



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000472-23-0

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-000472-23-0 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones altona Diagnostics Argentina SRL solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro denominado RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL

DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1°.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro denominado RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0. de acuerdo con lo solicitado por Altona Diagnostics Argentina SRL con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2°.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2023-40351192-APN-INPM#ANMAT .

ARTÍCULO 3°.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 2436-24 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4°.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5°.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6°.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4°. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Marca comercial: RealStar®

Modelos:

RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Indicación/es de uso:

El RealStar® Zika 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 del virus del Zika (ZIKV) en suero u orina humano.

Forma de presentación: El kit permite 96 determinaciones y está compuesto por:

- Master A: 8 viales de 60 μ vial
- Master B: 8 viales de 180 μ vial
- Control interno (IC): 1 vial de 1000 μ
- Control positivo (PC): 1 vial de 250 μ
- Agua calidad PCR: 1 vial de 500 μ

Período de vida útil y condición de conservación: Período de vida útil: 15 MESES - Condiciones de conservación: -25°C / -15°C

Nombre del fabricante:
altona Diagnostics GmbH

Lugar de elaboración:
Mörkenstrasse 12, 22767 Hamburgo, Alemania.

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Expediente N° 1-0047-3110-000472-23-0

N° Identificadorio Trámite: 45734

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa
Date: 2023.04.19 17:00:23 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.04.19 17:00:27 -03:00

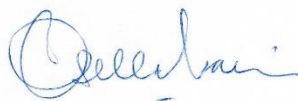
MODELO DE ROTULO e INSTRUCCIONES DE USO

RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

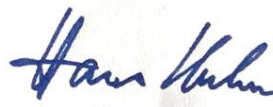
PM 2436-24

altona Diagnostics Argentina SRL

**Registro de Producto para diagnóstico uso “*in vitro*” importado
Disposición ANMAT 2198/2022 y 2674/99.**



Farm. Karin Osella
Directora Técnica
MN 11724



Hans Kuhn
Representante Legal

ROTULO

Se acondiciona con una etiqueta que contiene los datos siguientes:

- Nombre del producto:
- Leyenda: "IVD importado"
- Importado y distribuido por:
- Domicilio:
- Habilitación N°2436.
- Director Técnico:
- Leyenda: Autorizado por ANMAT N° PM 2436-24
- N° de Despacho:
- Leyenda: "USO PROFESIONAL EXCLUSIVO"
- Leyenda: "LEA ATENTAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES"

RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0
IVD importado
Autorizado por ANMAT - PM 2436-24
Importado y distribuido por:
altona Diagnostics Argentina S.R.L
Av. Cabildo 4447, piso 9, CABA. Argentina.
Habilitación: N° 2436.
Directora Técnica: Farm. Karin Osella.
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.
LEA ATENTAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES

Ya viene de origen con los siguientes datos en el envase secundario:

- Nombre del producto:
- Número de lote:
- Fecha de vencimiento:
- Constitución del kit, número de determinaciones posibles
- Indicación de unidades métricas
- Indicación de condiciones de almacenamiento y transporte.
- Nombre y domicilio de establecimiento elaborador

ETIQUETAS DE ORIGEN

Etiquetas de caja: envase secundario

REF 591013
LOT 123456
GTIN 4250453100543
96
2021-07-23
-25°C / -15°C
altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12
22767 Hamburg • Germany

**RealStar®
Zika Virus RT-PCR Kit 1.0**

For detection of Zika virus
specific RNA

(01)04250453100543
(10)123456
(17)210723
(240)591013
(6200)https://altona-diagnostics.com

RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

CAP	COMP	NUM	x	CONT
●	Master A	8	x	60 µl
●	Master B	8	x	180 µl
●	Internal Control	1	x	1000 µl
○	Water (PCR grade)	1	x	500 µl
●	Positive Control	1	x	250 µl

Etiquetas de los tubos: envase primario (tubos)

altona
RealStar®
Zika Virus
RT-PCR Kit 1.0
Internal Control

96
-25°C / -15°C

altona
RealStar®
Zika Virus
RT-PCR Kit 1.0
Master A

12
-25°C / -15°C

altona
RealStar®
Zika Virus
RT-PCR Kit 1.0
Master B

12
-25°C / -15°C

altona
RealStar®
Zika Virus
RT-PCR Kit 1.0
Positive Control

25
-25°C / -15°C

altona
RealStar®
Zika Virus
RT-PCR Kit 1.0
Water (PCR grade)

48
-25°C / -15°C

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

01/2017 ES

RealStar[®]

Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



591013

96

01 2017

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

Contenido

1. Uso indicado.....	6
2. Componentes del kit.....	6
3. Almacenamiento	6
4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5. Información general	8
6. Descripción del producto.....	9
6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real.....	10
7. Advertencias y precauciones	11
8. Procedimiento	12
8.1 Preparación de las muestras	12
8.2 Preparación de la Master Mix	13
8.3 Preparación de la reacción	15
9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....	16
9.1 Configuración	16
9.2 Detectores de fluorescencia	16
9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	17
9.4 Observaciones especiales sobre la configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real recomendados	18
10. Análisis de datos.....	20
10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas	20
10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas	20
10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas	20
10.2 Interpretación de los resultados	21
10.2.1 Análisis cualitativo.....	21

11. Evaluación de rendimiento	22
11.1 Evaluación de rendimiento sin extracción de ácido nucleico	22
11.1.1 Sensibilidad analítica	22
11.1.2 Especificidad analítica.....	23
11.1.3 Precisión	24
11.2 Evaluación de rendimiento incluyendo extracción de ácido nucleico	25
11.2.1 Muestras de suero	25
11.2.2 Muestras de orina	32
11.3 Evaluación de rendimiento clínico.....	39
12. Limitaciones	56
13. Control de calidad.....	57
14. Servicio técnico.....	57
15. Bibliografía	57
16. Marcas comerciales e información legal	58
17. Explicación de los símbolos	59

1. Uso indicado

El RealStar® Zika 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 del virus del Zika (ZIKV) en suero o orina humanos.

2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/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

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

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

NOTA

i

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

i

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

5. Información general

El virus del Zika es un virus ARN monocatenario (+) encapsulado de la familia *Flaviviridae*. Como muchos otros miembros de dicha familia, se transmite principalmente por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. En 1947, se aisló el virus de un mono rhesus en Uganda por primera vez. El primer caso humano de infección por el virus del Zika se detectó en 1968 en Nigeria. Inicialmente, la evidencia de infecciones por el virus del Zika solo se encontraba en pacientes de África y del Sudeste Asiático. En 2007, se produjo un gran brote del virus provocó en Micronesia y otras islas del Océano Pacífico. La Polinesia Francesa, las Islas de Pascua y las Islas Cook se vieron afectadas en 2013. Desde 2015, el virus también es endémico en Sudamérica, sobre todo en Brasil, donde desde entonces se han registrado numerosos presuntos casos. La fiebre, el sarpullido y la artralgia son síntomas y signos habituales de infecciones por el virus del Zika que, en cualquier caso, suelen ser leves y autolimitados.

Como los virus del Zika, del dengue y del chikunguña son endémicos en las mismas regiones geográficas y provocan síntomas similares, la identificación definitiva del agente etiológico solo es posible con productos de laboratorio. La detección del virus del Zika mediante RT-PCR en tiempo real debe realizarse de manera precoz (hasta 10 días) desde el inicio de la enfermedad. Los productos de valoración con anticuerpos muestran reacciones cruzadas con flavivirus similares, y la detección de anticuerpos neutralizantes mediante pruebas de valoración de reducción de placas presenta problemas y solo puede realizarse en laboratorios especializados.

NOTA

i

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® Zika 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 del virus del Zika (ZIKV). 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 captosres de fluorescencia (quencher)

Las sondas específicas para el ARN de ZIKV 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 ZIKV 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® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 se compone de:

- Dos reactivos Master (Master A y Master B)
- Control interno
- Control positivo
- Agua indicada para PCR

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

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 se desarrolló y se validó para su uso con los siguientes instrumentos de PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Advertencias y precauciones

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

- Antes del primer uso, compruebe los siguientes puntos respecto al producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y volumen (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetaje correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto está limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos de seguridad en el laboratorio.
- Utilice guantes protectores desechables sin talco, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (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

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. El siguiente kit se ha validado en combinación con el RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
 - Cat. No. 52904 for 50 extractions
 - Cat. No. 52906 for 250 extractions

La extracción del ARN utilizando el QIAamp® Viral RNA Mini Kit debe realizarse conforme a las instrucciones del fabricante utilizando 140 µl de muestra como material inicial. Para la elución del ARN extraído, deben utilizarse 60 µl de tampón AVE.

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

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

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

- ▶ Si se utiliza el Control interno como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el Control interno durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ El Control interno **no debe** añadirse directamente a la muestra. El Control interno debe añadirse siempre a la mezcla de muestra o 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, al utilizar el QIAamp® Viral RNA Mini Kit, el ARN con un volumen de elución de 60 µl de tampón AVE, deben añadirse 6 µl de Control interno por muestra a la mezcla de muestra o tampón de lisis.
- ▶ Si se añadió el Control interno durante el procedimiento de preparación de muestras, configure la Master Mix conforme al siguiente esquema de pipeteo:

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

PRECAUCIÓN

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



No añada nunca el Control interno directamente a la muestra.

8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl 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 por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las muestras y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una lámina adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real

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

Para obtener instrucciones detalladas para la programación en relación con el uso del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	ROX™

9.2 Detectores de fluorescencia

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre de detector	Reporter	Quencher
ARN específico de ZIKV	ZIKV	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (Control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

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

	Fase	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	02:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

9.4 Observaciones especiales sobre la configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real recomendados

A continuación, puede encontrar observaciones especiales sobre la configuración de LightCycler® 480 Instrument II (Roche), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), ABI Prism® 7500 SDS y ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems), Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) y Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN), VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare) y Mx 3005P™ QPCR System.(Stratagene)

LightCycler® 480 Instrument II

1. En «Experiment settings» (Ajustes de experimento), seleccione «Detection Format: Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe» (Formato de detección; sonda de hidrólisis de color doble/sonda UPL).
2. Asegúrese comprobando el campo «Customize» (Personalizar) que el ajuste que se muestra para «Filter Combinations» (Combinaciones de filtros) son «FAM™ (465-510)» y «VIC™/HEX/Yellow555 (533-580)».

ABI Prism® 7500 SDS

Vaya a «Plate Setup» (Configuración de la placa), «Define Targets and Samples» (Definir objetivos y muestras), «Assign Targets and Samples» (Asignar objetivos y muestras):

1. Seleccione la placa completa.
2. Marque las casillas de asignación para los dos objetivos. Los objetivos deberían aparecer en los pocillos en la disposición de la placa.

ABI Prism® 7500 SDS Fast

Se aplican los mismos ajustes para «Plate Setup» (Configuración de la placa) que para ABI Prism® 7500 SDS (ver texto anterior). Para la versión Fast, vaya a «Experiment properties» (Propiedades del experimento). La velocidad de rampa tiene que definirse como «Standard (~2 hours to complete a run)» (Estándar [~2 horas para completar la serie]). El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® no es compatible con las condiciones de ciclo rápido y las tasas mayores de rampa.

CFX96™ Real-Time PCR Detection System y CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System

Abra la ventana «Plate Editor» (Editor de placa) y seleccione todos los pocillos de la placa de 96 pocillos. Haga clic en «Select Fluorophores» (Seleccionar fluoróforos). Para «Channel 1» (Canal 1), marque la casilla tras FAM™ y para «Channel 2» (Canal 2), marque la casilla tras VIC™. Asigne muestras a los pocillos seleccionando el tipo de muestra adecuado («Sample Type») y, a continuación, la carga («Load») de FAM™ y VIC™ en los pocillos. El nombre de objetivo de FAM™ debe definirse como «Zika virus» (Virus del Zika) y el nombre de objetivo de VIC™ como «Internal Control» (Control interno).

Rotor-Gene® 6000 y Rotor-Gene® Q 5/6 plex/MDx Platform

Elija el 72-Well-Rotor y el volumen de reacción adecuada. Debe realizarse la optimización de ganancia antes de la 1.ª adquisición.

VERSANT® kPCR Molecular System AD

En el menú desplegable «Instrument» (Instrumento), seleccione el ajuste de ganancia definida de filtro («Filter Set Gain Settings»). Aparecerá una ventana emergente. Defina las configuraciones siguientes: Cy®5 x8, ROX™ x4, JOE™ x8 y FAM™ x8. Cierre la ventana emergente haciendo clic en el botón OK (Aceptar).

Mx 3005P™ QPCR System

En el menú desplegable «Instrument» (Instrumento), seleccione el ajuste de ganancia definida de filtro («Filter Set Gain Settings»). Aparecerá una ventana emergente. Defina las configuraciones siguientes: Cy®5 x8, ROX™ x4, JOE™ x8 y FAM™ x8. Cierre la ventana emergente haciendo clic en el botón OK (Aceptar).

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® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos específicos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico (ver capítulo 14. Servicio técnico).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas

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

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

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

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas

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

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

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
+	+*	Se ha detectado ARN específico de ZIKV.
-	+	No se ha detectado ARN específico de ZIKV. La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico de ZIKV.
-	-	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 ZIKV en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

11. Evaluación de rendimiento

11.1 Evaluación de rendimiento sin extracción de ácido nucleico

11.1.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ARN específico de ZIKV que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de la serie de diluciones de ARN de ZIKV cuantificado.

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

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,500	24	23	96
0,316	24	20	83
0,100	24	10	42
0,050	24	8	33
0,032	24	6	25

La sensibilidad analítica del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ARN específico del virus del Zika, la sensibilidad analítica es de 0,61 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,39 - 1,27 copias/μl]

11.1.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® 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 ZIKV.

La especificidad analítica del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® se evaluó probando un panel de ARN genómico extraído de virus diferentes al del Zika, alfavirus y otros patógenos.

El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus del dengue serotipo 1
- Virus del dengue serotipo 2
- Virus del dengue serotipo 3
- Virus del dengue serotipo 4
- Virus del Nilo Occidental
- Virus de la fiebre amarilla
- Virus del Ébola cepa Zaire (ZEBOV)
- Parvovirus humano B19
- Virus chikunguña
- Virus de la encefalitis del valle del Murray
- Virus de la encefalitis japonesa
- Virus de Marburgo (MARV)
- Virus del Ébola cepa Sudán (SEBOV)
- Virus de la encefalitis de San Luis
- *Plasmodium falciparum*

PRECAUCIÓN



Debido a la homología de secuencias entre el ARN del virus Usutu y la región objetivo utilizada para la detección del ARN específico del virus del Zika, no puede descartarse la reactividad cruzada con el ARN del virus Usutu. El virus Usutu es un virus aviar que rara vez infecta a humanos. No causa enfermedades graves o mortales en pacientes humanos y la infección suele permanecer asintomática.

11.1.3 Precisión

Los datos de precisión para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® se determinaron 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 ocho replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

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

ZIKV	Ciclo de umbral medio (C_t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intratest	31,33	0,07	0,21
Variabilidad intertest	31,35	0,10	0,32
Variabilidad interlote	31,42	0,11	0,35
Variabilidad total	31,39	0,11	0,35

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	28,55	0,06	0,22
Variabilidad intertest	28,44	0,14	0,49
Variabilidad interlote	28,44	0,17	0,60
Variabilidad total	28,48	0,15	0,53

11.2 Evaluación de rendimiento incluyendo extracción de ácido nucleico

11.2.1 Muestras de suero

Estimación del límite de detección (LD):

Se prepararon diluciones seriadas de la cepa del virus del Zika H/PF/2013 (concentración madre TCID₅₀/ml: 10^{6,82}) obtenida del Archivo Europeo de Virus (Marsella, Francia). Utilizando qRT-PCR y ARN cuantificado transcrito *in vitro*, se determinó que el número de equivalentes al genoma (geq) del virus del Zika por mililitro de solución madre era de 1,26E+09.

Para la extracción de ácido nucleico, se combinaron 126 µL de suero depositado con 560 µL de tampón de AVL, que contenía 6 µL del Control interno (que se proporciona con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®) y enriquecidos con 14 µL de solución madre del virus del Zika diluidos. La mezcla final se sometió al procedimiento de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante para el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). La elución se realizó en 60 µL de tampón de AVE. Cada muestra se extrajo por triplicado con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). La concentración más baja a la que se probaron los tres replicados se trató como LD provisional. Los resultados pueden encontrarse en la tabla 4:

Tabla 4: Determinación del LD provisional para el RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Objetivo	Concentración geq/ml	Tasa de retirada	Replicado 1 C _t (FAM™)	Replicado 2 C _t (FAM™)	Replicado 3 C _t (FAM™)
Virus del Zika (cepa H/PF/2013)	2515,71	3/3	33,52	33,76	33,87
	795,61	3/3	35,13	35,36	34,85
	251,62	3/3	36,98	35,92	35,86
	79,57	2/3	42,00	-	36,05
	25,17	1/3	36,74	-	-
	7,96	1/3	-	37,49	-
	2,52	0/3	-	-	-

El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detectaron 3/3 replicados con una concentración de 251,62 geq/ml de suero.

Confirmación del límite de detección (LD):

Basándose en el LD provisional, la solución madre de virus del Zika se enriqueció con 20 muestras individuales de suero con una concentración final de 251,62 geq/ml. Se extrajeron ácidos nucleicos con el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) como se ha descrito anteriormente. Los eluidos obtenidos se probaron con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® en los instrumentos siguientes:

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Los resultados pueden encontrarse en las tablas 5, 6, 7 y 8:

Tabla 5: Confirmación de LD en CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	36,84	31,55
2	+	38,29	32,16
3	+	36,07	31,71
4	+	35,18	31,32
5	+	36,95	31,60
6	+	36,22	31,71
7	+	35,48	32,06
8	+	35,12	32,04
9	+	36,05	31,49
10	+	36,07	31,89
11	+	35,77	31,69
12	-	-	32,68
13	+	36,51	32,17
14	+	36,21	32,32
15	+	34,96	31,66
16	+	36,08	32,18
17	+	35,97	32,05
18	+	35,47	31,41
19	+	36,07	31,86
20	+	36,15	31,87

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
Estadísticas	C _t medio (n=19)	36,08	31,87
	SD	0,76	0,34
	CV %	2,09	1,06
	Resultado	19/20	

El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System detectaron 19/20 replicados con una concentración de 251,62 geq/ml. Por lo tanto el LD confirmado es de 251,62 geq/ml de suero.

Tabla 6: Confirmación de LD en el Rotor-Gene® Q (QIAGEN)

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	34,68	30,34
2	+	36,10	30,74
3	+	35,74	30,57
4	+	34,62	30,05
5	+	34,93	30,29
6	+	35,12	30,58
7	+	35,29	30,60
8	+	35,08	30,63
9	+	34,38	30,32
10	+	36,47	30,42
11	+	34,33	30,29
12	+	36,78	31,39

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
13	+	35,76	31,02
14	+	34,99	30,89
15	+	34,59	30,36
16	+	35,40	30,83
17	+	34,58	30,64
18	+	34,88	30,27
19	+	35,99	30,29
20	+	34,67	30,32
Estadísticas	C _t medio (n=20)	35,22	30,54
	SD	0,71	0,32
	CV %	2,01	1,04
	Resultado	20/20	

Con una concentración de 251,62 geq/ml se detectaron 20/20 replicados positivos y, por tanto, se confirma que el LD es de 251,62 geq/ml de suero para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el Rotor-Gene® Q (QIAGEN).

Tabla 7: Confirmación de LD en el ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	36,18	30,20
2	+	35,11	30,67
3	+	35,02	30,38
4	+	35,49	29,88

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
5	+	34,86	30,35
6	+	35,37	30,09
7	+	35,61	30,33
8	+	34,67	30,28
9	+	34,85	30,12
10	+	35,61	29,91
11	+	34,82	30,05
12	+	35,78	31,07
13	+	34,78	30,95
14	+	36,43	30,75
15	+	34,25	30,19
16	+	35,33	30,57
17	+	34,86	30,31
18	+	36,58	30,00
19	+	35,10	30,13
20	+	34,74	30,32
Estadísticas	C _t medio (n=20)	35,27	30,32
	SD	0,62	0,33
	CV %	1,74	1,08
	Resultado	20/20	

Con una concentración de 251,62 geq/ml se detectaron 20/20 replicados positivos y, por tanto, se confirma que el LD es de 251,62 geq/ml de suero para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems).

Tabla 8: Confirmación de LD en el LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	35,55	30,93
2	+	36,93	31,28
3	+	35,84	30,73
4	+	35,49	30,60
5	+	36,89	30,79
6	+	36,48	30,81
7	+	35,88	30,80
8	+	35,37	30,89
9	+	35,46	30,59
10	+	35,85	31,01
11	+	35,90	30,55
12	+	36,33	31,74
13	+	36,30	31,28
14	+	37,59	31,22
15	+	35,74	30,77
16	+	36,18	31,04
17	+	36,48	31,13
18	+	36,00	30,66
19	+	36,48	30,78
20	+	35,82	30,78

Concentración del virus del Zika = 251,62 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
Estadísticas	C _t medio (n=20)	36,13	30,92
	SD	0,57	0,29
	CV %	1,57	0,95
	Resultado	20/20	

Con una concentración de 251,62 geq/ml se detectaron 20/20 replicados positivos y por tanto se confirma que el LD es de 251,62 geq/ml de suero para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

11.2.2 Muestras de orina

Estimación del límite de detección (LD):

Se prepararon diluciones seriadas de la cepa del virus del Zika H/PF/2013 (concentración madre TCID₅₀/ml: 10^{6,82}) obtenida del Archivo Europeo de Virus (Marsella, Francia). Utilizando qRT-PCR y ARN transcrito in vitro cuantificado, se determinó que el número de equivalentes al genoma (geq) del virus del Zika por mililitro de solución madre era de 1,26E+09.

Para la extracción de ácido nucleico, se combinaron 126 µL de orina depositada con 560 µL de tampón de AVL, que contenía 6 µL del Control interno (que se proporciona con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®) y enriquecidos con 14 µL de solución madre del virus del Zika diluidos. La mezcla final se sometió al procedimiento de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante para el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). La elución se realizó en 60 µL de tampón de AVE. Cada muestra se extrajo por triplicado con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® en el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). La concentración más baja a la que se probaron los tres replicados se trató como LD provisional. Los resultados pueden encontrarse en la tabla 9:

Tabla 9: Determinación del LD provisional para el RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Objetivo	Concentración geq/ml	Tasa de retirada	Replicado 1 C _t (FAM™)	Replicado 2 C _t (FAM™)	Replicado 3 C _t (FAM™)
Virus del Zika (cepa H/PF/2013)	2515,71	3/3	33,15	33,34	33,11
	795,61	3/3	34,10	33,83	35,07
	251,62	3/3	35,54	35,64	35,27
	79,57	3/3	36,78	37,41	36,40
	25,17	2/3	38,38	37,72	-
	7,96	1/3	-	-	38,22
	2,52	0/3	-	-	-

El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el CFX96™ Deep Well Real-Time y el sistema de detección PCR del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, detectaron 3/3 replicados con una concentración de 79,57 geq/ml de orina.

Confirmación del límite de detección (LD):

Basándose en el LD provisional, la solución madre de virus del Zika se enriqueció con 20 muestras individuales de orina con una concentración final de 79,57 geq/ml. Se extrajeron ácidos nucleicos con el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) como se ha descrito anteriormente. Los eluidos obtenidos se probaron con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® en los instrumentos siguientes:

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Rotor-Gene® Q (QIAGEN)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Los resultados pueden encontrarse en las tablas 10, 11, 12 y 13:

Tabla 10: Confirmación de LD en CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
1	+	36,72	30,77
2	+	36,34	31,06
3	+	37,21	31,07
4	+	36,41	31,21
5	+	37,89	30,59
6	-	-	31,21
7	+	36,12	31,25
8	+	36,25	30,43
9	+	38,03	30,64
10	+	37,36	31,11
11	+	38,08	31,99
12	+	37,26	30,95
13	+	36,30	31,27
14	+	35,75	31,74
15	+	36,68	31,01
16	+	39,07	31,08
17	+	37,17	31,67
18	+	35,79	31,04
19	+	38,01	31,44
20	+	37,17	31,05

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (VIC™)
Estadísticas	C _t medio (n=19)	37,03	31,08
	SD	0,90	0,27
	CV %	2,42	0,87
	Resultado	19/20	

El Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ Deep Well detectaron 19/20 replicados con una concentración de 79,57 geq/ml. Por lo tanto el LD confirmado es de 79,57 geq/ml de orina. Confirmación del límite de detección (LD) para instrumentos adicionales de PCR en tiempo real:

Tabla 11: Confirmación de LD en el Rotor-Gene® Q (QIAGEN)

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	36,45	29,66
2	+	35,47	30,20
3	+	36,03	30,37
4	+	35,70	30,08
5	+	35,97	29,53
6	+	37,38	30,41
7	-	-	30,03
8	+	37,34	30,23
9	+	35,36	29,49
10	+	36,40	30,10

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
11	+	35,57	29,83
12	+	36,52	29,74
13	+	37,59	30,21
14	+	35,49	29,53
15	+	36,12	29,89
16	+	36,53	29,83
17	+	36,76	30,73
18	+	36,55	29,79
19	+	36,19	30,39
20	+	37,39	29,79
Estadísticas	C _t medio (n=19)	36,36	29,99
	SD	0,70	0,34
	CV %	1,92	1,13
	Resultado	19/20	

Con una concentración de 79,57 geq/ml se detectaron 19/20 replicados positivos y por tanto se confirma que el LD es de 79,57 geq/ml de orina para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el Rotor-Gene® Q (QIAGEN).

Tabla 12: Confirmación de LD en el ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	36,11	29,48
2	+	36,63	29,97
3	+	35,76	29,94
4	+	37,29	29,85
5	+	36,54	29,56
6	+	37,37	29,86
7	+	36,36	30,03
8	+	37,27	30,11
9	+	36,05	29,45
10	+	36,65	30,06
11	+	37,33	29,86
12	+	35,88	29,53
13	+	36,09	30,02
14	+	37,58	29,51
15	+	37,36	29,86
16	+	36,07	29,80
17	+	36,50	30,23
18	+	37,36	29,81
19	+	35,86	30,20
20	+	35,74	29,74

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
Estadísticas	C _t medio (n=20)	36,58	29,84
	SD	0,65	0,24
	CV %	1,79	0,80
	Resultado	20/20	

Con una concentración de 79,57 geq/ml se detectaron 20/20 replicados positivos y, por tanto, se confirma que el LD es de 79,57 geq/ml de orina para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems).

Tabla 13: Confirmación de LD en el LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
1	+	37,29	30,15
2	+	37,03	30,34
3	+	37,67	30,48
4	+	36,83	30,42
5	+	36,58	30,02
6	+	36,90	30,69
7	+	37,50	30,66
8	+	38,63	30,71
9	+	36,74	30,10
10	+	37,95	30,54
11	+	37,13	30,52
12	+	38,12	30,29

Concentración del virus del Zika = 79,57 geq/ml			
Muestra	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (JOE™)
13	+	36,53	30,54
14	+	37,41	30,19
15	+	37,16	30,43
16	+	36,70	30,61
17	+	37,79	30,86
18	+	37,28	30,41
19	+	40,00	30,86
20	+	38,42	30,35
Estadísticas	C _t medio (n=20)	37,48	30,46
	SD	0,84	0,24
	CV %	2,25	0,78
	Resultado	20/20	

Con una concentración de 79,57 geq/ml se detectaron 20/20 replicados positivos y, por tanto, se confirma que el LD es de 79,57 geq/ml de orina para el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® junto con el sistema de extracción manual QIAamp® Viral RNA Mini Kit y el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

11.3 Evaluación de rendimiento clínico

Para evaluar el rendimiento clínico del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, se realizó un análisis retrospectivo ciego de un total de 208 muestras clínicas de 153 pacientes con síntomas y signos de infección por el virus del Zika (106 mujeres [M] y 47 hombres [H]). De las 208 muestras sometidas a pruebas, 103 eran muestras de suero y 105, de orina.

Para la extracción del ARN, se utilizó el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Se combinaron 140 µL de cada muestra de orina o de suero con 560 µL de tampón de AVL, que contenía 6 µL del Control interno, que se proporciona con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®. La mezcla de muestra y tampón de AVL se sometió al procedimiento de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó en 60 µL de tampón de AVE.

Los eluidos se probaron con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, así como con el RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et. al (Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. [2008] Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007; Emerg Infect Dis. Agosto de 2008; 14[8]: 1232-1239).

Para la ejecución del RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al., se han utilizado los siguientes oligonucleótidos, tabla 14:

Tabla 14: Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al

Cebador/sonda	Secuencia 5'-> 3'
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA

Ambas pruebas, el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, así como el RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et. al, se han realizado en un CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados generados para las diferentes muestras se muestran en la tabla 15:

Tabla 15: Resultados de la prueba de muestras clínicas

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
1	F	2	suero	-	-	29,88	-	-
		2	orina	-	-	31,57	-	-
2	F	5	orina	-	-	29,50	-	-
3	F	1	suero	-	-	30,37	-	-
		1	orina	-	-	29,49	-	-
4	F	1	suero	-	-	30,32	-	-
		1	orina	-	-	30,16	-	-
5	F	1	suero	-	-	31,04	-	-
		1	orina	-	-	30,10	-	-
6	F	3	suero	-	-	30,77	-	-
		3	orina	-	-	30,14	-	-
7	M	4	suero	-	-	30,05	-	-
		4	orina	-	-	31,21	-	-
8	M	0	suero	-	-	29,61	-	-
		0	orina	-	-	29,72	-	-
9	F	6	orina	-	-	29,88	-	-
10	F	4	suero	-	-	31,88	-	-
		4	orina	-	-	29,83	-	-
11	F	0	suero	-	-	31,33	-	-
		0	orina	-	-	30,35	-	-

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
12	M	3	suero	-	-	30,10	-	-
		3	orina	-	-	30,34	-	-
13	F	4	orina	33,03	+	29,92	33,85	+
14	F	2	suero	33,53	+	29,84	32,73	+
15	M	5	suero	-	-	30,53	-	-
		5	orina	33,76	+	30,02	34,83	+
16	M	2	suero	-	-	30,45	-	-
		2	orina	-	-	29,87	-	-
17	F	3	suero	30,12	+	31,45	29,68	+
18	F	3	orina	-	-	29,81	-	-
19	F	2	suero	-	-	29,60	-	-
		2	orina	33,41	+	30,24	33,95	+
20	F	6	orina	-	-	29,85	38,64	+
21	M	2	suero	-	-	31,79	-	-
		2	orina	-	-	29,96	-	-
22	M	1	suero	-	-	32,04	-	-
		1	orina	-	-	29,86	-	-
23	F	2	suero	-	-	30,90	-	-
24	F	7	orina	-	-	30,46	-	-

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
25	F	0	suero	33,35	+	30,43	33,33	+
		3	orina	31,93	+	31,23	32,81	+
26	F	3	suero	-	-	30,81	-	-
		3	orina	-	-	30,13	-	-
27	F	0	orina	-	-	29,40	-	-
28	M	5	suero	-	-	31,43	-	-
		5	orina	-	-	30,49	-	-
29	F	7	orina	-	-	30,09	-	-
30	M	1	suero	-	-	32,57	-	-
		1	orina	-	-	29,97	-	-
31	F	1	suero	35,91	+	31,19	37,41	+
		1	orina	30,14	+	30,06	30,05	+
32	M	2	suero	-	-	30,49	-	-
		2	orina	-	-	30,29	-	-
33	F	2	suero	32,15	+	31,35	31,84	+
34	F	0	orina	35,43	+	29,90	36,43	+
35	M	7	orina	34,39	+	29,59	35,78	+
36	F	2	suero	-	-	30,01	37,85	+
37	F	2	orina	-	-	30,02	-	-
38	M	8	orina	-	-	35,35	-	-

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
39	F	6	suero	30,94	+	30,13	30,34	+
40	M	3	suero	-	-	29,80	-	-
		3	orina	-	-	30,76	-	-
41	M	3	suero	-	-	30,36	-	-
		3	orina	-	-	30,38	-	-
42	F	0	suero	30,42	+	31,04	29,72	+
43	M	6	orina	-	-	30,04	-	-
44	F	1	suero	35,92	+	30,69	36,27	+
		1	orina	35,16	+	29,77	38,48	+
45	M	6	orina	-	-	30,06	-	-
46	M	4	suero	-	-	30,98	-	-
		4	orina	-	-	30,11	-	-
47	M	3	orina	34,23	+	30,42	36,50	+
48	M	2	orina	26,17	+	29,09	25,65	+
49	M	4	suero	-	-	30,08	-	-
		4	orina	-	-	30,23	-	-
50	F	6	orina	-	-	29,91	-	-
51	F	2	suero	35,04	+	32,35	34,74	+
52	F	3	suero	33,48	+	31,29	33,18	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
53	M	5	suero	-	-	29,69	-	-
		5	orina	-	-	30,04	-	-
54	F	1	suero	26,08	+	29,83	25,24	+
55	F	2	orina	-	-	30,02	-	-
56	F	6	suero	-	-	31,71	-	-
		6	orina	-	-	31,11	-	-
57	F	7	orina	-	-	30,10	-	-
58	F	4	suero	-	-	32,75	-	-
		4	orina	-	-	30,20	-	-
59	M	1	suero	-	-	30,41	-	-
		1	orina	-	-	29,87	-	-
60	M	0	suero	-	-	29,62	-	-
		0	orina	-	-	29,82	-	-
61	F	2	suero	-	-	30,52	-	-
62	F	7	orina	-	-	30,06	-	-
63	F	0	suero	-	-	31,47	-	-
		0	orina	-	-	29,74	-	-
64	F	7	orina	28,03	+	30,03	28,68	+
65	F	2	suero	37,79	+	29,33	38,15	+
		2	orina	36,07	+	29,47	37,66	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
66	F	2	suero	33,06	+	31,45	33,21	+
67	F	4	suero	30,66	+	29,53	30,19	+
68	M	1	suero	-	-	30,79	-	-
69	M	2	suero	35,08	+	31,68	35,14	+
70	F	3	orina	-	-	30,39	39,17	+
71	F	1	suero	-	-	29,83	-	-
72	M	1	suero	36,58	+	31,89	-	-
73	F	3	orina	33,36	+	30,55	32,98	+
74	F	4	suero	-	-	30,94	-	-
		4	orina	-	-	30,92	-	-
75	F	3	suero	35,03	+	29,82	35,30	+
76	M	3	suero	34,06	+	29,57	34,01	+
77	F	3	orina	35,02	+	31,02	34,66	+
78	F	6	suero	32,00	+	30,08	32,03	+
		6	orina	33,55	+	30,06	35,52	+
79	F	2	suero	34,99	+	29,65	36,29	+
		2	orina	26,59	+	29,72	26,94	+
80	M	3	suero	31,93	+	29,78	31,17	+
		3	orina	37,78	+	32,00	-	-

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
81	F	4	suero	35,07	+	31,86	35,32	+
		4	orina	34,51	+	30,83	36,42	+
82	F	1	suero	33,51	+	29,88	33,09	+
83	F	0	suero	26,83	+	33,66	26,55	+
		8	orina	19,37	+	-*	17,88	+
84	F	3	orina	34,83	+	30,38	35,38	+
85	M	5	orina	33,31	+	30,25	33,31	+
86	M	6	orina	-	-	30,52	-	-
87	M	3	suero	35,07	+	29,62	34,18	+
		3	orina	31,01	+	30,34	30,48	+
88	F	6	suero	-	-	29,54	-	-
		6	orina	28,58	+	30,67	28,01	+
89	F	3	suero	30,87	+	29,74	29,98	+
90	F	2	suero	28,58	+	29,51	27,77	+
91	F	1	suero	33,71	+	31,35	33,66	+
92	F	3	orina	35,60	+	30,03	38,29	+
93	M	3	suero	36,78	+	29,61	37,92	+
94	M	6	orina	-	-	30,34	38,81	+
95	F	3	suero	37,60	+	30,86	37,61	+
96	F	5	orina	33,77	+	30,35	34,09	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
97	M	3	suero	28,47	+	29,75	27,18	+
98	F	2	suero	32,09	+	32,02	31,38	+
		2	orina	37,64	+	31,16	38,33	+
99	F	1	orina	33,47	+	30,57	35,44	+
100	F	4	orina	-	-	30,31	-	-
101	M	7	orina	-	-	30,30	-	-
102	F	0	suero	-	-	32,62	-	-
103	F	3	orina	33,63	+	30,30	33,45	+
104	F	2	suero	36,05	+	32,30	36,08	+
		2	orina	37,63	+	30,10	38,13	+
105	F	0	suero	33,25	+	31,81	33,38	+
106	F	1	orina	34,63	+	29,89	35,41	+
107	F	2	suero	37,96	+	32,13	39,51	+
108	F	5	suero	33,81	+	29,98	33,68	+
		5	orina	35,89	+	30,31	36,57	+
109	F	1	suero	-	-	30,38	-	-
110	M	7	orina	-	-	30,61	-	-
111	F	1	suero	37,07	+	31,19	38,54	+
112	F	2	orina	35,76	+	29,94	-	-
113	F	2	suero	31,13	+	31,50	30,62	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _t (FAM™)	Call	C _t (VIC™)	C _t (FAM™)	Call
114	M	1	orina	-	-	29,83	-	-
115	F	5	suero	-	-	30,30	36,89	+
		5	orina	31,12	+	30,35	30,34	+
116	F	2	suero	35,75	+	30,80	37,02	+
117	F	3	orina	37,90	+	30,37	-	-
118	F	1	suero	35,27	+	33,39	35,16	+
119	F	3	suero	35,41	+	32,99	36,20	+
120	F	3	orina	36,50	+	29,81	-	-
121	M	6	orina	28,27	+	30,13	28,31	+
122	M	3	suero	30,27	+	29,45	29,05	+
123	M	1	suero	25,15	+	28,89	24,59	+
124	F	3	orina	34,03	+	30,57	35,76	+
125	F	5	orina	27,22	+	29,90	27,75	+
126	F	3	orina	34,14	+	30,02	35,86	+
		1	orina	37,81	+	30,20	-	-
127	F	2	suero	27,47	+	29,41	27,38	+
		6	suero	37,28	+	32,06	37,99	+
		6	orina	26,93	+	29,28	25,90	+
128	M	2	suero	29,58	+	29,62	28,76	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _i (FAM™)	Call	C _i (VIC™)	C _i (FAM™)	Call
129	F	3	suero	34,26	+	30,16	33,89	+
		3	orina	37,72	+	31,16	-	-
130	M	3	orina	35,43	+	30,31	35,13	+
131	F	0	suero	-	-	30,37	-	-
		0	orina	36,28	+	29,79	36,82	+
132	F	3	suero	30,58	+	29,49	30,10	+
133	F	4	suero	35,20	+	32,73	35,45	+
134	F	0	orina	-	-	29,62	-	-
135	M	4	suero	32,37	+	31,16	32,22	+
		4	suero	34,19	+	31,47	34,39	+
		4	orina	33,21	+	30,41	34,16	+
136	F	0	suero	36,58	+	32,12	37,04	+
137	F	3	orina	32,11	+	29,89	31,41	+
138	F	2	suero	34,84	+	30,31	34,56	+
139	M	3	orina	33,61	+	29,59	33,88	+
140	M	2	suero	31,01	+	30,44	30,39	+
		2	orina	33,44	+	30,17	33,48	+
141	F	4	orina	31,12	+	29,59	30,32	+
142	F	3	suero	33,65	+	29,54	33,50	+

ID del paciente	Género	Días después del inicio de los síntomas	Tipo de muestra	RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0			Real-time RT-PCR descrito por Lanciotti et al.	
				C _i (FAM™)	Call	C _i (VIC™)	C _i (FAM™)	Call
143	F	0	suero	29,11	+	30,82	28,39	+
		0	orina	35,88	+	29,89	37,81	+
144	F	0	suero	31,06	+	29,53	30,12	+
145	F	4	suero	33,29	+	32,66	33,17	+
146	F	4	orina	26,17	+	29,81	26,00	+
147	M	1	orina	-	-	30,58	-	-
148	M	5	orina	31,22	+	29,70	30,27	+
149	F	2	suero	30,07	+	30,23	29,81	+
150	F	0	suero	35,36	+	30,58	35,23	+
151	F	2	suero	28,97	+	30,06	28,29	+
152	F	5	suero	37,16	+	30,29	-	-
		5	orina	-	-	30,05	-	-
153	F	2	suero	-	-	30,16	-	-

* La detección del Control interno en el canal de detección VIC™ no es necesaria para resultados positivos en el canal de detección FAM™. Una carga alta de ARN de virus del Zika en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Control interno.

Análisis de resultados con respecto a muestras emparejadas de suero y orina

Se recogieron y se analizaron muestras emparejadas de orina y suero de 52 pacientes en el estudio. Se consideraba que un paciente estaba infectado por el virus del Zika (es decir, estado positivo de infección) si la muestra de suero o de orina arrojaba un resultado positivo para el ARN específico del virus del Zika con El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al. El estado de infección del paciente se consideraba negativo si tanto la muestra de suero como la de orina arrojaban un resultado negativo con El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al.

De las 52 muestras emparejadas analizadas, 23 mostraron un resultado positivo para la muestra de suero o de orina (es decir, estado de infección del paciente = positivo) con El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al., mientras que 29 muestras emparejadas dieron negativo para las muestras de suero y de orina (es decir, estado de infección del paciente = negativo). Los 23 pacientes con estado positivo de infección arrojaron también un resultado positivo con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® en la muestra de suero o de orina. De las 29 muestras de pacientes con estado negativo de infección, 28 arrojaron resultados negativos en ARN específico del virus del Zika en las muestras de suero y en las de orina del Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®. Un paciente con estado negativo de infección arrojó un resultado positivo en la muestra de suero y negativo en la de orina con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®.

En conclusión, la concordancia entre el porcentaje de positivos de los resultados generados con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® y los resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al. es del 100,0 %. La concordancia entre el porcentaje de positivos entre las dos pruebas de valoración es del 96,6 %. Los resultados se resumen en la tabla 16:

Tabla 16: Resumen de resultados para el estado de infección del paciente (detección de ARN del virus del Zika en suero o en orina de pacientes de los que se han tomado muestras emparejadas de suero y de orina). El número total de muestras emparejadas fue de 52.

Resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al.	Resultados del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
23 positivos	23 [†]		0
29 negativos	1*		28
Total (52 muestras emparejadas)	24		28
	95 % de CI		
Concordancia entre porcentaje de positivos	23/23	100,0 %	85,7 % - 100,0 %
Concordancia entre porcentaje de negativos	28/29	96,6 %	82,8 % - 99,4 %

* El paciente dio positivo únicamente en la muestra de suero y negativo en la de orina con el RealStar®. Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

† Cuatro de estos pacientes dieron positivo únicamente en la muestra de orina y negativo en la muestras de suero para las dos pruebas de valoración. Dos pacientes dieron positivo en la muestra de suero y negativo en la de orina con El test descrita por Lanciotti et al., pero positivo en las muestras de suero y de orina con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®. Un paciente dio positivo en la muestra de suero y negativo en la de orina con El test descrita por Lanciotti et al., pero positivo solo en la muestra de orina y negativo en la de suero con el RealStar®. Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Análisis de resultados con respecto tipo de muestra de suero

De las 103 muestras de suero incluidas en el estudio comparativo, 62 arrojaron resultados positivos para el ARN del virus del Zika con El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al., mientras que 41 arrojaron un resultado negativo. De las 62 muestras de suero positivas, 60 también dieron positivo con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, mientras que 2 dieron negativo. De las 41 muestras de suero que dieron negativo para el virus del Zika con El test de RT-PCR descrita por Lanciotti et al., 39 dieron negativo y 2 dieron positivo con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®.

En conclusión con respecto al tipo de muestra de suero, la concordancia entre el porcentaje de positivos de los resultados generados con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar® y los resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al. es del 96,8 %. La concordancia entre el porcentaje de positivos entre las dos pruebas de valoración es del 95,1%. Los resultados se resumen en la tabla 17:

Tabla 17: Resumen de resultados para la detección de ARN del virus del Zika en muestras de suero Total de muestras de suero: 103

Resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al.	Resultados del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
62 positivos	60		2
41 negativos	2		39
Total (103 muestras)	62		41
			95 % de CI
Concordancia entre porcentaje de positivos	60/62	96,8 %	89,0 % - 99,1 %
Concordancia entre porcentaje de negativos	39/41	95,1 %	83,9 % - 98,7 %

Análisis de resultados con respecto tipo de muestra de orina

De las 105 muestras de orina incluidas en el estudio comparativo, 49 arrojaron resultados positivos para el ARN del virus del Zika con El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al., mientras que 56 arrojaron un resultado negativo. De las 49 muestras de suero positivas, 46 también dieron positivo con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, mientras que 3 dieron negativo. De las 56 muestras de orina que dieron negativo para el virus del Zika con El test de RT-PCR descrita por Lanciotti et al., 50 dieron negativo y 6 dieron positivo con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®.

En conclusión, con respecto al tipo de muestra de orina, la concordancia entre el porcentaje de positivos de los resultados generados con el Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 de RealStar®, con los resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al. es del 93,9 %. La concordancia entre el porcentaje de positivos entre las dos pruebas de valoración es del 89,3%. Los resultados se resumen en la tabla 18:

Tabla 18: Resumen de resultados para la detección de ARN del virus del Zika en muestras de orina Total de muestras de orina: 105

Resultados de El test de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti et al.	Resultados del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0		
	Positivo		Negativo
49 positivos	46		3
56 negativos	6		50
Total (105 muestras)	52		53
			95 % de CI
Concordancia entre porcentaje de positivos	46/49	93,9 %	83,5 % - 98,0 %
Concordancia entre porcentaje de negativos	50/56	89,3 %	78,5 % - 95,0 %

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta test tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta el test no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración.
- La presencia de inhibidores de la RT-PCR (p.ej. heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones diana del genoma de ZIKV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Debido a la homología de secuencias entre el ARN del virus Usutu y la región objetivo utilizada para la detección del ARN específico del virus del Zika, no puede descartarse la reactividad cruzada con el ARN del virus Usutu. El virus Usutu es un virus aviar que rara vez infecta a humanos. No causa enfermedades graves o mortales en pacientes humanos y la infección suele permanecer asintomática.

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® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Servicio técnico

Si necesita asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro Servicio técnico:

E-mail: support@altona-diagnostics.com
Teléfono: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografía

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

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

16. Marcas comerciales e información legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, 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® Zika 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 con Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

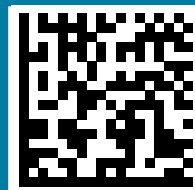
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de producto
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento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

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





República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: ALTONA DIAGNOSTICS ARGENTINA RÓTULOS E INSTRUCCIONES

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 34 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.04.13 10:45:37 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.04.13 10:45:37 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000472-23-0

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-000472-23-0

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por altaona Diagnostics Argentina SRL ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Marca comercial: RealStar®

Modelos:

RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit 1.0

Indicación/es de uso:

El RealStar® Zika 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 del virus del Zika (ZIKV) en suero u orina humano.

Forma de presentación: El kit permite 96 determinaciones y está compuesto por:

- Master A: 8 viales de 60 µl/vial
- Master B: 8 viales de 180 µl/vial
- Control interno (IC): 1 vial de 1000 µ
- Control positivo (PC): 1 vial de 250 µ
- Agua calidad PCR: 1 vial de 500 µ

Período de vida útil: 15 MESES - Condiciones de conservación: -25°C / -15°C

Nombre del fabricante:
altona Diagnostics GmbH

Lugar de elaboración:
Mörkenstrasse 12, 22767 Hamburgo, Alemania.

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 2436-24 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

Expediente N° 1-0047-3110-000472-23-0

N° Identificadorio Trámite: 45734

AM