

## **Instrucciones de uso**

# **RealStar<sup>®</sup> HEV RT-PCR Kit 2.0**

07/2017 ES



# RealStar<sup>®</sup>

## HEV RT-PCR Kit 2.0

Para utilizar con

Mx 3005P<sup>™</sup> QPCR System (Stratagene)

VERSANT<sup>®</sup> kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism<sup>®</sup> 7500 SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene<sup>®</sup> 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96<sup>™</sup> Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche)



272013



96



07 2017



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>6</b>
<b>4.</b>	<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Información general.....</b>	<b>8</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>11</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimiento .....</b>	<b>13</b>
8.1	Preparación de las muestras .....	13
8.2	Preparación de la Master Mix .....	14
8.3	Preparación de la reacción .....	16
<b>9.</b>	<b>Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>17</b>
9.1	Configuración.....	17
9.2	Detectores de fluorescencia.....	17
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	18
<b>10.</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>18</b>
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	19
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	18
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	19
10.1.3	Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa).....	20
10.1.4	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa).....	20
10.2	Interpretación de los resultados .....	20

10.2.1	Análisis cualitativo.....	20
10.2.2	Análisis cuantitativo.....	21
<b>11.</b>	<b>Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>22</b>
11.1	Sensibilidad analítica .....	23
11.2	Especificidad analítica.....	24
11.3	Rango lineal .....	24
11.4	Precisión .....	26
<b>12.</b>	<b>Limitaciones .....</b>	<b>27</b>
<b>13.</b>	<b>Control de calidad.....</b>	<b>28</b>
<b>14.</b>	<b>Servicio técnico.....</b>	<b>28</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>28</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas comerciales e información legal .....</b>	<b>29</b>
<b>17.</b>	<b>Explicación de los símbolos .....</b>	<b>30</b>

## 1. Uso indicado

El RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación del ARN específico de virus de la hepatitis E (VHE).

## 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	240
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	QS1-4*	4	550
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

\* El RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 contiene estándares de cuantificación (QS) a cuatro concentraciones diferentes (ver capítulo 6. Descripción del producto)

Internal Control (IC) = Control interno

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

## 3. Almacenamiento

- El RealStar® HEV 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 (ver capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- 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.*



*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

El *virus de la hepatitis E* (VHE) es un virus monocatenario con un genoma de ARN de unos 7,5 kb de longitud. Es el único miembro del género *Hepevirus* de la familia *Hepeviridae*. Consta de una cápside icosaédrica no encapsulada de aproximadamente 33 nm de diámetro.

Las infecciones por VHE son un problema importante de salud pública. Se estima que hay unas 2,3 mil millones de personas infectadas en todo el mundo. El VHE es responsable de casi el 50 % de las hepatitis víricas agudas en países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica. Las infecciones agudas afectan, principalmente, a adultos, de 15 a 40 años de edad y suelen ser leves. Pero la tasa de mortalidad es particularmente alta (del 10 al 40 %) entre las mujeres embarazadas. Se ha informado de infecciones crónicas por VHE en personas inmunosuprimidas. Estudios en regiones endémicas indican tasas altas de seroprevalencia, del 15 al 60 %.

El VHE se ha clasificado en cuatro genotipos divididos en varios subtipos. Aunque los genotipos 1 y 2 del VHE son hiperendémicos en Asia y África, donde provocan brotes y hepatitis aguda esporádica, el genotipo 3 del VHE es prevalente en naciones desarrolladas, donde se ha identificado hepatitis aguda esporádica debida a este virus.

### 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® HEV RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección y cuantificación del ARN específico de virus de la hepatitis E (VHE).

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 captore de fluorescencia (quencher)

Las sondas específicas para el ARN de VHE 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 de VHE 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® HEV RT-PCR Kit 2.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno (IC)
- Cuatro estándares de cuantificación (QS1 - QS4)
- 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 transcriptasa inversa, la amplificación mediante la PCR y la detección del ARN específico do, y el Control interno en una configuración de reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones estandarizadas de ARN específico de VHE. Estos estándares de cuantificación se han calibrado con el 1<sup>er</sup> estándar internacional de la OMS para virus de la hepatitis E (VHE) para técnicas de amplificación de ácido nucleico (código PEI: 6329/10). Los estándares de cuantificación pueden utilizarse individualmente como controles positivos, o de manera conjunta para generar una **curva estándar**, que puede utilizarse para determinar la concentración de ARN específico de VHE en una muestra.

Los estándares de cuantificación tienen las siguientes concentraciones:

Estándar Cuantificación	Concentración [U/μl]
QS1	1.00E+04
QS2	1.00E+03
QS3	1.00E+02
QS4	1.00E+01

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® HEV 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)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- 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 se limita a 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 (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin 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® HEV 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® HEV 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® HEV 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	20 µl	240 µl
Internal Control (Control interno)	2.5 µl	30 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>27.5 µl</b>	<b>330 µl</b>

- ▶ 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	20 µl	240 µl
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>25 µl</b>	<b>300 µl</b>

**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 25 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 25 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 25 µl de los controles (estándar de cuantificación, control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	25 µl
Muestra o control	25 µl
<b>Volumen total</b>	<b>50 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo (QS) y uno negativo por serie.
- ▶ Para la cuantificación, deben utilizarse todos los estándares de cuantificación (de QS1 a QS4).
- ▶ 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® HEV 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	50 µl
Ramp Rate	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

### 9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de VHE	VHE	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:sec]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	00:15
			sí	55	00:45
			-	72	00:15

## 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® HEV 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 (cualitativa)

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

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo (QS)	+	+/-*
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 (cualitativa)

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

En caso de 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.

### 10.1.3 Serie válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cuantitativa** es **válida** si se cumplen todas las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas cualitativa **válida** [ver capítulo 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)]. Los resultados de **cuantificación** son **válidos** si la **curva estándar** generada alcanza el siguiente valor de parámetro de control:

Parámetro de control	Valor válido
R al cuadrado (R <sup>2</sup> )	≥ 0.98

**NOTA**

*No todos los instrumentos de PCR en tiempo real muestran el valor R al cuadrado ( $R^2$ ). Para ver información detallada, consulte el manual de usuario del instrumento respectivo.*

### 10.1.4 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cuantitativa)

Una **serie de pruebas diagnósticas cuantitativa** 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 **cuantitativa**.

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™	JOE™	
+	+	Se ha detectado ARN específico de VHE
-	+	No se ha detectado ARN específico de VHE. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de VHE.
-	-	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™. Una carga alta de ARN de VHE en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

## 10.2.2 Análisis cuantitativo

El RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 incluye cuatro estándares de cuantificación (QS). Para generar una **curva estándar** para el análisis cuantitativo, deben definirse como **estándares** con desviaciones adecuadas (ver capítulo 6. Descripción del producto). Utilizando **estándares** de concentraciones conocidas, puede generarse una curva estándar de análisis cuantitativo.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

$C_t$  = Ciclo de umbral  
 $m$  = Pendiente  
 $N_0$  = Concentración inicial  
 $b$  = Intersección

Partiendo de la curva estándar, pueden cuantificarse muestras positivas de concentraciones desconocidas.

$$N_0 = 10^{(C_t - b) / m}$$

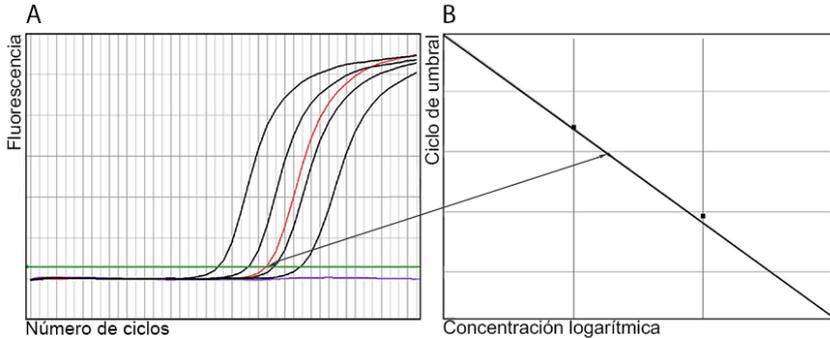


Figura 1: Estándares de cuantificación (negro), una muestra positiva (rojo) y una negativa (azul) se muestran en el gráfico de amplificación (Amplification Plot) [A] y un análisis de curva estándar [B]

**NOTA**



*La concentración de la muestra («Sample») se muestra en IU/μl y hace referencia a la concentración en el eluido.*

Para determinar la carga viral de la muestra original, debe aplicarse la siguiente fórmula:

$$\text{Carga Viral (Muestra) [IU/ml]} = \frac{\text{Volumen (Eluido) [\mu l]} \cdot \text{Carga viral (Eluido) [IU/\mu l]}}{\text{Entrada de muestra [ml]}}$$

**11. Evaluación de rendimiento**

La evaluación de rendimiento analítico del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 se realizó utilizando el "1er estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud para pruebas de valoración de amplificación de ácido nucleico (NAT) de ARN de código PEI: 6329/10".

## 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (límite de detección; en inglés Limit of Detection, LoD) del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 se define como la concentración (IU/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de VHE que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de «1<sup>st</sup> estándar internacional de la OMS para pruebas de valoración de amplificación de ácido nucleico (NAT) de ARN de virus de la hepatitis E (VHE)».

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

Conc. de entrada [IU/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
10.000	24	24	100
3.162	24	24	100
1.000	24	24	100
0.316	24	24	100
0.100	24	22	92
0.0316	24	9	38
0.010	24	4	17
0.003	24	2	8

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

- Para la detección de ARN específico de VHE, la sensibilidad analítica es de 0.20 IU/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0.12 - 0.45 IU/μl]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® HEV 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 VHE.

La especificidad analítica del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de virus relacionados con VHE e otros agentes patogénicos que provocan síntomas semejantes a VHE.

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

- Citomegalovirus
- Virus de Epstein-Barr (VEB)
- Virus de la hepatitis A (VHA)
- Virus de la hepatitis B (VHB)
- Virus de la hepatitis C (VHC)
- Virus del herpes simple 1 (VHS-1)
- Virus del herpes simple 2 (VHS-2)
- Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- Parvovirus humano B19
- Virus varicela-zóster

## 11.3 Rango lineal

El rango lineal del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ARN específico de VHE utilizando concentraciones que oscilan entre  $1E+08$  -  $1E+00$  IU/ $\mu$ l. Se analizaron al menos cinco replicados por dilución.

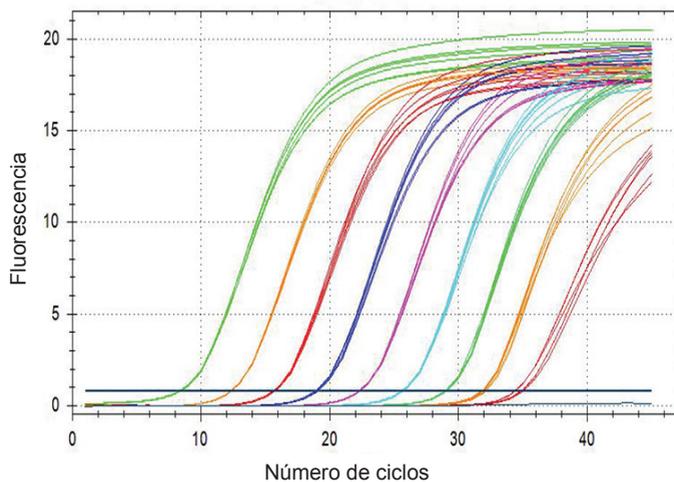
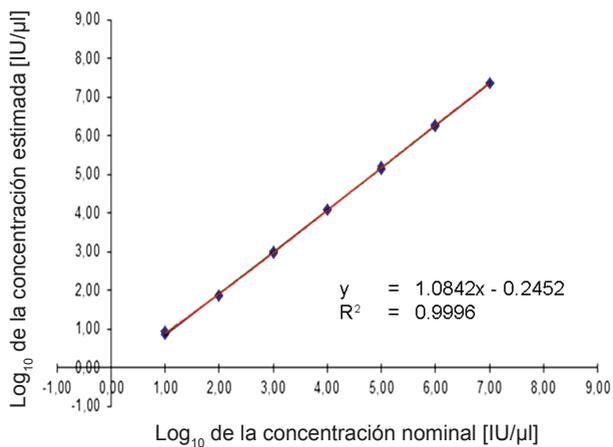
**A****B**

Figura 2: Curvas de amplificación [A] y regresión lineal [B] de una serie de diluciones analizadas de ARN específico de VHE

Se determinó que el rango lineal del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 iba de  $10^1$  IU/ $\mu\text{l}$  -  $10^7$  IU/ $\mu\text{l}$

## 11.4 Precisión

La precisión para el RealStar® HEV 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. Los datos se basan en el análisis de cuantificación de concentraciones definidas de ARN específico de VHE y en valores del ciclo de umbral de ( $C_t$ ) en términos del Control interno. Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote

Tabla 2: Datos de precisión para la detección específica del ARN de VHE

VHE	Concentração Média [IU/ $\mu$ l]	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	5.18	0.43	8.28
Variabilidad intertest	6.06	0.35	5.70
Variabilidad interlote	5.62	0.56	10.02
Variabilidad total	5.77	0.56	9.68

Tabla 3: Datos de precisión para la detección del Control interno

Control interno	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	30.55	0.05	0.16
Variabilidad intertest	30.38	0.07	0.23
Variabilidad interlote	30.47	0.11	0.37
Variabilidad total	30.44	0.10	0.33

## 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 subcuantificación, falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de VHE cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar subcuantificación y/o fallos al detectar la presencia del patógeno
- Como con cualquier prueba diagnostica, los resultados del RealStar® HEV 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® HEV 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](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 and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. 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); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, 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® HEV 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

Símbolos	Explicación
	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

**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)

