canal de detección			
	Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™
Control positivo gripe A	+	-	-	+/-*
Control positivo gripe B	-	+	-	+/-*
Control positivo gripe A H1N1 _{nv}	-	-	+	+/-*
Control negativo	-	-	-	+

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

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

Una serie de pruebas diagnósticas 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 que obtenga 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
Cy [®] 5	ROX™	FAM™	JOE™	
+	-	-	+*	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 _{nv} ^{1,2}
-	-	-	+	No se ha detectado ARN específico de gripe A, de gripe B ni de gripe A H1N1 _{nv} . La muestra no contiene cantidades detectables de estos ARN específicos.
-	-	-	-	Inhibición de la RT-PCR o fallo del reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Control interno en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección Cy[®]5, en el canal de detección ROX™ o en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ARN en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

¹ Las cepas de H1N1_{nv} pertenecen al grupo de virus de gripe A. Sin embargo, debido al diseño de El test, las muestras positivas en H1N1_{nv} generan una señal únicamente en el canal FAM™ pero no en el canal Cy[®]5.

² La cepa gripe A / Parana / 720/2015 (H1N2v) se tipificará como gripe A H1N1_{nv}, ya que contiene la misma secuencia de genes de la matriz.

NOTA



A pesar del hecho de que las cepas de gripe A H1N1_{nv} pertenezcan al grupo de virus de la gripe A, las muestras positivas de la gripe A H1N1_{nv} solo darán una señal en el canal FAM™, pero no en el canal Cy[®]5.

NOTA



Las muestras positivas de gripe A estacional humana darán una señal en el canal Cy[®]5, pero no en el canal FAM™.

Para obtener más detalles sobre la interpretación de los resultados, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

11. Evaluación de rendimiento

11.1 Sensibilidad analítica

Para evaluar la sensibilidad analítica, se utilizaron diluciones-décuplo seriadas de virus de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y A/H1N1_{nv} cuantificados en placas y virus de la gripe B cuantificados en FFU.

Tabla 2: Análisis de índice de éxito para diferentes cepas de virus de la gripe

PFU/ml	Gripe A/ H1N1 _{nv}	Gripe A/ H3N2	Gripe A/ H1N1	Gripe B*
10 ⁴	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ³	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ²	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ¹	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10 ⁰	+/-/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/-
10 ⁻¹	-/-/-/-	+/+/+/-	+/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻²	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
10 ⁻³	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-

* Unidades formadoras de focos (FFU, por sus siglas en inglés) en lugar de unidades formadoras de placas (PFU, por sus siglas en inglés).

11.1.1 Análisis Probit

- Gripe A/HK/1/68 (H3N2): 95 % de límite de detección (LD) 0,3 PFU/ml [95 % CI 0,2 - 0,7 PFU/ml]
- Gripe A/HH/09 (H1N1_{nv}): 95 % de límite de detección (LD) 0,7 PFU/ml [95 % CI 0,5 - 1,8 PFU/ml]
- Gripe A/Texas/91 (H1N1): 95 % de límite de detección (LD) 1,6 PFU/ml [95 % CI 1,1 - 3,8 PFU/ml]
- Gripe B/Brisbane/60/2008: 95 % de límite de detección (LD) 1,1 FFU/ml [95 % CI 0,5 - 1,8 FFU/ml]

11.2 Especificidad analítica

11.2.1 Cepas de la gripe

Cepa	Subtipo	Gripe A	Gripe B	H1N1 _{nv}	IC
Gripe A/Anhui/07/290	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Anhui/1/105	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Bangkok/1/79	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Bangkok/80/517	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Brasil/11/78	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Brasil/83/550	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Brisbane/08/100	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Brisbane/10/2007	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Brisbane/59/2007	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Inglaterra/427/88	H3N3	+	-	-	+
Gripe A/Inglaterra/88/654	H3N3	+	-	-	+
Gripe A/Equina/Kentucky/1/81	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Equina/Kentucky/85/520	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Equina/Miami/63	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Equina/Miami/87/510	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Equina/Newmarket/1/93	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Equina/ Newmarket/97/596	H3N8	+	-	-	+
Gripe A/Guizhou/54/89	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Guizhou/90/502	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Johannesburgo/33/94	H1N1	+	-	-	+

Cepa	Subtipo	Gripe A	Gripe B	H1N1 _{nv}	IC
Gripe A/Johannesburgo/95/516	H1N1	+	-	-	+
Gripe A/Filipinas/2/82	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Filipinas/94/516	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Shangdong/78/516	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Shangdong/9/93	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Turquía/07/112	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Turquía/1/2005	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Uruguay/08/278	H3N3	+	-	-	+
Gripe A/Uruguay/716/2007	H3N3	+	-	-	+
Gripe A/Vietnam/05/204	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Vietnam/119/04	H5N1	+	-	-	+
Gripe B/Ann Arbor/86/630		-	+	-	+
Gripe B/Florida/08/140		-	+	-	+
Gripe B/Florida/8/2006		-	+	-	+
Gripe B/Harbin/7/94		-	+	-	+
Gripe B/Harbin/97/748		-	+	-	+
Gripe B/Hong Kong/79/568		-	+	-	+
Gripe B/Hong Kong/8/73		-	+	-	+
Gripe B/Malasia/08/184		-	+	-	+
Gripe B/Malasia/2506/2004		-	+	-	+
Gripe B/Noruega/1/84		-	+	-	+
Gripe B/Noruega/84/542		-	+	-	+
Gripe B/Brisbane/60/2008		-	+	-	+

Cepa	Subtipo	Gripe A	Gripe B	H1N1 _{nv}	IC
Gripe A/Brisbane/10/2007	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Brisbane/59/2007	H3N2	+	-	-	+
Gripe A/Pollos/Alemania R3294/2007	H5N1	+	-	-	+
Gripe A/Hamburg/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Gripe A/Bayern/63/2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+
Gripe A/California 2009	H1N1 _{nv}	-	-	+	+

11.2.1.1 Sustancias interferentes

Tabla 3: Resultados de las pruebas de muestras que contienen diferentes sustancias potencialmente interferentes

Sustancias potencialmente interferentes	Resultado, 30 pfu/ml (H1N1nv cepa HH)	Resultado, 3 pfu/ml (H1N1nv cepa HH)
Mucina (10 %, bovina)	+	+
Sangre (EDTA sangre)	+	+
ADN genómico humano (2 µg/PCR)	+	+
Bastoncillos (5 fabricantes)	+	+
Medios de transporte virales (3 fabricantes)	+	+
Bastoncillos bacterianos que contienen agar de gelatina	-	-

11.2.2 Sensibilidad clínica

Aún no se ha realizado un estudio prospectivo para la determinación de la sensibilidad clínica porque no existe un test aprobada disponible para la comparación. En su lugar, se definía que una muestra era positiva en gripe H1N1_{nv} si al menos había un resultado positivo «interno» de PCR en tiempo real con evidencia adicional de positividad (secuenciación, prueba de antígeno o cultivo vírico). Estas muestras se denominan «positivos probados previamente» y «negativos probados previamente», respectivamente. Estas muestras se volvieron a probar con el RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0.

Tabla 4: Resultados de la evaluación del diagnóstico

		RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 H1N1 _{nv}	
		+	-
Probado previamente	+	141	5
	-	4	89

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 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 test 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 el test 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 la 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 H1N1_{nv}, gripe A o gripe B 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 S&T RT-PCR Kit 3.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Algunas cepas raras del virus de 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 gripe B, que no portan esta mutación.
- La cepa de la gripe A / Paraná / 720/2015 (H1N2) v se escribe como la gripe A H1N1_{nv}, ya que contiene la secuencia diana de genes misma matriz.

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 3.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio 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. and Steven MO. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

Resende P, Born P, Matos A, Motta F, Caetano B, Debur M, et al. Whole-Genome Characterization of a Novel Human Influenza A(H1N2) Virus Variant, Brazil. Emerg Infect Dis. 2017;23(1):152-154

16. Marcas comerciales e información 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); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (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 S&T RT-PCR Kit 3.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

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

No disponible en todos los países.

© 2017 Altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	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

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

www.altona-diagnostics.com

