

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

09/2021 ES

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
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)



671013



96



09 2021



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 del 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 (colorantes).....	18
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	18
9.4	Iniciación de PCR en tiempo real.....	18
10.	Análisis de datos.....	19
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	19
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	19
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	19
10.2	Interpretación de los resultados	20
10.2.1	Análisis cualitativo.....	20

11.	Evaluación de rendimiento	20
11.1	Sensibilidad analítica	21
11.2	Especificidad analítica.....	22
11.2.1	Reactividad cruzada.....	22
11.2.2	Inclusividad	23
11.3	Precisión	24
11.4	Evaluación del diagnóstico.....	25
12.	Limitaciones	27
13.	Control de calidad.....	28
14.	Asistencia técnica.....	28
15.	Bibliografía	28
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	29
17.	Explicación de los símbolos	30

1. Uso indicado

El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de virus de la fiebre amarilla.

2. Componentes del kit

Tabla 1: Componentes del kit

Color de la 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	1	250
Blanco	Water (PCR grade)*	1	500

* Para usarse como control negativo

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuviera congelado 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 altaona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 °C 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 °C y +8 °C no debe superar un período de 2 horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (consulte el capítulo 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de 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

El virus de la fiebre amarilla (YFV) es el prototipo del género *Flavivirus*, que incluye en torno a 70 virus distintos transmitidos por artrópodos [1]. El genoma YFV es un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva de 11 kb que codifica una poliproteína, que se procesa de forma postraduccional y cotraduccional en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales [2,3]. La fiebre amarilla es endémica de regiones tropicales de África y Sudamérica [1].

Se distinguen tres formas de fiebre amarilla: 1) fiebre amarilla urbana, en la que el virus se transmite de una persona a otra a través de mosquitos *Aedes aegypti* peridomésticos, 2) fiebre amarilla intermedia causada por el YFV, que se transmite a través de mosquitos semidomésticos a monos y humanos y 3) fiebre amarilla de la selva o «sylvan», en la que el YFV se trasmite por medio de mosquitos que crían en los huecos de los árboles a primates y, a veces, a humanos [1,2].

La mayoría de los pacientes infectados con YFV no desarrollan la enfermedad o la desarrollan de forma leve. En personas que desarrollan síntomas, la incubación suele durar entre 3 y 6 días. Los síntomas iniciales incluyen fiebre, escalofríos, cefalea intensa, dolor de espalda, dolor corporal general, náuseas y vómitos, fatiga y debilidad que aparecen de forma repentina. Tras una breve remisión de los síntomas que puede durar entre unas horas y un día, aproximadamente el 15 % de los individuos infectados desarrollan una forma más grave de la enfermedad. Esta forma se caracteriza por fiebre alta, ictericia, sangrado y, finalmente, choque y fallo multiorgánico [4,5].

Ningún tratamiento específico ha demostrado ser beneficioso para los pacientes con fiebre amarilla, solo los cuidados paliativos para tratar la deshidratación, el fallo respiratorio y la fiebre [1,4,6].

Todas las vacunas disponibles actualmente para la fiebre amarilla son vacunas con virus vivos atenuados de linaje 17D y consiguen una respuesta inmunológica adaptativa rápida, excepcionalmente enérgica y bastante duradera [4,5].

El diagnóstico clínico de la fiebre amarilla resulta difícil debido a la similitud de los síntomas con una amplia variedad de enfermedades, entre ellas el dengue, otras enfermedades víricas hemorrágicas, la leptospirosis, la hepatitis vírica y la malaria; por ello, es esencial una confirmación analítica [2].

- [1] Monath, Thomas P., and Pedro F.c. Vasconcelos. "Yellow fever." *Journal of Clinical Virology*, vol. 64, 2015, pp. 160–173, doi:10.1016/j.jcv.2014.08.030.
- [2] Domingo, C., et al. "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 12, Oct. 2012, pp. 4054–4060, doi:10.1128/jcm.01799-12.
- [3] Volk, D.e., et al. "Yellow Fever Envelope Protein Domain III NMR Structure (S288-K398)." Oct. 2008, doi:10.2210/pdb2jqm/pdb.
- [4] Monath, Thomas P, and Alan D.t Barrett. "Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever." *Advances in Virus Research*, 2003, pp. 343–395, doi:10.1016/s0065-3527(03)60009-6
- [5] Deubel, Vincent, et al. "Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-Vaccinated fatal human case." *Journal of Medical Virology*, vol. 53, no. 3, 1997, pp. 212–217., doi:10.1002/(sici)1096-9071(199711)53:3<212::aid-jmv5>3.0.co;2-b.
- [6] Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO), "Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection" February 2018

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® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro*, basado en tecnología de PCR en tiempo real, para la detección cualitativa del ARN específico de virus de la fiebre amarilla.

Este kit ha sido desarrollado para detectar todas las cepas descritas del virus de la fiebre amarilla, incluyendo la cepa de la vacuna 17D.

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

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

Las sondas específicas para el ARN de YFV se marcan con el fluoróforo FAM™. La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela del ARN específico de YFV y del control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

El test consta de tres procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y 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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)*

* Para usarse como control negativo

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

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

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- 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 el producto y sus componentes en cuanto a:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (consulte el capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetaje correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio.
- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasas/RNasas) de la muestra y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separado 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.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto 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.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material de partida para el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

La calidad del ARN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología 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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 1 minuto a aprox. 17 000 x g (~13 000 rpm) utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

Evitar ciclos de congelación y descongelación cuando sea posible.

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.

PRECAUCIÓN



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

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

8.2 Preparación del Master Mix

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

El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

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

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Volumen del Master Mix	21 µl	252 µl

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

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

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

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

8.3 Preparación de la reacción

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

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo (agua indicada para PCR incluida en el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0) 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 centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

Tras completarse la serie de configuración de PCR, la mezcla de PCR de la placa de reacción de 96 pocillos/tubo de reacción óptica sellado es estable a temperatura ambiente de entre +20 °C y +25 °C durante 30 minutos.

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

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

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real específicos, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- ▶ Se debe programar el instrumento con la siguiente configuración:

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

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Reporter	Quencher
ARN específico de YFV	YFV	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 adquisición de colorantes:

	Fase	Repeti- ciones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturaliza- ción	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

9.4 Iniciación de PCR en tiempo real

Colocar la placa de reacción de 96 pocillos/tubos de reacción óptica en el instrumento de PCR en tiempo real e iniciar la serie de PCR en tiempo real según el manual del usuario del instrumento correspondiente.

10. Análisis de datos

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

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de 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	+	+/-*
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		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
+	+	Se ha detectado ARN específico de YFV.
-	+	No se ha detectado ARN específico de YFV. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de YFV.
-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita la prueba con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

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

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se realiza mediante una transcripción *in vitro* específica de virus de la fiebre amarilla.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de YFV que se pueden detectar con un índice de positividad del 95 %. La sensibilidad analítica se determina mediante el análisis de la serie de diluciones del ARN específico de YFV.

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

Conc. entrada [copias/μl]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,600	24	24	100
10,000	24	24	100
3,160	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	87,5
0,100	24	9	37,5
0,032	24	4	16,7
0,010	24	2	8,3
0,003	24	0	0

La sensibilidad analítica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis de probit:

- Para la detección de ARN específico de YFV, la sensibilidad analítica es 0,69 copias/μl [intervalo de confianza (CI) del 95 %: 0,41 - 1,56 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 YFV.

11.2.1 Reactividad cruzada

La especificidad analítica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 con respecto a la reactividad cruzada con otros patógenos diferentes al YFV se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de virus relacionados con YFV y otros patógenos que causan síntomas similares. El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus chikunguña
- Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
- Serotipo 1 del virus del dengue
- Serotipo 4 del virus del dengue
- Virus del ébola
- Virus de la hepatitis C
- Virus de la encefalitis japonesa
- Virus de Lassa
- Virus de Marburgo
- Virus de la encefalitis del valle del Murray
- *Plasmodium falciparum*
- Virus del Nilo Occidental
- Virus del Zika

Además, la especificidad analítica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se evaluó para la OMS en el departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (Fort Collins, Colorado, EE. UU.). El CDC estadounidense es un centro colaborador con la OMS para la referencia y la investigación de los virus transmitidos por artrópodos. La evaluación se realizó de conformidad con el protocolo de la OMS sobre la evaluación en laboratorio de las pruebas de ácido nucleico de la fiebre amarilla. El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus chikunguña
- Serotipos 1-4 del virus del dengue
- Virus del ébola
- VIH
- Gripe A (H1N1)
- Virus de la encefalitis japonesa
- Virus de Lassa
- Virus de Marburgo
- Virus del sarampión
- Virus Powassan
- Virus del Nilo Occidental
- Virus del Zika

11.2.2 Inclusividad

La inclusividad del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se evaluó para la OMS en el departamento de Enfermedades Transmitidas por Vectores de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (Fort Collins, Colorado, EE. UU.). El CDC estadounidense es un centro colaborador con la OMS para la referencia y la investigación de los virus transmitidos por artrópodos. La evaluación en el laboratorio se realizó de conformidad con el protocolo de la OMS sobre la evaluación en laboratorio de las pruebas de ácido nucleico de la fiebre amarilla. Todas las cepas de YFV testadas (para ver más detalles véase la Tabla 3) fueron detectadas por el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Tabla 3: Cepas testadas por el CDC y la OMS para mayor inclusividad

Cepa del YFV	Ubicación	Año
Vacuna 17D-204	N/A	N/A
Asibi	Ghana	1927
14FA	Angola	1971
614819	Panamá	1974
BA-55	Nigeria	1986
BC-7914	Kenia	1993
FMD-1240	Perú	2007
CAREC M2-09	Trinidad	2009
InHRR 10a-10	Venezuela	2010

11.3 Precisión

La precisión del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basados en valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos 6 repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

Tabla 4: Datos de precisión para la detección de ARN específico de YFV (conc. aprox. 50 x LoD)

YFV	Ciclo de umbral promedio (C_t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	32,72	0,14	0,41
Variabilidad interensayo	32,39	0,22	0,68
Variabilidad interlote	32,46	0,29	0,91
Variabilidad total	32,50	0,25	0,77

Tabla 5: Datos de precisión para la detección de ARN específico de YFV (conc. aprox. 3 x LoD)

YFV	Ciclo de umbral promedio (C_t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	36,25	0,58	1,60
Variabilidad interensayo	36,19	0,33	0,91
Variabilidad interlote	36,16	0,42	1,16
Variabilidad total	36,21	0,41	1,14

Tabla 6: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral promedio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	29,44	0,07	0,23
Variabilidad interensayo	29,66	0,30	1,02
Variabilidad interlote	29,40	0,07	0,23
Variabilidad total	29,58	0,27	0,91

11.4 Evaluación del diagnóstico

Los ácidos nucleicos extraídos de las muestras de suero de 30 pacientes con infección de YFV confirmada se testaron en paralelo con el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 y el ensayo en laboratorio YFV real-time RT-PCR assay (basado en Domingo et al., 2012) por el Instituto Oswaldo Cruz en Fiocruz (Brasil). Además, también se testaron 15 muestras de suero individuales de personas no infectadas por el YFV.

De las 30 muestras positivas en YFV confirmadas, las 30 dieron positivo en RNA de YFV con la referencia (p. ej., el ensayo en laboratorio YFV real-time RT-PCR assay basado en Domingo et al., 2012) y el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

De las 15 muestras negativas en YFV confirmadas, las 15 dieron negativo en RNA de YFV con la referencia. Usando el kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0, 14 muestras dieron negativo en RNA de YFV y una muestra dio positivo.

Tabla 7: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico para el YFV en muestras de suero

		YFV real-time RT-PCR assay (basado en Domingo et al., 2012)	
		+	-
RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0	+	30	1
	-	0	14

En conclusión, en relación con los resultados generados con el ensayo en laboratorio YFV real-time RT-PCR assay (basado en Domingo et al., 2012), la sensibilidad y especificidad del diagnóstico del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 para la detección del YFV es del 100 % y el 93,3 %, respectivamente.

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de RT-PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del YFV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una o fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 EN ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

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

email: support@altona-diagnostics.com
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. 10ª 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); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene); FAM™ (Thermo Fisher Scientific).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

El kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia de Health Canada y no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

17. Explicación de los símbolos

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

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

