

Instrucciones de uso

RealStar[®] PIV RT-PCR Kit 2.0

01/2017 ES

RealStar[®]

PIV RT-PCR Kit 2.0

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)



262013



96



01 2017



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.....	10
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	11
7. Advertencias y precauciones	12
8. Procedimiento	13
8.1 Preparación de las muestras	13
8.2 Preparación de la Master Mix	14
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	17
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	18
10. Análisis de datos.....	18
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	19
10.2 Interpretación de los resultados	20
10.2.1 Análisis cualitativo.....	20

11. Evaluación de rendimiento	21
11.1 Sensibilidad analítica	21
11.2 Especificidad analítica.....	24
11.3 Precisión	25
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® PIV RT-PCR Kit 2.0 es una prueba diagnóstica *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de virus paragripales humanos (PIV, por sus siglas en inglés) de los serotipos de PIV 1, 2, 3 y 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Es más, la prueba permite la diferenciación entre el ARN específico para el género *Respirovirus* (PIV-1 y PIV-3) y el género *Rubulavirus* (PIV-2 y PIV-4).

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen[μ l/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control PIV-1 + PIV-2	1	250
Naranja	Positive Control PIV-3 + PIV-4	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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 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 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)
- Guantes sin talco (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

Los *virus paragripales humanos* (PIV, por sus siglas en inglés) son virus de ARN monocatenario de polaridad negativa de la familia *Paramyxoviridae*. Los PIV humanos se dividen en cuatro especies pertenecientes a dos géneros diferentes: Los PIV-1 y PIV-3 pertenecen al género *Respirovirus*, mientras que los PIV-2 y PIV-4 pertenecen al género *Rubulavirus*. Se describieron dos subespecies para el PIV-4 (PIV-4a y PIV-4b) poco después de que se identificara este virus en 1959. Actualmente, se ha informado de la existencia de diferentes genotipos para todas las especies de PIV.

Las infecciones por PIV son, junto con el *virus sincitial respiratorio humano* (VSR), la segunda causa más común de enfermedad del tracto respiratorio inferior (TRI) grave en niños pequeños. Estudios serológicos han demostrado que, del 90 al 100 % de los niños de 5 años o más, tienen anticuerpos de PIV-3 y, alrededor del 75 %, tienen anticuerpos de PIV-1 y PIV-2. Las infecciones por virus paragripales también suponen un problema importante en personas mayores, personas con enfermedades cardiopulmonares e individuos inmunocomprometidos. A lo largo de la vida, se repetirán reinfecciones, pero suelen manifestarse como una enfermedad del tracto respiratorio superior (TRS) leve en adultos.

En general, el PIV humano se asocia a todos los tipos de TRSy TRI. Las subsiguientes relaciones entre las especies y los síndromes clínicos específicos, suelen observarse la edad de los pacientes y la estación del brote:

- El PIV-1 es la causa principal de crup agudo en bebés y niños pequeños, pero además causa infecciones leves del tracto respiratorio superior, faringitis y traqueobronquitis en todos los grupos de edad. En climas templados, el PIV-1 causa brotes bienales de crup en los meses de otoño.
- El PIV-2 suele asociarse a índices de infección inferiores a las del TRS al PIV-1 o PIV-3 y causa infecciones del TRS leve, así como crup en niños y, ocasionalmente, infecciones del TRI. Como sucede con el PIV-1, los brotes tienden a producirse casi siempre en los meses de otoño con una frecuencia anual o bienal.
- El PIV-3 es la causa principal de infecciones del TRI graves en bebés y niños pequeños y, a menudo, provoca crup, bronquitis y neumonía en niños de menos de 1 año de edad. En niños mayores y en adultos, puede provocar infecciones del TRS o traqueobronquitis. Las infecciones por PIV-3 pueden producirse en cualquier estación, con una actividad máxima en los meses de primavera y de principio de verano, cada año.
- El PIV-4 es el grupo menos común y suele asociarse a infecciones del TRS leves.

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® PIV RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa de ARN específico de virus paragripales (PIV) humanos de las especies PIV 1, 2, 3 y 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Es más, la prueba permite la diferenciación entre el ARN específico para el género *Respirovirus* (PIV-1 y PIV-3) y el género *Rubulavirus* (PIV-2 y PIV-4). La prueba diagnóstica 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 captosres de fluorescencia (quencher)

Las sondas específicas para PIV-1 y PIV-3 están marcadas con el fluorocromo FAM™, mientras que las sondas específicas para PIV-2 y PIV-4 se marcan con un fluoróforo Cy®5. 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 de PIV-1/3 (género *Respirovirus*), PIV-2/4 (género *Rubulavirus*) y 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Dos Controles positivos
 - Control positivo PIV-1 + PIV-2
 - Control positivo PIV-3 + PIV-4
- 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 PIV-1 - 4, y el Control interno en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se desarrolló y se validó para su uso 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 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 ADNsas/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® PIV RT-PCR Kit 2.0.

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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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.

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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volumen de Master Mix	21 µl	252 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 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 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	15 µl	180 µl
Volumen de Master Mix	20 µl	240 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 20 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	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia

- ▶ Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de PIV-1 y PIV-3	PIV-1/3	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de PIV-2 y PIV 4a/b	PIV-2/4	Cy®5	(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	-	55	20:00
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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Control positivo PIV-1 + PIV-2	+	+	+/-*
Control positivo PIV-3 + PIV-4	+	+	+/-*
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
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	-	+*	Se ha detectado ARN específico de PIV-1 o PIV-3.
-	+	+*	Se ha detectado ARN específico de PIV-2 o PIV-4a/b.
-	-	+	No se ha detectado ARN específico de PIV-1, ni PIV-2, ni PIV-3, ni PIV-4a, ni PIV-4b. 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 FAM™ o en el canal de detección Cy®5. Una carga alta de ARN de PIV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación del rendimiento del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se realizó utilizando ARN genómico de las siguientes cepas de PIV: PIV-1: ATCC® VR-94™; PIV-2: ATCC® VR-92™; PIV-3: ATCC® VR-93™; PIV-4a: ATCC® VR-1378™; PIV-4b: ATCC® VR-1377™.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se define como la concentración (copias por µl del eluido) de moléculas de ARN específico de PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a o PIV-4b que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de ARN específico de especies de PIV de una concentración conocida.

Tabla 1: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de PIV-1

Conc. [copias/µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
4,744	24	24	100
2,372	24	24	100
1,499	24	24	100
0,474	24	14	58
0,150	24	10	42
0,075	24	3	13
0,047	24	2	8
0,015	24	1	4
0,005	24	0	0
0,001	24	0	0

Tabla 2: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de PIV-2

Conc. [copias/ µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
2,825	24	24	100
1,785	24	24	100
0,565	24	24	100
0,179	24	16	67
0,141	24	12	50
0,089	24	11	46
0,057	24	9	38
0,05	24	7	29
0,018	24	2	8
0,006	24	1	4

Tabla 3: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de PIV-3

Conc. [copias/ µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
2,385	24	24	100
1,507	24	24	100
0,477	24	21	88
0,151	24	16	67
0,075	24	8	33
0,048	24	6	25
0,015	24	4	17
0,005	24	1	4
0,002	24	0	0

Tabla 4: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de PIV-4a

Conc. [copias/ µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
2,331	24	24	100
1,473	24	24	100
0,466	24	24	100
0,147	24	19	79
0,074	24	16	67
0,047	24	9	38
0,015	24	5	21
0,005	24	4	17
0,001	24	0	0

Tabla 5: Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección específica del ARN de PIV-4b

Conc. [copias/ µl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
1,906	24	24	100
1,205	24	24	100
0,381	24	19	79
0,120	24	8	33
0,060	24	2	8
0,038	24	1	4
0,012	24	1	4
0,004	24	0	0
0,001	24	0	0

La sensibilidad analítica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN específico de PIV 1, la sensibilidad analítica es de 1,49 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,94 - 2,93 copias/μl].
- Para la detección de ARN específico de PIV 2, la sensibilidad analítica es de 0,70 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,44 - 1,46 copias/μl].
- Para la detección de ARN específico de PIV 3, la sensibilidad analítica es de 0,94 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,55 - 2,11 copias/μl].
- Para la detección de ARN específico de PIV 4a, la sensibilidad analítica es de 0,44 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,26 - 0,93 copias/μl].
- Para la detección de ARN específico de PIV 4b, la sensibilidad analítica es de 0,83 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,54 - 1,67 copias/μl].

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se garantiza mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante un análisis de comparación con secuencias disponibles públicamente para asegurar que se detectarán todos los genotipos relevantes de PIV.

La especificidad analítica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se evaluó probando un panel de ADN/ARN genómico extraído de diferentes aislados de PIV y otros patógenos que se relacionan con el PIV o que pueden causar síntomas similares al PIV.

El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| • Adenovirus humano 1 | • Virus Coxackie A3 |
| • Adenovirus humano 2 | • Rhinovirus |
| • Adenovirus humano 3 | • Virus MERS-CoV |
| • Adenovirus humano 4 | • <i>Bordetella pertussis</i> |
| • Virus sincitial respiratorio humano A | • <i>Bordetella parapertussis</i> |
| • Virus sincitial respiratorio humano B | • <i>Chlamydophila pneumoniae</i> |
| • Metapneumovirus humano A | • <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| • Metapneumovirus humano B | • <i>Haemophilus influenzae</i> |
| • Virus de la gripe A H1N1 | • <i>Legionella pneumophila</i> |
| • Virus de la gripe A | • <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| • Virus de la gripe B | • <i>Streptococcus pneumoniae</i> |

11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 valores de ciclo de umbral de (C_t). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 6: Datos de precisión para la detección específica del ARN de PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a y PIV-4b

PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a y PIV-4b		Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	PIV-1	31,59	0,09	0,28
	PIV-2	30,24	0,09	0,30
	PIV-3	30,74	0,09	0,29
	PIV-4a	31,32	0,06	0,19
	PIV-4b	31,70	0,16	0,50
Variabilidad intertest	PIV-1	31,49	0,14	0,44
	PIV-2	30,24	0,09	0,30
	PIV-3	30,74	0,10	0,33
	PIV-4a	31,33	0,05	0,16
	PIV-4b	31,78	0,18	0,57
Variabilidad interlote	PIV-1	31,64	0,26	0,82
	PIV-2	30,32	0,11	0,36
	PIV-3	30,84	0,15	0,49
	PIV-4a	31,28	0,09	0,29
	PIV-4b	31,68	0,23	0,73
Variabilidad total	PIV-1	31,62	0,23	0,73
	PIV-2	30,29	0,11	0,36
	PIV-3	30,81	0,14	0,45
	PIV-4a	31,29	0,09	0,29
	PIV-4b	31,69	0,21	0,66

Tabla 7: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	29,55	0,09	0,30
Variabilidad intertest	29,55	0,08	0,27
Variabilidad interlote	29,51	0,10	0,34
Variabilidad total	29,52	0,10	0,34

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 PIV 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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 M. Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

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®, 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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

