

## **Instrucciones de uso**

**RealStar<sup>®</sup>**

**Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0**

03/2019 ES



# RealStar<sup>®</sup>

## Lassa Virus 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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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)



642013



2 x 48



03 2019



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

## Contenido

<b>1.</b>	<b>Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Almacenamiento .....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Información general.....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descripción del producto.....</b>	<b>11</b>
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	13
<b>7.</b>	<b>Advertencias y precauciones .....</b>	<b>13</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimiento .....</b>	<b>15</b>
8.1	Preparación de las muestras .....	15
8.2	Configuración de Master Mix .....	17
8.3	Configuración de reacción .....	18
<b>9.</b>	<b>Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>19</b>
9.1	Configuración.....	19
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	20
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	20
<b>10.</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>21</b>
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	21
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	22
10.2	Interpretación de los resultados .....	22
10.2.1	Análisis cualitativo.....	22
<b>11.</b>	<b>Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>23</b>

11.1	Sensibilidad analítica .....	24
11.2	Especificidad analítica.....	25
11.3	Exactitud .....	26
<b>12.</b>	<b>Limitaciones .....</b>	<b>28</b>
<b>13.</b>	<b>Control de calidad.....</b>	<b>30</b>
<b>14.</b>	<b>Asistencia técnica.....</b>	<b>30</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>30</b>
<b>16.</b>	<b>Marcas comerciales y aviso legal.....</b>	<b>31</b>
<b>17.</b>	<b>Explicación de los símbolos .....</b>	<b>32</b>

## 1. Uso indicado

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ARN específico de virus de Lassa (LASV) en plasma humano con EDTA como ayuda para diagnósticos en individuos que presenten señales y síntomas de una infección provocada por el virus de Lassa conjuntamente con factores de riesgo epidemiológico.

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 está diseñado para ser utilizado por personal cualificado en laboratorios equipados adecuadamente y conforme a las directrices de bioseguridad en laboratorios.

## 2. Componentes del kit

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contiene dos pruebas de RT-PCR diferentes con 48 reacciones cada una. Contiene dos controles positivos: uno para el sistema de amplificación y detección específico del gen GPC, y otro para la amplificación y detección del gen L.

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A GPC Gene	4	60
Violeta	Master B GPC Gene	4	180
Azul claro	Master A L Gene	4	60
Violeta claro	Master B L Gene	4	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control GPC Gene	1	250
Naranja	Positive Control L Gene	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

### 3. Almacenamiento

- El RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

### 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

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

**NOTA**

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

**NOTA**

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

## 5. Información general

El virus Lassa (LASV), miembro de la familia Arenaviridae, es un virus ARN monocatenario con envoltura. El LASV es endémico de África occidental, principalmente de Benín, Sierra Leona, Guinea, Liberia y Nigeria (1). El portador principal del LASV es el *Mastomys natalensis*, un pequeño roedor endémico de África subsahariana. Estos roedores viven cerca de los humanos, y frecuentan sus casas en busca de comida. El virus se puede transmitir mediante contacto directo o comida contaminada (2). La transmisión entre humanos es posible en una comunidad, y también en el ámbito sanitario, a través de aerosoles, contacto con fluidos corporales contaminados o la reutilización de equipos médicos contaminados (3).

Aproximadamente el 80 % de las infecciones por LASV pasan clínicamente inadvertidas, un 1 % de las infecciones provocan la muerte (3). El LASV puede causar la fiebre hemorrágica de Lassa (LHF) con altas tasas de mortalidad, alcanzando entre el 15-20 % en los pacientes hospitalizados (4). Las tasas de mortalidad para las embarazadas son incluso mayores, especialmente para aquellas en el tercer trimestre del embarazo (5).

La LHF se asocia a un brote nosocomial. Todavía no existen vacunas para el LASV. Para el tratamiento de la LHF, se administra el antivírico Ribavirina por vía parenteral. La eficacia del tratamiento es alta si se comienza durante los seis días

posteriores a la aparición de los primeros síntomas, pero disminuye rápidamente si se retrasa la administración (6). Algunas terapias de apoyo son la oxigenación, el tratamiento de infecciones secundarias, un balance apropiado de fluidos y electrolitos, y transfusiones cuando se indique.

El LASV puede detectarse con anterioridad después de una infección (7) y durante el curso de la enfermedad, mientras que las pruebas serológicas detectan el virus con la aparición de los síntomas (8). La detección del ARN vírico utilizando un RT-PCR convencional seguido de la detección por gel es el método de referencia para el diagnóstico de la LHF. El cultivo celular requiere una contención de BSL-4 y por lo tanto, solo se puede realizar en laboratorios altamente especializados (8). Están disponibles varios análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA), aunque los métodos serológicos no son útiles en la identificación de casos agudos de LHF. Además, los pacientes con LHF severa no siempre desarrollan anticuerpos (8, 9). Las herramientas de diagnóstico molecular que utilizan la técnica RT-PCR en tiempo real son apropiadas para el diagnóstico molecular de infecciones víricas, ya que son rápidas, sensibles y pueden realizarse en ejemplares inactivados (10, 11), pero no existe todavía ninguna prueba comercial con RT-PCR en tiempo real para la detección del LASV. La gran variedad de secuencias entre las cepas de LASV es un desafío para el desarrollo de las herramientas de diagnóstico molecular. La probabilidad de resultados de falso negativo puede disminuir al utilizar una secuenciación múltiple de los genomas como zonas objetivo, p. ej., el gen L y el gen GPC.

- [1] O. Ogbu, E. Ajuluchukwu & C.J. Uneke (2007), Lassa fever in West African sub-region: an overview, *J Vect Borne Dis*, 44(1):1-11.
- [2] Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulémou K, Sylla O, Kourouma F, Doré A, Soropogui B, Aniskin V, Allali B, Kouassi Kan S, Lalis A, Koivogui L, Günther S, Denys C, Jan ter Meulen J. (2006), *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa, *Emerg Infect Dis*, 12(12):1971-4.
- [3] Edward H. Stephenson Dr., Edgar W. Larson, Joseph W. Dominik (1984), Effect of environmental factors on aerosol-induced infection, *J Med Virol*, 14(4):295-303.

- [4] McCormick, J. B., P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, and E. S. Smith (1987), A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* 155:437-444.
- [5] Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB (1988), A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* 297:584 –587.
- [6] McCormick JB, Walker DH, King IJ, Webb PA, Elliott LH, Whitfield SG, Johnson KM (1986), Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am J Trop Med Hyg* 35:401–407.
- [7] Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994), Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 32(12):2898-903.
- [8] Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG (2000), Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation, *J Clin Microbiol*, 38(7):2670-7.
- [9] Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB. (1985), Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. *Lancet* i:250 –252.
- [10] Nikisins S, Rieger T, Patel P, Muller R, Gunther S, Niedrig M. (2015), International external quality assessment study for molecular detection of Lassa virus. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003793.
- [11] Zheng Pang, Aqian Li, Jiandong Li, Jing Qu, Chengcheng He, Shuo Zhang, Chuan Li, Quanfu Zhang, Mifang Liang, and Dexin Li (2014), Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses, *PLoS One*, 9(4): e95635.

**NOTA**



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

## 6. Descripción del producto

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ARN específico de virus de Lassa (LASV) en plasma humano con EDTA como ayuda para diagnósticos en individuos que presenten señales y síntomas de una infección provocada por el virus de Lassa conjuntamente con factores de riesgo epidemiológico.

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 está diseñado para ser utilizado por personal cualificado en laboratorios equipados adecuadamente y conforme a las directrices de bioseguridad en laboratorios.

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se compone de dos pruebas, una centrada en el gen GPC del LASV, y otra en el gen L del LASV. Ambas pruebas incluyen un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos.

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

Gen GPC Master Mix: la sonda específica para el gen GPC de LASV se marca con el fluoróforo FAM™. La sonda específica para el internal Control (IC, control interno) se marca con el fluoróforo JOE™.

Gen L Master Mix: la sonda específica para el gen L de LASV se marca con el fluoróforo FAM™. La sonda específica para el internal Control (IC, control interno) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela de ARN específico de LASV, (centrado en el gen GPC o en el gen L) así como

la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

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

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

El kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se compone de:

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

Cada Master A y Master B contiene todos los componentes (tampón PCR, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, amplificación mediada por PCR y detección de una clase específica de ARN e Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

El gen GPC Master A y Master B contiene todos los componentes para permitir la amplificación mediante PCR y la detección del ARN del gen GPC específico del virus Lassa y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

El gen L Master A y Master B contiene todos los componentes para permitir la amplificación mediante PCR y la detección del ARN del gen L específico del virus Lassa y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

## 7. Advertencias y precauciones

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

- Antes del primer uso, compruebe lo siguiente en el producto y sus componentes:
  - Integridad
  - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (ver capítulo 2. Componentes del kit)
  - Marcado correcto
  - Si está congelado al llegar

- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y *procedimientos* de diagnóstico in vitro.
- Las muestras clínicas deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio. Consúltese la directriz del CDC «Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals» (The guidelines from the CDC's, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, mayo de 2005. [https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05\\_19\\_05.pdf](https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf)).
- Utilice guantes protectores desechables sin polvo, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasas/RNasas con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los mueva de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden realizarse pruebas a controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las leyes locales, estatales o federales, o de organizaciones de acreditación.

- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad haya vencido.
- Descarte muestras y residuos de productos conforme a las regulaciones locales de seguridad. Consúltense también las directrices del CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, mayo de 2005. [https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05\\_19\\_05.pdf](https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf).

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El siguiente tipo de muestra está validado para su uso con el kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0:

- Plasma humano con EDTA.

Para una guía respecto al proceso de muestreo remitirse a «National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers (Guía nacional sobre prevención y control de fiebres hemorrágicas víricas)» (National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers, Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), abril 2017. [https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18\\_1501495944.pdf](https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf)).

El ARN extraído es el material inicial para el kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0.

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

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (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 Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 de RealStar® debe validarla el usuario.

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

### PRECAUCIÓN



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

### PRECAUCIÓN



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

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

## 8.2 Configuración de Master Mix

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

El RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

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

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

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

espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).

- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix (gen GPC Master Mix y gen L Master Mix) de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

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

#### PRECAUCIÓN



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

#### PRECAUCIÓN



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

### 8.3 Configuración de reacción

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

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

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

## 9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

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

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

### 9.1 Configuración

- ▶ Defina la siguiente configuración:

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

## 9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

► Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Master Mix	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de LASV gen GPC	Gen GPC	LASV	FAM™	(Ninguno)
ARN específico de LASV gen L	Gen L	LASV	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	IC	JOE™	(Ninguno)

## 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

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

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturaliza- ción	Retención	1	-	95	2:00

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

## 10. Análisis de datos

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

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

### 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

#### 10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

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

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo (gen GPC)	+	+/-*
Control positivo (gen L)	+	+/-*

Id. de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control negativo	-	+

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

### 10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

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

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

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Canal de detección		Interpretación del resultado
Prueba específica para gen GPC		Prueba específica para gen L		
FAM™	JOE™	FAM™	JOE™	
+	+	++	+	Se ha detectado ARN específico de LASV.
+	+	-	+/-***	Se ha detectado ARN específico de LASV.
-	+/-***	++	+	Se ha detectado ARN específico de LASV.
-	+	-	+	No se ha detectado ARN específico de LASV. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de LASV.

Canal de detección		Canal de detección		Interpretación del resultado
Prueba específica para gen GPC		Prueba específica para gen L		
FAM™	JOE™	FAM™	JOE™	
-	+	-	-	Fallo de reactivo o inhibición de RT-PCR. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.
-	-	-	+	Fallo de reactivo o inhibición de RT-PCR. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.
-	-	-	-	Fallo de reactivo o inhibición de RT-PCR. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

\* La detección de Internal Control (control interno) en el JOE™ canal de detección no se requiere para resultados positivos en el FAM™ canal de detección. Una carga alta de ARN de LASV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

\*\* Las muestras altamente positivas en LCMV (virus coriomeningitis linfocítica) pueden dar falsos positivos en la prueba de LASV en ARN específico del gen L.

\*\*\* Si se observa una señal en el canal de detección FAM™ para una de las dos pruebas (ya sea a prueba en el gen GPC o en el gen L), la muestra se podrá considerar de ARN positivo de LASV. Es irrelevante si la prueba que no muestra ninguna señal en el canal de detección FAM™ muestra una señal en el canal (IC) JOE™, o no.

## 11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se realizó utilizando un procedimiento in vitro para los genes L y GPC respectivamente.

## 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de LASV que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó por el análisis de una serie de diluciones de transcripciones específicas de los genes L y GPC *procedimientos* del virus de Lassa.

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

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	23	23	100
1,000	24	22	91,67
0,316	24	9	37,5
0,032	48	4	8,33
0,010	48	3	6,25
0,003	48	1	2,08

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

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
0,316	24	13	54,17
0,100	24	5	20,83
0,032	24	1	4,17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

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

- Para la detección de ARN específico del gen L ,la sensibilidad analítica es de 3,14 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 1,67 - 7,60 copias/μl]
- Para la detección de ARN específico del gen GPC, la sensibilidad analítica es de 1,00 copias/μl [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,64 - 2,12 copias/μl]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se asegura mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se verificaron mediante análisis de comparación de secuencias frente a las secuencias disponibles públicamente con el fin de asegurar la detección de todos los genotipos relevantes de LASV.

La especificidad analítica del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de patógenos relacionados con el virus Lassa y otros patógenos que es probable que estén presentes en la misma matriz de la muestra o que causen síntomas similares a los del virus Lassa.

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

- Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
- Virus del chikunguña
- Virus del dengue 1
- Virus del dengue 2
- Virus del dengue 3
- Virus del dengue 4
- Virus del Ébola
- Virus de la hepatitis A
- Virus de la hepatitis B
- Virus de la hepatitis C
- Virus 1 de la inmunodeficiencia humana
- Virus de Marburg
- Fiebre del Valle del Rift
- Virus del Nilo Occidental
- Virus de la fiebre amarilla
- Virus del Zika
- *Plasmodium falciparum*

La especificidad analítica respecto a la reactividad del kit RealStar® de Virus Lassa RT-PCR Kit 2.0 fue evaluada por un panel de ARN genómico extraído de diferentes linajes (cepas) de virus Lassa.

El kit RealStar® de Virus Lassa RT-PCR Kit 2.0 es capaz de detectar ARN de los siguientes linajes de los que se han realizado pruebas para cepas diferentes:

- Linaje II (Nig08-04; Nig08-A37)
- Linaje III (Nig08-A18; Nig-CSF; Nig-SL-NL)
- Linaje IV (Lib05-4094; BA366; Josiah)
- Linaje V (AV)

### 11.3 Exactitud

La precisión del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se determinó como prueba específica para el gen GPC y prueba específica para el gen L 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 3:** Datos de precisión para la detección de ARN específico de LASV gen L

LASV gen L	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	31,51	0,16	0,51
Variabilidad intertest	30,98	0,16	0,53
Variabilidad interlote	31,32	0,24	0,76
Variabilidad total	31,16	0,30	0,97

**Tabla 4:** Datos de precisión para la detección de ARN específico de LASV gen GPC

LASV gen GPC	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	31,65	0,22	0,70
Variabilidad intertest	32,14	0,18	0,57
Variabilidad interlote	31,96	0,37	1,16
Varianza total	31,98	0,31	0,96

**Tabla 5:** Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Master Mix L Gene

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral medio ( $C_t$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	32,46	0,16	0,50
Variabilidad intertest	32,24	0,27	0,83
Variabilidad interlote	32,51	0,13	0,41
Variabilidad total	32,34	0,27	0,83

**Tabla 6:** Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Master Mix GPC Gene

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral medio (Ct)	Desviación estándar	Variación de coeficiente [%]
Variabilidad intraensayo	30,72	0,22	0,71
Variabilidad intertest	30,67	0,17	0,55
Variabilidad interlote	30,65	0,17	0,54
Varianza total	30,68	0,18	0,59

## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta prueba de valoración tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo. Consulte «Interim Guidance by the WHO» (Interim Guidance, Organización Mundial de la Salud, 2014, <https://www.who.int/emergencies/diseases/lassa-fever/collection-of-blood-samples-for-lassa.pdf?ua=1>) y «National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers» (Centro de Control de Enfermedades de Nigeria (NCDC), abril de 2017. [https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18\\_1501495944.pdf](https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf)).

- Esta prueba de valoración no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración .
- La presencia de inhibidores de RT-PCR (p. ej., heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de LASV 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 kit RealStar® Lassa Virus 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 EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

### 14. Asistencia técnica

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

**E-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**Teléfono:** +49-(0)40-5480676-0

### 15. Bibliografía

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

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

## 16. Marcas comerciales y aviso legal

RealStar® (altona Diagnostics); 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® Lassa Virus 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 de Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© altona Diagnostics GmbH 2019; reservados todos los derechos.

## 17. Explicación de los símbolos

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



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

