

Aptima® Zika Virus Assay

Utilizar únicamente con autorización de uso de emergencia (EUA)

Solo con prescripción médica

Información general	2
Uso indicado2
Resumen y descripción de la prueba2
Principios del procedimiento3
Advertencias y precauciones4
Requisitos para el almacenamiento y la manipulación de los reactivos6
Recolección y almacenamiento de muestras7
Sistema Panther®	9
Reactivos y materiales proporcionados9
Materiales necesarios que se suministran por separado10
Materiales opcionales11
Procedimiento de prueba del sistema Panther11
Notas sobre el procedimiento17
Control de calidad	19
Criterios de aceptación del Aptima Zika Virus Assay19
Criterios de aceptación para la calibración y el cálculo del punto de corte19
Interpretación de los resultados	22
Restricciones	23
Ejecución	24
Límite de detección (LoD) de las muestras de plasma24
Inclusión: in silico25
Repetibilidad de las muestras de sangre27
Reactividad cruzada con otros patógenos de transmisión hemática en las muestras de sangre ..	.28
Reactividad cruzada e interferencia con otros microorganismos29
Análisis de reactividad cruzada: in silico29
Interferencia en las muestras de sangre31
Equivalencia de las matrices en las muestras de sangre32
Evaluación clínica de las muestras de sangre33
Prueba de especificidad adicional para las muestras de sangre34
Porcentaje de resultados no válidos para las muestras de sangre34
Evaluación de la ejecución con muestras de orina35
Evaluación de la sensibilidad analítica con material de referencia de la FDA37
Bibliografía	38

Información general

Uso indicado

El Aptima® Zika Virus Assay es una prueba de amplificación mediada por transcripción para la detección cualitativa del ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid, RNA) del virus del Zika en suero, plasma u orina procesada (obtenida junto con una muestra de suero o plasma de pacientes similares) de las personas que cumplen con los criterios clínicos del virus de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), por ejemplo, signos y síntomas clínicos relacionados con la infección de este virus, o los criterios epidemiológicos del virus de los CDC, como antecedentes de residencia o viajes a una región geográfica con transmisión activa del virus al momento del viaje u otros criterios epidemiológicos para los que se pueden indicar pruebas de detección del virus del Zika. Estas pruebas se llevan a cabo en laboratorios de los Estados Unidos certificados conforme a las Enmiendas para la mejora de laboratorios clínicos (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA) de 1988, 42 U.S.C. §263a, para realizar pruebas de alta complejidad, o en laboratorios que se encuentran fuera de los Estados Unidos que estén capacitados de igual manera.

Se utiliza el sistema Panther® para analizar las muestras en cuanto a su procesamiento automático, amplificación y detección. El objetivo de los resultados es identificar el RNA del virus del Zika. El RNA del virus del Zika, generalmente, se detecta en suero durante la fase aguda de la infección (aproximadamente catorce días después de la aparición de los síntomas, si existen). Los resultados positivos indican una infección activa. Los laboratorios deben informar todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.

Los resultados negativos no excluyen la presencia de una infección del virus del Zika ni deben utilizarse como el único fundamento para tomar las decisiones con respecto al manejo de los pacientes. Se debe combinar un resultado negativo con las observaciones clínicas, los antecedentes del paciente y la información epidemiológica.

El Aptima Zika Virus Assay está diseñado para ser utilizado por personal de laboratorios clínicos adiestrado específicamente en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*. Este ensayo solo puede usarse de acuerdo con la autorización de uso de emergencia (EUA) de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).

Resumen y descripción de la prueba

El virus del Zika (ZIKV) es un virus RNA miembro de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*.¹ Se transmite a los seres humanos mediante los mosquitos de la familia *Aedes*.² El ZIKV se identificó por primera vez en 1947 en el bosque Zika de Uganda en un macaco Rhesus infectado y, posteriormente, en 1952, se informaron los primeros casos en seres humanos en Uganda y la República Unida de Tanzania.³ Desde entonces, se han registrado brotes esporádicos de ZIKV en numerosas áreas de África y el Sudeste Asiático. La primera aparición de un brote de ZIKV fuera de Asia o África ocurrió en 2007, cuando se produjo un gran brote en la isla Yap del Pacífico, en los Estados Federados de Micronesia.⁴

En 2013 y 2014, se informó un importante brote de la enfermedad del ZIKV, asociado a complicaciones clínicas, en la Polinesia Francesa.⁵ En mayo de 2015, se confirmaron en Brasil los primeros casos de infección por ZIKV autóctonos en el continente americano.^{6,7} Desde comienzos de 2016, el ZIKV se ha propagado a otros países de América del Sur, América Central, México y el Caribe, incluidos los territorios estadounidenses de Puerto Rico y las Islas

Vírgenes.⁷ En general, se relaciona al ZIKV con enfermedades humanas que abarcan desde infecciones subclínicas a enfermedades leves similares a la influenza. Sin embargo, la infección por ZIKV se ha asociado también con casos graves y, en ocasiones, mortales del síndrome de Guillain-Barré.⁸ El virus también se ha relacionado con casos de microcefalia y otras anomalías congénitas en bebés nacidos de madres infectadas.⁹ Si bien la principal vía de infección parece ser la picadura del mosquito, también se han informado casos de contagio del ZIKV por transmisión sexual¹⁰ y, posiblemente, por transfusiones¹¹.

Principios del procedimiento

El Aptima Zika Virus Assay se enfoca en dos regiones altamente conservadas en las regiones NS2 y NS4/NS5 para tener una mayor tolerancia a las posibles mutaciones. El ensayo consta de tres pasos principales que se realizan en un único tubo en el sistema automatizado Panther: la preparación de la muestra; la amplificación selectiva del RNA del ZIKV mediante la amplificación mediada por transcripción (Transcription-Mediated Amplification, TMA)¹² y la detección de los productos amplificados (amplicón) mediante la prueba de protección de la hibridación (Hybridization Protection Assay, HPA).¹³ El ensayo incluye un control interno (Internal Control, IC) a fin de monitorear la captura, amplificación y detección del ácido nucleico, así como errores del operador o del instrumento.

Durante la preparación de la muestra, se aísla el RNA de las muestras mediante el uso de una captura selectiva. La muestra se trata con un detergente para solubilizar la envoltura viral, desnaturalizar las proteínas y liberar el RNA genómico del virus. Se realiza la hibridación de los oligonucleótidos (“oligonucleótidos de captura”) complementarios a las regiones altamente conservadas del ZIKV con la captura selectiva de RNA del ZIKV, si existiera, en la muestra de la prueba. El RNA hibridado es capturado por las micropartículas magnéticas que luego se separan de la muestra en un campo magnético. Se llevan a cabo las fases de lavado para eliminar los componentes extraños del tubo de reacción. La separación magnética y las fases de lavado se realizan con el sistema de capturas selectivas.

La amplificación selectiva se produce mediante la TMA, el cual es un método de amplificación de ácido nucleico basado en la transcripción que utiliza dos enzimas: transcriptasa al reverso MMLV y RNA polimerasa T7. La transcriptasa inversa se utiliza para generar una copia del ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid, DNA) (que contiene una secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7) de la secuencia selectiva del RNA. La RNA polimerasa T7 genera varias copias del amplicón del RNA a partir de la plantilla del DNA. En el Aptima Zika Virus Assay, se utiliza el método de TMA para amplificar las regiones del RNA del ZIKV.

La detección se lleva cabo mediante la HPA utilizando sondas de ácido nucleico monocatenario con marcadores quimioluminiscentes que se complementan con el amplicón. Las sondas de ácido nucleico marcadas se hibridan específicamente con el amplicón. El reactivo de selección diferencia las sondas hibridadas y no hibridadas mediante la inactivación de los marcadores de las sondas no hibridadas. Durante la fase de detección, se mide la señal quimioluminiscente producida por la sonda hibridada en un luminómetro y se registra como unidades relativas de luz (Relative Light Units, RLU).

Se agrega el control interno a cada muestra de la prueba y el calibrador del ensayo mediante el reactivo de captura selectiva de trabajo. En el control interno del Aptima Zika Virus Assay, se controlan las fases de procesamiento, amplificación y detección de las muestras. La señal del control interno se diferencia de la señal del ZIKV mediante la cinética diferencial de la emisión de luz de las sondas con diferentes marcadores.¹³ El amplicón específico del control interno se detecta por medio de una sonda con una rápida emisión de luz (una señal intermitente). El amplicón específico del ZIKV se detecta mediante sondas con una cinética relativamente más

lenta de emisión de luz (una señal resplandeciente). El ensayo de cinética dual (Dual Kinetic Assay, DKA) es un método que se utiliza para diferenciar las señales intermitentes y los marcadores resplandecientes.¹⁴

Los calibradores del Aptima Zika Virus Assay se usan a fin de determinar el punto de corte del ensayo y evaluar la validez de la ejecución del ensayo en cada prueba. Consulte *Control de calidad* para obtener información.

Advertencias y precauciones

- A. Para uso diagnóstico *in vitro*. Utilizar únicamente bajo la autorización de uso de emergencia (EUA).
- B. A fin de minimizar la posibilidad de obtener resultados inválidos, lea cuidadosamente este folleto por completo y el *Manual del usuario del sistema Panther* antes de realizar este ensayo.

Información sobre el laboratorio


- C. Solo personal debidamente adiestrado para llevar a cabo el Aptima Zika Virus Assay y para manipular materiales posiblemente infecciosos debe realizar este procedimiento. En caso de derrame, desinfecte inmediatamente de acuerdo con los procedimientos correspondientes del laboratorio.
- D. Utilice únicamente instrumentos desechables para laboratorio que se hayan proporcionado o especificado.
- E. Siga las precauciones de rutina para los laboratorios. No utilice la boca para succionar por pipeta. No coma, beba ni fume en las áreas de trabajo designadas. Use guantes desechables sin talco, gafas protectoras y batas de laboratorio cuando manipule las muestras y los reactivos del kit. Lávese las manos cuidadosamente después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- F. Las superficies de trabajo, las pipetas y demás equipos se deben descontaminar regularmente con una solución de hipoclorito de sodio en una concentración entre el 2,5 % y el 3,5 % (0,35 M a 0,5 M).
- G. Deseche todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos, según las normas locales, estatales y federales.^{15,16,17,18} Limpie y desinfecte cuidadosamente todas las superficies de trabajo.
- H. El reactivo enzimático contiene azida de sodio como preservativo. No utilice tubos de metal para transferir los reactivos. Si se desechan soluciones que contienen compuestos de azida de sodio en el sistema de tuberías, se deben diluir y enjuagar con cantidades abundantes de agua corriente. Se recomienda seguir las siguientes precauciones para evitar la acumulación de sedimentos en las tuberías de metal donde se podrían generar condiciones propicias para una explosión.

Información relacionada con las muestras

- I. Las muestras pueden ser infecciosas. Cuando se lleve a cabo este ensayo, siga las precauciones universales.^{15,16,17} Se deben establecer los métodos de manipulación y eliminación de desechos adecuados conforme a las regulaciones locales.¹⁸ Solo personal debidamente adiestrado para llevar a cabo el Aptima Zika Virus Assay y para manipular materiales posiblemente infecciosos debe realizar este procedimiento.
- J. Es obligatorio seguir los procedimientos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras que se describen en este folleto para que la prueba se realice en óptimas condiciones. Si se lleva a cabo la recolección, el transporte y el almacenamiento de las muestras de manera indebida, se pueden obtener resultados incorrectos.
- K. Mantenga las condiciones de almacenamiento adecuadas durante el transporte de las muestras para garantizar su integridad. No se ha evaluado la estabilidad de las muestras en condiciones de traslado distintas a las recomendadas.
- L. Evite la contaminación cruzada durante las fases de manipulación de las muestras. Sea particularmente cuidadoso cuando desenrosque o destape las muestras a fin de evitar la contaminación por medio de la propagación de aerosoles. Las muestras pueden contener niveles extremadamente altos de organismos. Asegúrese de que los recipientes de las muestras no estén en contacto entre sí y deseche los materiales usados sin pasar sobre los recipientes abiertos. Cámbiese de guantes si hay contacto con la muestra.

Información relacionada con el ensayo

- M. No utilice el kit de reactivos ni los calibradores después de la fecha de vencimiento.
- N. No intercambie, mezcle ni combine los reactivos del ensayo de kits con diferentes números de lote maestro. Los líquidos del ensayo pueden tener distintos números de lote.
- O. Evite la contaminación microbiana y con nucleasas de los reactivos.
- P. Tape y almacene todos los reactivos del ensayo a las temperaturas indicadas. La ejecución del ensayo puede verse afectada por el uso de reactivos almacenados inadecuadamente. Consulte *Requisitos para el almacenamiento y la manipulación de los reactivos y Procedimiento de prueba del sistema Panther* para obtener más información.
- Q. No combine los reactivos ni los líquidos del ensayo sin una indicación específica. No rellene ni mezcle los reactivos ni los líquidos. El sistema Panther verifica los niveles de los reactivos.
- R. Algunos reactivos de este kit están marcados con símbolos de riesgo y seguridad, y deben ser manipulados como corresponden. Las hojas de datos de seguridad se pueden obtener en el sitio web del fabricante.

El reactivo de selección contiene ácido bórico e hidróxido de sodio.	
	<p>ADVERTENCIA</p> <p>H315: Causa irritación cutánea H319: Causa irritación grave en los ojos</p>

Nota: Para obtener información sobre las declaraciones de peligro y precaución relacionadas con los reactivos, consulte la biblioteca de hojas de datos de seguridad en www.hologic.com/sds.

Requisitos para el almacenamiento y la manipulación de los reactivos

- A. En el siguiente cuadro, se muestran las condiciones de almacenamiento y la estabilidad de los reactivos y calibradores.

Reactivo	Almacenamiento cerrado	Kit abierto (descongelado) ^a	
		Almacenamiento	Estabilidad
Reactivo de amplificación	Entre -35 °C y -15 °C	Entre 2 °C y 8 °C	30 días ^b
Reactivo enzimático	Entre -35 °C y -15 °C	Entre 2 °C y 8 °C	30 días ^b
Reactivo de sonda	Entre -35 °C y -15 °C	Entre 2 °C y 8 °C	30 días ^b
Control interno	Entre -35 °C y -15 °C	Entre 15 °C y 30 °C	8 horas antes de la combinación con el TCR
Reactivo de captura selectiva (TCR)	Entre 2 °C y 8 °C	N/C	N/C
Reactivo de captura selectiva de trabajo (wTCR)	N/C	Entre 2 °C a 8 °C	30 días ^b
Reactivo de selección	Entre 15 °C y 30 °C	Entre 15 °C y 30 °C	30 días ^b
NCAL (Calibrador negativo)	Entre -35 °C y -15 °C	N/C	Vial de uso único Usar dentro de las 8 horas
PCAL (Calibrador positivo)	Entre -35 °C y -15 °C	N/C	Vial de uso único Usar dentro de las 8 horas

^a Las condiciones de almacenamiento y estabilidad del kit abierto se basan en ensayos similares validados.

^b Cuando se extraen los reactivos del sistema Panther, deben ser devueltos de inmediato a las temperaturas de almacenamiento adecuadas.

- B. Elimine cualquier reactivo previamente preparado que no se haya usado y los reactivos de captura selectiva de trabajo después de 30 días.
- C. Los reactivos que se almacenan dentro del sistema Panther tienen 120 horas (acumuladas) de estabilidad. El sistema Panther registra cada vez que se cargan los reactivos.
- D. Si se genera un precipitado en el reactivo de captura selectiva (TCR) durante el almacenamiento, consulte las instrucciones en *Preparación de un kit nuevo*. **NO UTILIZAR UN MEZCLADOR TIPO VÓRTEX. NO CONGELAR EL TCR.**
- E. No vuelva a congelar los reactivos de control interno, amplificación, sonda y enzimáticos después de descongelarlos por primera vez.
- F. Los calibradores son viales de un solo uso y deben desecharse después de utilizarlos.
- G. Si se genera un precipitado en el reactivo de selección, el reactivo de sonda, el calibrador negativo o el calibrador positivo, consulte las instrucciones en *Procedimiento de prueba del sistema Panther*.
- H. Si cambia el aspecto físico del reactivo proporcionado, esto puede ser indicio de inestabilidad o deterioro de los materiales. Si se observan cambios en el aspecto físico de los reactivos, estos no deben utilizarse (por ejemplo, cambios evidentes en el color o el tono turbio del reactivo pueden indicar una contaminación microbiana).
- I. Después de descongelar los calibradores, la solución debe ser transparente; no debe ser turbia ni tener precipitados.

- ⚠ J. El reactivo de sonda es fotosensible. Proteja al reactivo de la luz durante el almacenamiento y la preparación para su uso.

Recolección y almacenamiento de muestras

El Aptima Zika Virus Assay se puede utilizar con muestras de suero, plasma y orina procesada.

Las muestras de orina procesada se obtienen cuando se agrega orina pura al medio de transporte contenido en el tubo de transporte de muestras de orina Aptima.

Nota: Una muestra de orina no debe ser la única muestra de un paciente para análisis. Si se analiza una muestra de orina del paciente, esta se debe recolectar junto con una muestra de sangre.

Nota: Manipule todas las muestras como si tuvieran agentes posiblemente infecciosos. Respete las precauciones universales.

Nota: Tenga cuidado para evitar la contaminación cruzada durante las fases de manipulación de las muestras. Por ejemplo, deseche el material utilizado sin pasar por encima de los tubos abiertos. Pueden producirse resultados falsos positivos si no se controla adecuadamente la contaminación cruzada de las muestras durante las fases de manipulación y procesamiento de las muestras.

Nota: El volumen mínimo de suero o plasma es de 1200 µL para los tubos de recolección primarios, y de 700 µL para los tubos de alícuotas de muestras (Specimen aliquot tube, SAT) a fin de obtener el volumen de reacción de 500 µL.

A. Instrucciones para la recolección

Consulte el folleto del kit de recolección de muestras apropiado para conocer las instrucciones para la recolección.

1. Muestras de plasma y suero

Las muestras de sangre completa recopiladas en los siguientes tubos de vidrio o plástico se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes:

- Tubos que contienen anticoagulantes de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); ácido, citrato y dextrosa con adenina (ACD-A); o citrato de sodio (NAC).
- Tubos para la preparación de plasma (Plasma preparation tube, PPT).
- Tubos para suero.
- Tubos separadores de suero (Serum separator tube, SST).

Para las muestras de suero, permita que se forme el coágulo antes de continuar con el procesamiento.

2. Muestras de orina

Las muestras de orina deben recolectarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

B. Transporte y almacenamiento de las muestras antes de las pruebas

1. Las muestras de sangre completa se deben centrifugar antes de que transcurran 72 horas de su recolección.

Muestras de plasma y suero

Las muestras de plasma y suero pueden almacenarse durante un total de 13 días desde el momento de la recolección hasta el momento de las pruebas, con las siguientes condiciones:

- La sangre completa se puede almacenar durante 72 horas a temperaturas de hasta 25 °C, y hasta 24 horas, de esas 72 horas, a temperaturas de hasta 30 °C. La sangre completa no se debe congelar.
 - Después de que las muestras de sangre completa se han centrifugado, en el plazo de 72 horas posteriores a su recolección, las muestras de plasma y suero se deben almacenar a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante 10 días como máximo, a menos que se congelen.
 - a. Si es necesario un almacenamiento más prolongado, el plasma y el suero se deben congelar separados de los glóbulos y almacenar a una temperatura de -20 °C o -70 °C.
 - b. No se han observado efectos adversos en la ejecución del ensayo cuando las muestras de plasma y suero se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación.
 - c. Asegúrese de que las muestras de plasma y suero tengan suficiente volumen de muestra por encima del separador de gel o la interfase de glóbulos rojos.
 - d. Las muestras con precipitado visible o material fibrinoso deben clarificarse centrifugándolas durante 10 minutos a razón de entre 1000 y 3000 g antes de la prueba.
2. Muestras de orina
- a. La orina debe almacenarse a una temperatura de 2 °C a 30 °C y debe transferirse a un tubo de transporte de muestras de orina Aptima, que contiene el medio de transporte de la orina, y mezclarse por completo antes de que transcurran 72 horas. Consulte el folleto de instrucciones del kit de recolección apropiado.
 - b. Almacene la muestra mezclada de orina procesada a una temperatura de 2 °C a 30 °C y realice la prueba en un plazo de 30 días a partir de su recolección. Si es necesario un almacenamiento más prolongado, la muestra de orina procesada se debe congelar a una temperatura de -20 °C o -70 °C.
 - c. No se han observado efectos adversos en la ejecución del ensayo cuando la orina procesada se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación.
 - d. Asegúrese de que las muestras tengan suficiente volumen de muestra.
 - e. Las muestras con precipitado visible o material fibrinoso deben clarificarse centrifugándolas durante 10 minutos a razón de entre 1000 y 3000 g antes de la prueba.
- C. Almacenamiento de las muestras después de las pruebas
1. Las muestras que se han sometido al ensayo deben almacenarse en posición vertical en una gradilla.
 2. Los tubos de muestras deben cubrirse con una nueva barrera limpia de aluminio o película plástica.
 3. Si las muestras sometidas a ensayo deben congelarse o trasladarse, coloque tapas nuevas a los tubos de muestras. Si las muestras deben trasladarse para realizar pruebas en otro establecimiento, se deben mantener las temperaturas recomendadas. Antes de destapar las muestras previamente analizadas y vueltas a tapar, los tubos de muestras se deben centrifugar brevemente (5 minutos a 500 g) para llevar todo el líquido al fondo del tubo. **Evite las salpicaduras y la contaminación cruzada.**

Nota: Las muestras deben trasladarse de acuerdo con las normas regionales, nacionales e internacionales de transporte vigentes.

Sistema Panther®

A continuación, se indican los reactivos del Aptima Zika Virus Assay para el sistema Panther. También figuran los símbolos de identificación junto al nombre de los reactivos.

Reactivos y materiales proporcionados

Nota: Para obtener información sobre las declaraciones de peligro y precaución relacionadas con los reactivos, consulte la biblioteca de hojas de datos de seguridad en www.hologic.com/sds.

Los kits de calibradores de Aptima Zika Virus se deben adquirir por separado. Consulte a continuación los números de catálogo individuales de cada kit.

Kit de Aptima Zika Virus Assay, 1000 pruebas (4 x 250 pruebas)
N.º de referencia: PRD-04037-D (3 cajas de ensayos)

Caja del Aptima Zika Virus Assay

(almacenar a una temperatura entre -35 °C y -15 °C después de su recepción)

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación <i>Ácidos nucleicos no infecciosos en solución amortiguadora.</i>	4 x 26 ml
E	Reactivo enzimático <i>Transcriptasa inversa y RNA polimerasa en solución amortiguadora HEPES.</i>	4 x 13,4 ml
P	Reactivo de sonda <i>Sondas quimioluminiscentes en solución amortiguadora de succinato.</i>	4 x 34,7 ml
IC	Reactivo de control interno <i>Solución amortiguadora HEPES con detergente y una transcripción de RNA.</i>	4 x 2,8 ml
	Hoja de códigos de barras del lote maestro	1 hoja

Caja del Aptima Zika Virus Assay

(almacenar a una temperatura entre 15 °C y 30 °C después de su recepción)

Símbolo	Componente	Cantidad
S	Reactivo de selección <i>Solución amortiguadora de borato de 600 mM con agente tensoactivo.</i>	4 x 91 ml

Caja del Aptima Zika Virus Assay

(almacenar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C después de su recepción)

Símbolo	Componente	Cantidad
TCR	Reactivo de captura selectiva <i>Una solución salina amortiguadora que contiene ácidos nucleicos no infecciosos en fase sólida.</i>	4 x 161 ml

Materiales necesarios que se suministran por separado

Nota: A menos que se indique lo contrario, los materiales que están disponibles a través de Hologic aparecen en la lista con el número de referencia.

Material	N.º de referencia
Sistema Panther	—
El kit de líquidos para el Aptima Assay (también denominado kit universal de líquidos) <i>incluye la solución de lavado Aptima, la solución amortiguadora Aptima para el líquido de desactivación y el reactivo de aceite Aptima.</i>	303014 (1000 pruebas)
Kit de detección automática Aptima	303013 (1000 pruebas)
Unidades multitubo (Multi-Tube Units, MTU)	104772-02
Kit de bolsas de residuos Panther	902731
Funda para el contenedor de residuos Panther	504405
El kit de ejecución del sistema Panther <i>incluye MTU, bolsas de residuos, tapas para el contenedor de residuos, kits de detección automática y líquidos para el ensayo.</i>	303096 (5000 pruebas)
Puntas conductoras de 1.000 µl para la detección de líquidos	10612513 (Tecan)
Kit de calibradores Aptima para el virus del Zika <i>Calibrador negativo, solución amortiguadora con detergente, 15 x 2,2 ml</i> <i>Calibrador positivo, transcripción de RNA en solución amortiguadora con detergente, 15 x 2,2 ml</i>	PRD-04039-D
Lejía, solución de hipoclorito de sodio en una concentración entre el 5 % y el 7 % (0,7 M a 1,0 M)	—
Guantes desechables sin talco	—
Tapas no perforables de repuesto	103036A
Tapas de repuesto para 250 frascos de ensayo de los reactivos <i>Reactivos de amplificación y de sonda</i> CL0042 (100 tapas) <i>Reactivo enzimático</i> 501619 (100 tapas) <i>TCR y reactivos de selección</i> CL0039 (100 tapas)	
Fundas para mesas de laboratorio con recubrimiento de plástico	—
Paños sin pelusas	—
Pipeteador	—
Picos	—
Se pueden utilizar tubos de recolección primarios de muestras de sangre con las siguientes dimensiones: 13 mm x 100 mm 13 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	—
Centrifugadora	—
Mezclador tipo vórtex	—

Materiales opcionales

Material	N.º de referencia
Tubos de alícuotas de muestras (SAT) Aptima (paquete de 100)	503762
Tapa del tubo de transporte (paquete de 100) <i>Tapa para los SAT</i>	504415
Pipetas de transferencia	—
Hisopos con punta de algodón	—
Mezclador de tubos	—
Kit de recolección de muestras de orina Aptima	301040
Tubos de transporte de muestras de orina Aptima	105575
Sistema de equilibrio de reactivos SB100 (SB100-RES)	—
Baño de agua	—

Procedimiento de prueba del sistema Panther

Nota: Consulte el Manual del usuario del sistema Panther para obtener información adicional sobre el procedimiento.

A. Preparación del área de trabajo

1. Limpie las superficies de trabajo donde se prepararán los reactivos. Utilice un paño para limpiar las superficies de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio en una concentración entre el 2,5 % y el 3,5 % (0,35 M a 0,5 M). Deje que la solución entre en contacto con las superficies durante, al menos, 1 minuto y, luego, enjuague con agua desionizada (DI). No permita que se seque la solución de hipoclorito de sodio. Cubra la superficie de la mesa del laboratorio con una cubierta absorbente con la parte posterior plastificada limpia.
2. Limpie otra superficie de trabajo para preparar las muestras. Siga el procedimiento que se describe anteriormente (paso A.1).
3. Limpie los pipeteadores. Siga el procedimiento de limpieza que se describe anteriormente (paso A.1).

B. Preparación de un kit nuevo

Advertencia: Evite que se forme espuma excesiva en el reactivo. La espuma afecta el nivel de detección del sistema Panther.

Nota: El reactivo de sonda es fotosensible. Protéjalo de la exposición a la luz durante el almacenamiento y la manipulación de los reactivos.

Nota: Los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda se pueden descongelar durante 24 horas como máximo a una temperatura entre 2 °C y 8 °C antes de preparar los reactivos.

Nota: El control interno se puede descongelar durante 24 horas como máximo a una temperatura entre 2 °C y 8 °C o durante un máximo de 8 horas a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C), antes de preparar el reactivo de captura selectiva de trabajo (Working Target Capture Reagent, wTCR).

Preparación del reactivo de captura selectiva (Target Capture Reagent, TCR), el reactivo de amplificación, el enzimático y el de sonda

1. Retire un nuevo conjunto de reactivos del lugar de almacenamiento. Verifique que los números de lote en los frascos de los reactivos coinciden con los números de lote en la hoja de códigos de barras del lote maestro.
2. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) con una de las tres opciones que se describen a continuación:

Preparación con el sistema SB100-RES (opción 1)

1. **Inmediatamente** después de retirar el TCR del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), invierta el frasco del reactivo vigorosamente para mezclar el gel y la solución (realice, al menos, 10 inversiones hasta que no se observen rastros de gel en la parte inferior). **NO UTILIZAR UN MEZCLADOR TIPO VÓRTEX.**
2. Prepare el TCR, el reactivo de amplificación, el enzimático y el de sonda con el sistema SB100-RES.
3. Después de descargar los reactivos, registre la fecha de la descongelación de los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda en el espacio proporcionado en la etiqueta.

Preparación con el baño de agua (opción 2)

Advertencia: La temperatura del baño de agua no debe superar los 30 °C.

Nota: Consulte las instrucciones de la preparación a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) para preparar el TCR. No utilice el baño de agua para preparar el TCR.

1. Después de retirar los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda del lugar de almacenamiento (que se encuentran a una temperatura entre -35 °C y -15 °C o entre 2 °C y 8 °C), colóquelos en posición vertical en un baño de agua específico a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Invierta suavemente los reactivos, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos por completo y examínelos visualmente para asegurarse de que se hayan disuelto los precipitados. Siga invirtiéndolos y examinándolos visualmente hasta que no se observen precipitados.
2. Asegúrese de que se hayan disuelto los precipitados. No utilice el reactivo si presenta una formación de gel, de precipitado o si tiene un tono turbio.
3. Registre la fecha de descongelación de los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda en el espacio proporcionado en la etiqueta.

Preparación a temperatura ambiente (opción 3)

Nota: Descongelar completamente el reactivo de sonda que está almacenado a una temperatura entre -35 °C y -15 °C puede tardar hasta 4 horas a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) con inversiones suaves, al menos, cada 10 minutos.

1. Para preparar el TCR, siga los siguientes pasos:
 - a. **Inmediatamente** después de retirar el TCR del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), invierta el frasco del reactivo vigorosamente para mezclar el gel y la solución (realice, al menos, 10 inversiones hasta que no se observen rastros de gel en la parte inferior). **NO UTILIZAR UN MEZCLADOR TIPO VÓRTEX.**

- b. Deje que el frasco del TCR permanezca a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante, al menos, 45 minutos. Invierta suavemente el frasco del TCR, al menos, cada 10 minutos (realice 10 inversiones como mínimo) para mezclarlos completamente y examínelos visualmente para asegurarse de que no se observen rastros de gel.
- c. Asegúrese de que el gel se disuelva y que las partículas magnéticas estén suspendidas antes de usarlo.

Nota: No lo use si se observan rastros de gel. Vuelva a colocar el frasco del TCR en el lugar de almacenamiento (a una temperatura entre 2 °C y 8 °C) para usarlo más adelante. Retire un nuevo frasco de TCR del lugar de almacenamiento (a una temperatura entre 2 °C y 8 °C) y repita los pasos 1.a a 1.c.

2. Para preparar los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda, siga los siguientes pasos:
 - a. Después de retirar los reactivos del lugar de almacenamiento (que se encuentran a una temperatura entre -35 °C y -15 °C o entre 2 °C y 8 °C), colóquelos en posición vertical a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Invierta suavemente los reactivos, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos por completo y examínelos visualmente para asegurarse de que se hayan disuelto los precipitados. Siga descongelando los reactivos hasta que no se observen precipitados.
3. Asegúrese de que se hayan disuelto los precipitados. No utilice el reactivo si presenta una formación de gel, de precipitado o si tiene un tono turbio.
4. Registre la fecha de descongelación de los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda en el espacio proporcionado en la etiqueta.

Preparación del control interno y el reactivo de captura seleccionado de trabajo (wTCR)

Nota: No utilice el sistema SB100-RES para preparar el control interno.

1. Para preparar el control interno, siga los siguientes pasos:
 - a. Retire un tubo de control interno del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre -35 °C y -15 °C o entre 2 °C y 8 °C).
 - b. Después de retirarlo del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre -35 °C y -15 °C o entre 2 °C y 8 °C), déjelo a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante, al menos, 30 minutos.

Opción: El tubo de control interno se puede colocar en un baño de agua a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C).

- c. Invierta suavemente el tubo de control interno, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos completamente y examine que no se observen rastros de gel. Antes de usarlo, asegúrese de que el gel se haya disuelto.

Opción: El tubo de control interno se puede colocar en un mezclador de tubos para mezclar el contenido completamente durante la preparación a temperatura ambiente.

Nota: Si observa la formación de gel, este debe disolverse antes usarlo durante el período de descongelación de 8 horas a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). No lo utilice si se observan rastros de gel. Deseche el tubo, obtenga un tubo de control interno nuevo y repita los pasos 1.a a 1.c.

2. Para preparar el wTCR, siga los siguientes pasos:

- a. Una vez que el TCR esté listo para usar, vierta todo el contenido del tubo de control interno en el frasco del TCR. Tape el frasco del TCR e inviértalo suavemente para mezclarlo completamente.
- b. En el espacio indicado en el frasco del TCR, registre la fecha en la que se agregó el control interno, la fecha de vencimiento del wTCR (la fecha en la que se agregó el control interno más 30 días), el número de lote del control interno (IC LOT) y las iniciales del operador.
- c. Conserve el tubo de control interno, ya que es necesario para escanear el código de barras en el sistema Panther.

Preparación del reactivo de selección

Nota: No lo utilice si hay precipitados o si se observa un tono turbio.

1. Para preparar el reactivo de selección, siga los siguientes pasos:
 - a. Retire un frasco de reactivo de selección del lugar de almacenamiento a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Verifique el número de lote del frasco del reactivo para asegurarse de que coincida con el número de lote de la hoja de códigos de barras del lote maestro.
 - b. Invierta suavemente el frasco para mezclarlos por completo y examínelo visualmente para asegurarse de que no haya precipitados ni que se observe un tono turbio.
 - c. Registre la fecha en la que se abrió por primera vez (Open Date) en el espacio indicado en la etiqueta.

Nota: Restablecimiento del reactivo de selección: Si el reactivo de selección se ha almacenado inadvertidamente a una temperatura entre 2 °C a 8 °C o si la temperatura del laboratorio desciende a menos de 15 °C, se pueden formar precipitados. Si se forman precipitados en el reactivo de selección durante el almacenamiento, calentarlos a 60 °C ± 1 °C durante no más de 45 minutos y mezclar suavemente el frasco con frecuencia (cada 5 o 10 minutos). Una vez que el precipitado se disuelve en la solución, coloque el frasco en un baño de agua a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) y deje que se estabilice durante, al menos, 1 hora.

C. Preparación del calibrador

Nota: Evite que se forme espuma excesiva al invertir los calibradores. La espuma afecta el nivel de detección del sistema Panther.

Nota: No utilice el sistema SB100-RES para descongelar los calibradores.

1. Después de retirar los calibradores del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre -35 °C y -15 °C), déjelos a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante, al menos, 30 minutos.

Opción: Los calibradores se pueden colocar en un baño de agua a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C).

2. Invierta suavemente el tubo de control interno, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos por completo. Asegúrese de que el contenido de los tubos esté totalmente descongelado antes de usarlo.

Opción: Los calibradores se pueden colocar en un mezclador de tubos para mezclar el contenido completamente durante la preparación a temperatura ambiente.

3. Si observa la formación de gel, invierta suavemente el tubo hasta que desaparezca.

Nota: Si observa la formación de gel, este debe disolverse antes usarlo durante el período de descongelación de 8 horas a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). No lo utilice si se observan rastros de gel. Deseche los tubos, obtenga tubos de calibradores nuevos y repita los pasos C.1 a C.3.

4. Cuando el contenido del tubo se haya descongelado totalmente, seque la parte exterior del tubo con un paño desechable, seco y limpio.
5. Para evitar la contaminación, no abra los tubos de los calibradores en este momento.

D. Preparación de reactivos previamente preparados

Preparación del wTCR, del reactivo de amplificación, el enzimático y el de sonda

1. Retire el wTCR y los reactivos preparados previamente del lugar de almacenamiento.
2. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) con una de las tres opciones que se describen a continuación:

Preparación con el sistema SB100-RES (opción 1)

1. **Inmediatamente** después de retirar el TCR del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), invierta el frasco vigorosamente para mezclar el gel y la solución (realice, al menos, 10 inversiones hasta que no se observen rastros de gel en la parte inferior). **NO UTILIZAR UN AGITADOR TIPO VÓRTEX.**
2. Prepare el wTCR, el reactivo de amplificación, el enzimático y el de sonda con el sistema SB100-RES.

Preparación con el baño de agua (opción 2)

Advertencia: La temperatura del baño de agua no debe superar los 30 °C.

Nota: Consulte las instrucciones de la preparación a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) para preparar el wTCR. No utilice el baño de agua para preparar el wTCR.

1. Después de retirar los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda del lugar de almacenamiento (que se encuentran a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), colóquelos en posición vertical en un baño de agua específico a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Invierta suavemente los reactivos, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos por completo y examínelos visualmente para asegurarse de que se hayan disuelto los precipitados. Siga descongelando los reactivos hasta que no se observen precipitados.
2. Asegúrese de que se hayan disuelto los precipitados. No utilice el reactivo si presenta una formación de gel, de precipitado o si tiene un tono turbio.

Preparación a temperatura ambiente (opción 3)

1. Para preparar el wTCR, siga los siguientes pasos:
 - a. **Inmediatamente** después de retirar el wTCR del lugar de almacenamiento (que se encuentra a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), invierta el frasco del reactivo vigorosamente para mezclar el gel y la solución (realice, al menos, 10 inversiones hasta que no se observen rastros de gel en la parte inferior). **NO UTILIZAR UN MEZCLADOR TIPO VÓRTEX.**
 - b. Deje que el frasco del wTCR permanezca a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante, al menos, 45 minutos. Invierta suavemente el frasco del wTCR, al menos, cada 10 minutos (realice 10 inversiones como mínimo) para mezclarlos por

completo y examínelos visualmente para asegurarse de que no se observen rastros de gel.

- c. Asegúrese de que el gel se disuelva y que las partículas magnéticas estén suspendidas antes de usarlo.

Nota: No lo use si se observan rastros de gel. Vuelva a colocar el frasco del wTCR y los reactivos correspondientes en el lugar de almacenamiento (a una temperatura entre 2 °C y 8 °C) para usarlo más adelante.

2. Para preparar los reactivos de amplificación, enzimáticos y de sonda, siga los siguientes pasos:
 - a. Después de retirar los reactivos del lugar de almacenamiento (que se encuentran a una temperatura entre 2 °C y 8 °C), colóquelos en posición vertical a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C). Invierta suavemente los reactivos, al menos, cada 10 minutos para mezclarlos por completo y examínelos visualmente para asegurarse de que se haya disuelto el precipitado. Siga descongelando los reactivos hasta que no se observen precipitados.
3. Asegúrese de que se hayan disuelto los precipitados. No utilice el reactivo si presenta una formación de gel, de precipitado o si tiene un tono turbio.

Preparación del reactivo de selección

Nota: No lo utilice si hay precipitados o si se observa un tono turbio.

1. Retire un frasco de reactivo de selección correspondiente del lugar de almacenamiento a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C).
2. Invierta suavemente el frasco para mezclarlos por completo y examínelo visualmente para asegurarse de que no haya precipitados ni que se observe un tono turbio.

Nota: Restablecimiento del reactivo de selección: Si el reactivo de selección se ha almacenado inadvertidamente a una temperatura entre 2 °C a 8 °C o si la temperatura del laboratorio desciende a menos de 15 °C, se pueden formar precipitados. Si se forman precipitados en el reactivo de selección durante el almacenamiento, calentarlos a 60 °C ± 1 °C durante no más de 45 minutos y mezclar suavemente el frasco con frecuencia (cada 5 o 10 minutos). Una vez que el precipitado se disuelve en la solución, coloque el frasco en un baño de agua a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) y deje que se estabilice durante, al menos, 1 hora.

E. Manipulación de las muestras

1. Deje que las muestras y los calibradores alcancen una temperatura entre 15 °C y 30 °C antes de realizar el procesamiento.
2. Asegúrese de que cada tubo de muestra contenga suficiente volumen para cada tipo de muestra y tipo de tubo.
3. Mezcle completamente las muestras frescas o descongeladas.
4. Justo antes de cargar las muestras en la gradilla, coloque cada muestra en la centrifugadora a aceleraciones de 1000 a 3000 g durante 10 minutos. No retire las tapas. Las burbujas en el tubo afectan la detección del nivel del sistema Panther. Las duraciones y velocidades de centrifugación para llevar hacia abajo todo el líquido y los precipitados deben ser validadas por el usuario. Si el precipitado no vuelve a incorporarse en la solución, verifique visualmente que el precipitado no impida la entrega de la muestra.

Consulte *Preparación del sistema*, el paso F.2 a continuación, para obtener información sobre cómo cargar la gradilla y retirar las tapas.

F. Preparación del sistema

1. Configurar el sistema de acuerdo con las instrucciones del *Manual del usuario del sistema Panther* y *Notas sobre el procedimiento*. Asegúrese de utilizar las gradillas del tamaño correcto para los reactivos y los adaptadores de TCR.
2. Cargue las muestras en la gradilla. Siga los siguientes pasos para cada tubo de muestra (la muestra y, si es necesario, el calibrador):
 - a. Afloje la tapa de un tubo de muestra, pero no la retire.
Nota: *Sea particularmente cuidadoso a fin de evitar la contaminación por medio de la propagación de aerosoles. Suavemente afloje las tapas de las muestras.*
 - b. Cargue el tubo de muestras en la gradilla.
 - c. Repita los pasos 2.a y 2.b para cada muestra restante.
 - d. Después de cargar las muestras en la gradilla, retire y deseche todas las tapas de los tubos de muestra de una gradilla. Para evitar la contaminación, no pase las tapas por encima de otras gradillas o tubos de muestra. También se deben retirar y desechar las tapas perforables del tubo de transporte de muestras de orina Aptima.
 - e. Si es necesario, utilice una pipeta de transferencia nueva y desechable para quitar las burbujas o la espuma.
 - f. Una vez que haya retirado la última tapa, cargue la gradilla en el compartimento de muestras.
Nota: *Si realiza otros ensayos y utiliza otros tipos de muestras al mismo tiempo, fije el soporte de las muestras antes de cargar la gradilla en el compartimento.*
 - g. Repita los pasos 2.a a 2.f para la siguiente gradilla con muestras.

Notas sobre el procedimiento

A. Calibradores

1. Los tubos de calibración se pueden cargar en cualquier posición en la gradilla y en cualquier sección del compartimento del sistema Panther. El pipeteo de muestras comenzará cuando una de las siguientes dos condiciones se cumpla:
 - a. El sistema procesa, de hecho, los calibradores.
 - b. Los resultados válidos para el calibrador se registren en el sistema.

2. Una vez que los tubos de calibración se pipeteen y se procesan para el kit de reactivos del Aptima Zika Virus Assay, las muestras se pueden analizar con el kit asociado durante un máximo de 24 horas **a menos que se reúnan las siguientes condiciones:**
 - a. Los resultados del calibrador no sean válidos.
 - b. Se elimine del sistema el kit de reactivos del ensayo asociado.
 - c. El kit de reactivos del ensayo asociado exceda los límites de estabilidad.
3. Cada tubo de calibración se puede usar una sola vez. Si se intenta utilizar el tubo más de una vez, esto puede dar lugar a errores de procesamiento.

B. Guantes con talco

Al igual que en cualquier sistema de reactivos, el exceso de talco de algunos guantes puede contaminar los tubos abiertos. Se recomienda el uso de guantes sin talco.

Control de calidad

Criterios de aceptación del Aptima Zika Virus Assay

A. Validez del ciclo

Un ciclo (también denominado lista de tareas) es válido cuando la cantidad mínima de calibradores cumple con sus criterios de aceptación y son correctas (consulte *Criterios de aceptación para la calibración y el cálculo del punto de corte*).

1. En el ciclo del Aptima Zika Virus Assay, al menos cuatro de las seis réplicas del calibrador deben ser válidas. Al menos dos de las tres réplicas del calibrador negativo y dos de las tres réplicas del calibrador positivo deben ser válidas.
2. El software del sistema Panther verifica automáticamente los criterios de aceptación del calibrador. Si una cantidad inferior a la cantidad mínima de réplicas del calibrador es válida, el software del sistema Panther invalidará automáticamente el ciclo.
3. En un ciclo válido, se calculan automáticamente los valores de punto de corte del control interno (señal intermitente) y el analito (señal resplandeciente).
4. Si un ciclo no es válido, los resultados de las muestras se presentan como no válidos, y todas las muestras se deben analizar nuevamente.

B. Validez de las muestras

1. En un ciclo válido, el resultado de la muestra es válido si la señal del IC es igual o superior al punto de corte del IC, a excepción de los siguientes casos:
 - a. Las muestras con una señal del analito (señal resplandeciente) superior al punto de corte del analito no se invalidan, incluso si la señal del control interno (IC) está por debajo del punto de corte.
 - b. El software invalida las muestras con una señal de IC superior a 750.000 RLU, y el estado del reactivo no se puede evaluar. El software también invalida automáticamente los calibradores positivos con una señal de IC superior a 750.000 RLU.
2. Además, se puede invalidar una muestra debido a fallas en los instrumentos o errores al procesar los resultados. Para obtener información detallada, consulte el *Manual del usuario del sistema Panther*.
3. Todos los resultados individuales de las muestras que no son válidos en un ciclo válido se deben analizar nuevamente.

Criterios de aceptación para la calibración y el cálculo del punto de corte

A. Criterios de aceptación del calibrador negativo

En el Aptima Zika Virus Assay, el calibrador negativo (Negative Calibrator, NC) se procesa por triplicado. Cada réplica individual del calibrador negativo debe tener un valor del control interno (IC) superior o igual a 50.000 RLU e inferior o igual a 500.000 RLU. Cada réplica individual del calibrador negativo debe tener un valor del analito inferior o igual a 40.000 RLU y superior o igual a 0 RLU. Si uno de los valores de las réplicas del calibrador negativo no es válido debido a que el valor del IC o el analito se encuentra fuera de estos límites, se volverá a calcular la media del calibrador negativo (NC_x) de acuerdo con los dos valores aceptables. El ciclo no es válido y debe repetirse si dos o más de los tres valores de las réplicas del calibrador negativo tienen valores del IC o el analito que se encuentran fuera de estos límites.

Determinación de la media de los valores del calibrador negativo (NC_x) para el control interno [NC_x (control interno)]

Ejemplo:

Calibrador negativo	Control interno Unidades relativas de luz
1	235.000
2	200.000
3	210.000
RLU totales del control interno	= 645.000

$$NC_x \text{ (control interno)} = \frac{\text{RLU totales del control interno}}{3} = 215.000$$

Determinación de la media de los valores del calibrador negativo (NC_x) para el analito [NC_x (analito)]

Ejemplo:

Calibrador negativo	Analito Unidades relativas de luz
1	14.000
2	16.000
3	15.000
RLU total del analito	= 45.000

$$NC_x \text{ (analito)} = \frac{\text{RLU total del analito}}{3} = 15.000$$

B. Criterios de aceptación del calibrador positivo

En el Aptima Zika Virus Assay, el calibrador positivo se procesa por triplicado. Los valores individuales del analito del calibrador positivo (Positive Calibrator, PC) deben ser inferiores o iguales a 4.000.000 RLU y superiores o iguales a 400.000 RLU. Los valores del IC no pueden superar las 750.000 RLU. Si uno de los valores de las réplicas del calibrador positivo se encuentra fuera de estos límites, se volverá a calcular la media del calibrador positivo (PC_x) de acuerdo con los dos valores aceptables de las réplicas del calibrador positivo. El ciclo no es válido y debe repetirse si dos o más de los tres valores del analito del calibrador positivo se encuentran fuera de estos límites.

Determinación de la media de los valores del calibrador positivo (PC_x) para el analito [PC_x (analito)]

Ejemplo:

Calibrador positivo	Analito Unidades relativas de luz
1	1.250.000
2	1.500.000
3	1.150.000
RLU total del analito	= 3.900.000

$$PC_x \text{ (analito)} = \frac{\text{RLU total del analito}}{3} = 1.300.000$$

C. Cálculo del valor del punto de corte del control interno

Valor del punto de corte del control interno = $0,5 \times [\text{NC}_x \text{ (control interno)}]$

Cálculo con los valores del ejemplo anterior del calibrador negativo:

Valor del punto de corte del control interno = $0,5 \times (215.000)$

Valor del punto de corte del control interno = 107.500 RLU

D. Cálculo del valor del punto de corte del analito del virus del Zika

Valor del punto de corte del analito = $\text{NC}_x \text{ (analito)} + [0,03 \times \text{PC}_x \text{ (analito)}]$

Cálculo con los valores de los ejemplos anteriores del calibrador negativo y positivo:

Valor del punto de corte del analito = $15.000 + (0,03 \times 1.300.000)$

Valor del punto de corte del analito = 54.000 RLU

E. Resumen sobre los criterios de aceptación del Aptima Zika Virus Assay

Criterios de aceptación	
Calibrador negativo	
Analito	$\geq 0 \text{ y } \leq 40.000 \text{ RLU}$
Control interno	$\geq 50.000 \text{ y } \leq 500.000 \text{ RLU}$
Calibrador positivo	
Analito	$\geq 400.000 \text{ y } \leq 4.000.000 \text{ RLU}$
Control interno	$\leq 750.000 \text{ RLU}$

F. Resumen de los cálculos del punto de corte para el Aptima Zika Virus Assay

Punto de corte del analito =	$\text{RLU media del analito del NC} + [0,03 \times (\text{RLU media del analito del PC})]$
Punto de corte del control interno =	$0,5 \times (\text{RLU media del IC del calibrador negativo})$

Interpretación de los resultados

El software del sistema Panther realiza todos los cálculos que se describen anteriormente. Se establecen dos puntos de corte para cada ensayo: uno para la señal del analito (señal resplandeciente), que se denomina el punto de corte del analito, y otro para la señal del control interno (señal intermitente), que se denomina el punto de corte del control interno. Los cálculos de estos puntos de corte figuran más arriba. Para cada muestra, se determina un valor de RLU para la señal del analito y un valor de RLU para la señal del control interno. En el informe, la división de la RLU de la señal del analito por el punto de corte del analito se abrevia señal del analito/punto de corte (S/CO).

Una muestra se considera negativa si la señal del analito es inferior a su punto de corte (S/CO del analito $< 1,00$) y la señal del control interno (IC) es superior o igual a su punto de corte (punto de corte del IC) e inferior o igual a 750.000 RLU. Una muestra se considera positiva si la señal del analito es superior o igual a su punto de corte (S/CO del analito $\geq 1,00$) y la señal del IC es inferior o igual a 750.000 RLU. El software establecerá los resultados. Una muestra se considera no válida si la señal del analito es inferior a su punto de corte (S/CO del analito $< 1,00$) y la señal del control interno es inferior a su punto de corte. Todas las muestras cuyos valores del control interno excedan las 750.000 RLU se consideran no válidas.

Resumen de la interpretación de las muestras

Interpretación de las muestras	Criterios
Negativa	S/CO del analito $< 1,00$ y IC \geq punto de corte del IC y IC \leq 750.000 RLU
Positiva	S/CO del analito $\geq 1,00$ y IC \leq 750.000 RLU*
No válida	IC $>$ 750.000 RLU o S/CO del analito $< 1,00$ y IC $<$ punto de corte

* El software invalidará las muestras con una señal de IC superior a 750.000 RLU.

- Cualquier muestra que se considere no válida en el Aptima Zika Virus Assay debe ser analizada nuevamente en estado singlete.
- Las muestras con un valor de control interno válido y S/CO del analito inferior a 1,00 en el Aptima Zika Virus Assay se consideran negativas para el RNA del ZIKV.
- Las muestras con S/CO del analito superior o igual a 1,00 con una señal del IC inferior o igual a 750.000 RLU se consideran positivas para el RNA del ZIKV.
- Una muestra de suero de pacientes similares se necesita actualmente para las pruebas de seguimiento serológico de los resultados negativos de pruebas de ácidos nucleicos (NAT) conforme al algoritmo de pruebas de los CDC (encontrado en <http://www.cdc.gov/zika/index.html>).

Restricciones

- A. Solo personal adiestrado para realizar este procedimiento puede usar este ensayo. Si no se siguen las instrucciones que se indican en este folleto, se pueden obtener resultados incorrectos.
- B. La obtención de resultados confiables depende de la recolección adecuada de muestras, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento.
- C. Los laboratorios deben informar todos los resultados positivos a las autoridades de salud pública correspondientes.
- D. Una muestra de suero de pacientes similares se necesita actualmente para las pruebas de seguimiento serológico de los resultados negativos de pruebas de ácidos nucleicos (NAT) conforme al algoritmo de pruebas del CDC (encontrado en <http://www.cdc.gov/zika/index.html>).**
- E. No se han evaluado completamente las consecuencias que tiene el almacenamiento a largo plazo de las muestras en la ejecución del Aptima Zika Virus Assay.
- F. Si bien es raro, las mutaciones en las regiones altamente conservadas del genoma viral cubierto por los iniciadores o las sondas del Aptima Zika Virus Assay pueden evitar la detección del virus.
- G. Este ensayo fue desarrollado para usarlo con el sistema Panther únicamente.
- H. La contaminación cruzada de las muestras puede generar resultados falsos positivos.
- I. Se deben llevar a cabo los ensayos y la interpretación de los resultados de acuerdo con los procedimientos indicados.
- J. El incumplimiento de estos procedimientos, las condiciones desfavorables de transporte o almacenamiento, y el uso de reactivos vencidos pueden dar lugar a la obtención de resultados poco confiables.
- K. Si no se obtienen los resultados esperados, esto es un indicio de que el ciclo no es válido. Las posibles causas de error son el deterioro del kit de ensayo, un error del operador, el funcionamiento defectuoso del equipo, el deterioro de las muestras o la contaminación de los reactivos.
- L. Este ensayo ha sido probado solo con los tipos de muestras indicados. No se ha evaluado el funcionamiento con otros tipos de muestras.
- M. Los resultados del Aptima Zika Virus Assay deben interpretarse juntos con los demás datos clínicos que estén a disposición del médico.
- N. Un resultado negativo no excluye una posible infección, ya que los resultados dependen de la recopilación adecuada de las muestras. Los resultados de la prueba pueden verse afectados por la recopilación incorrecta de las muestras, un error técnico, la mezcla de las muestras o los niveles seleccionados que se encuentren por debajo del límite de detección del ensayo.
- O. El Aptima Zika Virus Assay proporciona resultados cualitativos. Por lo tanto, no se puede relacionar la magnitud de la señal de un ensayo positivo con la cantidad de organismos en una muestra.
- P. Los clientes deben validar de forma independiente el proceso de transferencia del sistema de información de laboratorio (Laboratory information system, LIS).

Ejecución

Límite de detección (LoD) de las muestras de plasma

El límite de detección (Limit of Detection, LoD) se define como la concentración del RNA del ZIKV que se detecta -a una probabilidad de 95 % o mayor- de acuerdo con CLSI EP17-A2.¹⁹ El LoD se determinó mediante el análisis de una muestra de plasma con ZIKV positivo diluida en serie en plasma humano desfibrinado sin lípidos. La muestra de plasma positiva se extrajo de un donante de sangre durante el brote del virus del Zika en Brasil, en 2015. La muestra se cuantificó mediante un ensayo validado de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa al reverso (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) en tiempo real. Además, se evaluó el LoD del Aptima Zika Virus Assay mediante el análisis de una transcripción sintetizada *in vitro* (de la secuencia correspondiente del número de acceso AY632535 del GenBank para las cepas aisladas MR766 del virus del Zika). La transcripción se diluyó en serie en solución amortiguadora. Se utilizaron tres instrumentos Panther para analizar 72 réplicas de cada nivel seleccionado, a excepción del miembro del panel con 90 copias/ml, que fue analizado en 20 réplicas. Los resultados se resumen en Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1: Detección del ZIKV positivo en plasma de donante brasileño en 2015 con el Aptima Zika Virus Assay en el sistema Panther

Copias/ml del virus	Cantidad de réplicas analizadas	Cantidad de resultados positivos	Positividad		
			% P	CI inferior al 95 %	CI superior al 95 %
0	72	0	0	0	5
0,1	72	1	1	0	7
0,3	72	14	19	12	30
1	72	27	38	28	50
3	72	62	86	76	92
10	72	72	100	95	100
30	72	72	100	95	100
90	20	20	100	84	100

% P = porcentaje de resultados positivos; CI = intervalo de confianza.

Tabla 2: Detección de transcripciones con el Aptima Zika Virus Assay en el sistema Panther

Copias/ml de las transcripciones	Cantidad de réplicas analizadas	Cantidad de resultados positivos	Positividad		
			% P	CI inferior al 95 %	CI superior al 95 %
0	72	0	0	0	5
0,3	72	2	3	1	10
1	72	16	22	14	33
3	72	39	54	43	65
10	72	66	92	83	96
30	72	72	100	95	100
90	20	20	100	84	100

% P = porcentaje de resultados positivos; CI = intervalo de confianza.

Las probabilidades de detección del 95 % se determinaron por medio un análisis Probit. Se estableció que el límite de detección del ZIKV positivo en el plasma del donante brasileño de 2015 con el Aptima Zika Virus Assay fue de 5,9 copias/ml con una probabilidad de detección del 95 %. Se estableció que el límite de la transcripción *in vitro* con el Aptima Zika Virus Assay fue de 13,4 copias/ml con una probabilidad de detección del 95 % (Tabla 3).

Tabla 3: Detección por medio del análisis Probit

Analitos	Probabilidad de detección del 95 % en copias/ml
	(Límites de confianza del 95 %)
Virus del Zika (plasma de donante brasileño de 2015)	5,9 (4,3 a 8,9)
Transcripción (de acuerdo con las cepas aisladas MR766 del virus del Zika)	13,4 (9,9 a 20,3)

Inclusión: *in silico*

Se evaluó la conservación del iniciador y la sonda con todas las cepas públicamente disponibles del virus del Zika que abarcan regiones seleccionadas y previstas mediante la comparación directa con alineamientos de secuencias múltiples. Las matrices de distancia que se generan para cada oligonucleótido con respecto a cada cepa aislada indica que es probable que todas se detecten, ya que cada una tiene, al menos, un conjunto de oligonucleótidos de captura, un iniciador directo, una sonda y un iniciador inverso en combinación con una identidad de secuencia del 100 %. De acuerdo con este análisis, no es probable que se obtengan resultados falsos negativos si se incluyen los oligonucleótidos en el sistema. El análisis de datos de inclusión se describe en Tabla 4.

Tabla 4: Análisis de datos de inclusión

País	Año ^a	Cepa/cepa aislada	Porcentaje de identidad de secuencia de oligonucleótidos										
			Oligonucleótidos de captura			Iniciadores directos				Sondas		Iniciadores inversos	
			TCO_1	TCO_2	TCO_3	FP_1	FP_2	FP_3	FP_4	P_1	P_2	RP_1	RP_2
Brasil	2015	Bahia01	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	Bahia07	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	Bahia09	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH815744	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH818995	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH819015	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH819966	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH823339	96	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	BeH828305	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	Brazil-ZKV2015	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	Natal RGN	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	PE243	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2016	Rio-S1	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2016	Rio-U1	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	SSABR1	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Brasil	2015	ZikaSPH2015	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Camboya	2010	FSS13025	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Canadá	2013	De las células Vero E6	100	100	100	95	100	91	96	100	95	100	100
República Centroafricana	1976	ARB13565	100	100	95	100	95	96	91	100	100	96	100
República Centroafricana	1968	ArB1362	100	96	100	100	95	96	91	100	100	100	100

Tabla 4: Análisis de datos de inclusión (continuación)

País	Año ^a	Cepa/cepa aislada	Porcentaje de identidad de secuencia de oligonucleótidos										
			Oligonucleótidos de captura			Iniciadores directos				Sondas		Iniciadores inversos	
			TCO_1	TCO_2	TCO_3	FP_1	FP_2	FP_3	FP_4	P_1	P_2	RP_1	RP_2
República Centroafricana	N/C	ARB15076	100	100	100	100	95	96	91	100	100	100	100
República Centroafricana	N/C	ARB7701	100	100	95	100	95	96	91	100	100	96	100
China	2016	GD01	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	GDZ16001	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	GZ01	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	GZ02/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	SZ01/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	SZ02/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	SZ-WIV01	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	VE_Ganxian	100	100	100	95	100	91	96	100	95	100	100
China	2016	Z16006	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	Z16019	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	Zhejiang04	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	ZJ03	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
China	2016	ZKC2/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Colombia	2015	C1/C2	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Colombia	2015	FLR	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Colombia	2016	UF-1/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Polinesia Francesa	2013	H/PF/2013	100	100	100	95	100	91	96	100	100	96	100
Guatemala	2015	8375	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Guatemala	2015	103344	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Haití	2014	Haiti/1225/2014	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Honduras	2016	103451	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Italia	2016	Brazil/2016/INMI1	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Italia	2016	Dominican Republic/2016/PD1	100	100	100	95	100	91	96	100	100	98	100
Italia	2016	Dominican Republic/2016/PD2	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Malasia	1966	P6-740	100	100	100	95	100	91	96	100	100	96	100
Martinica	2015	MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
México	2016	MEX/InDRE/Lm/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
México	2016	MEX/InDRE/Sm/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
México	2015	MEX_I_7	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Micronesia	2007	ZIKV 2007 EC	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Nigeria	1968	IbH_30656	100	100	95	100	95	100	96	100	95	96	100
Nigeria	1968	IbH-30656_SM21V1-V3	100	100	95	100	95	100	96	100	95	96	100
Panamá	2016	BEI-259634_V4	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Panamá	2015	CDC-259249_V1-V3	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Panamá	2015	CDC-259359_V1-V3	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Panamá	2015	CDC-259364_V1-V2	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Filipinas	2012	CPC-0740	100	100	100	100	95	91	96	100	100	100	100
Puerto Rico	2015	PRVABC59	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Puerto Rico	2015	V3/V2	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Senegal	1984	41525-DAK	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	1984	41662-DAK	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	1984	41671-DAK	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	1984	A1C1/V2	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100

Tabla 4: Análisis de datos de inclusión (continuación)

País	Año ^a	Cepa/cepa aislada	Porcentaje de identidad de secuencia de oligonucleótidos										
			Oligonucleótidos de captura			Iniciadores directos				Sondas		Iniciadores inversos	
			TCO_1	TCO_2	TCO_3	FP_1	FP_2	FP_3	FP_4	P_1	P_2	RP_1	RP_2
Senegal	1984	ArD_41519	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	2000	ArD142623	100	96	90	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	2001	ArD157995	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	2001	ArD158084	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Senegal	1968	ArD7117	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Surinam	2015	Z1106033	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Surinam	2016	ZIKVNL00013	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Tailandia	2014	SV0127-14	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
Uganda	1947	MR 766	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100
Estados Unidos	2016	FB-GWUH-2016	100	100	100	95	100	91	96	95	100	100	100
Estados Unidos	2016	Haiti/1/2016	100	100	100	95	100	91	96	100	100	100	100
—	—	ArD158095	100	100	100	100	95	100	96	100	100	100	100

^a Año de recopilación.

Repetibilidad de las muestras de sangre

A fin de evaluar la reproducibilidad del Aptima Zika Virus Assay, se creó un panel mediante la adición de solución madre del virus en plasma negativo (18 copias/ml, 30 copias/ml, 60 copias/ml y 600 copias/ml) y transcripciones en solución amortiguadora (6000 copias/ml), y dos operadores lo analizaron con tres sistemas Panther durante dos días. El panel de reproducibilidad se analizó con 108 réplicas para cada miembro del panel de 18 copias/ml y 30 copias/ml, y 54 réplicas para cada miembro del panel de 60 copias/ml, 600 copias/ml y 6000 copias/ml para un total de 378 replicas para los cinco miembros del panel.

El análisis de reproducibilidad incluye la evaluación de la concordancia o correlación de porcentaje del resultado obtenido con respecto al resultado esperado y la relación media de señal/punto de corte (S/CO) de los miembros del panel. Los resultados se analizaron para evaluar la varianza total, así como la varianza en cada uno de los ciclos, entre los días, entre los operadores y entre los instrumentos. La desviación estándar (Standard deviation, SD) y el porcentaje del coeficiente de variación (% de CV) de la relación S/CO figuran en Tabla 5. Se analizaron las relaciones medias de S/CO del analito de todos los miembros del panel. Se calculó la concordancia o correlación de porcentaje entre los resultados del ensayo y el verdadero estado de cada miembro del panel teniendo en cuenta la relación S/CO del analito de todos los miembros.

La concordancia o correlación general de porcentaje de los resultados del análisis fue de 100 % para todos los miembros del panel. No hubo correlación entre el índice de resultados positivo y los factores de varianza analizados en este estudio. Con respecto a la variabilidad de la señal, la varianza en los ciclos fue el factor que más contribuyó a la varianza total (según los valores de SD) en el Aptima Zika Virus Assay.

Tabla 5: Reproducibilidad del Aptima Zika Virus Assay

Panel	N	Cant. de P	% de A	Relación media de S/CO del analito	Entre días		Entre operadores		Entre instrumentos		En el ciclo		Total	
					SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV	SD	% de CV
18 c/ml	108	108	100 %	33,12	0,15	0 %	0,15	0 %	0,25	1 %	1,29	4 %	1,33	4 %
30 c/ml	108	108	100 %	33,24	0,24	1 %	0,16	0 %	0,18	1 %	1,32	4 %	1,36	4 %
60 c/ml	54	54	100 %	33,20	0,24	1 %	0,19	1 %	0,25	1 %	1,20	4 %	1,26	4 %
600 c/ml	54	54	100 %	32,96	0,24	1 %	0,21	1 %	0,27	1 %	1,32	4 %	1,38	4 %
6000 c/ml	54	54	100 %	32,97	0,33	1 %	0,21	1 %	0,23	1 %	1,27	4 %	1,35	4 %

N = cantidad de miembros del panel combinados para este análisis; P = cantidad de resultados positivos; A = concordancia o correlación; S/CO = relación de señal/punto de corte; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación, c/ml = copias por ml.

Reactividad cruzada con otros patógenos de transmisión hemática en las muestras de sangre

Se evaluó la reactividad cruzada del Aptima Zika Virus Assay mediante el análisis de muestras clínicas de 10 pacientes con cada uno de las siguientes infecciones virales: virus del dengue, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1/2), parvovirus B19 y virus del Nilo occidental (WNV). También se analizaron muestras de 10 individuos que había recibido la vacuna contra el HBV. Las muestras se obtuvieron de una fuente comercial, y los proveedores utilizaron métodos validados para caracterizarlas. Además, se analizó una mezcla de plasma negativo enriquecido con el virus de la hepatitis E (HEV) a 1×10^5 copias/ml y una mezcla de plasma negativo enriquecido con el virus de Chikungunya a 1×10^5 U/ml. Cada una de las muestras que se describieron anteriormente se dividió en dos alícuotas. Una de las alícuotas se utilizó para evaluar la reactividad cruzada. A la otra alícuota se le agregó plasma con ZIKV positivo y se la utilizó como una muestra artificial en la evaluación clínica. A fin de evaluar la reactividad cruzada, las alícuotas de las muestras de donantes con infecciones de origen natural o que habían recibido la vacuna contra el HBV se analizaron una vez. Las muestras con HEV y Chikungunya agregado se analizaron en réplicas de 10.

Los resultados del Aptima Zika Virus Assay fueron negativos en todas las muestras. No se observó reactividad cruzada en las muestras de personas infectadas con otros patógenos de transmisión hemática, las muestras de individuos que habían recibido las vacunas contra el HBV ni en las muestras con virus agregados.

Tabla 6: Resumen de los resultados del Aptima Zika Virus Assay con respecto a la reactividad cruzada con otros patógenos de transmisión hemática

Patógeno	N	Cant. de P	% P	S/CO del IC			S/CO del analito		
				Media	SD	CV	Media	SD	CV
HCV	10	0	0 %	1,91	0,07	4 %	0,00	0,00	N/C
WNV	10	0	0 %	1,95	0,05	3 %	0,00	0,00	N/C
HAV	10	0	0 %	1,95	0,04	2 %	0,01	0,02	316 %
HIV 1-2	10	0	0 %	1,87	0,09	5 %	0,00	0,01	N/C
Dengue	10	0	0 %	1,91	0,05	3 %	0,04	0,08	219 %
Parvo B19	10	0	0 %	1,93	0,04	2 %	0,00	0,00	N/C
HBV	10	0	0 %	1,92	0,05	3 %	0,01	0,03	316 %
Vacunados contra HBV	10	0	0 %	1,88	0,06	3 %	0,00	0,00	N/C
Chikungunya	10	0	0 %	1,89	0,05	3 %	0,01	0,02	316 %
HEV	10	0	0 %	1,93	0,03	2 %	0,00	0,01	N/C

N = cantidad de muestras; cant. de P = cantidad de resultados positivos; % P = porcentaje de resultados positivos; IC = control interno; S/CO = relación de señal/punto de corte; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; N/C = no corresponde.

Reactividad cruzada e interferencia con otros microorganismos

Se utilizó el plasma negativo para preparar muestras enriquecidas con 1×10^6 unidades formadoras de colonias (CFU/ml) o unidades formadoras de inclusión por ml (IFU/ml) con cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*. Se utilizó orina negativa para preparar muestras enriquecidas con 1×10^6 CFU/ml de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*. Se analizó la reactividad cruzada con muestras no enriquecidas de ZIKV, y todos los resultados fueron negativos. Se evaluó la posibilidad de interferencia microbiana con una alícuota de cada muestra, enriquecida con ZIKV a 18 copias/ml, y todos los resultados fueron positivos. No se observó reactividad cruzada ni interferencia en las muestras que contienen bacterias u hongos.

Análisis de reactividad cruzada: *in silico*

Las secuencias de los iniciadores, las sondas y los oligonucleótidos de captura en el Aptima Zika Virus Assay se sometieron a un análisis con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en comparación con las muestras que figuran en Tabla 7. El Aptima Zika Virus Assay parece no poder generar de forma significativa una reactividad cruzada con las secuencias sujeto examinadas cuando se las analiza con el programa BLAST *in silico* (blastn, secuencia seleccionada máxima = 10.000, tamaño de la palabra = 7, umbral del valor E = 1000, penalizaciones predeterminadas) y el análisis de proximidad (la orientación correcta y la proximidad normal obtenida de todos los oligonucleótidos en el nivel de 300 bp). Se consideran potencialmente problemáticos los resultados que son ≥ 45 % idénticos al oligonucleótido de la secuencia y que se encuentran en el nivel de 300 bp entre sí con respecto a la misma secuencia sujeto. Se observó que ninguna de las secuencias sujeto incluidas en el conjunto de datos específicos de la reactividad cruzada (751.867 entradas y 486.723 entradas) ni en las divisiones de secuencias virales no redundantes, bacterianas, ambientales, de invertebrados, de plantas, de bacteriófagos o de otros vertebrados de GenBank cumplen con todos estos criterios para que el conjunto completo de oligonucleótidos produzca resultados falsos positivos.

El análisis *in silico* incluye las secuencias genómicas del RNA/DNA de los virus y los organismos que figuran en Tabla 7.

Tabla 7: Lista de los organismos del análisis de reactividad cruzada

Flavivirus	Otros organismos	
Virus del dengue 1, 2, 3 y 4	Adenovirus	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
Virus de la hepatitis C	Virus del bosque de Barmah	<i>Actinomyces israelii</i>
Virus de la encefalitis japonesa	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Virus Spondweni	Virus Chikungunya	<i>Atopobium vaginae</i>
Virus de la encefalitis de San Luis	Citomegalovirus	<i>Bacteroides fragilis</i>
Virus del Nilo occidental	Virus de la encefalomielitis equina del Este	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
Fiebre amarilla	Enterovirus	<i>Campylobacter jejuni</i>
—	Virus de Epstein-Barr	<i>Candida albicans</i>
—	<i>Streptococcus</i> del grupo A	<i>Chlamydia trachomatis</i>
—	Virus de la hepatitis B	<i>Clostridium difficile</i>
—	Virus de inmunodeficiencia humana	<i>Corynebacterium genitalium</i>
—	Leptospirosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
—	Virus de la fiebre de Mayaro	<i>Enterobacter cloacae</i>
—	Virus del sarampión	<i>Enterococcus faecalis</i>
—	Virus O'nyong-nyong (Virus Sindbis y Una)	<i>Escherichia coli</i>
—	Parvovirus (B19)	<i>Finexidia magna</i>
—	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
—	<i>Plasmodium</i> sp. (<i>Plasmodium vivax</i>)	<i>Gardnerella vaginalis</i>
—	<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Haemophilus ducreyi</i>
—	Virus de Ross River	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
—	Virus de la rubéola	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
—	<i>Schistosoma</i> sp.	<i>Lactobacillus crispatus</i>
—	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
—	Virus varicela-zóster	<i>Listeria monocytogenes</i>
—	Virus de la encefalomielitis equina del Oeste	<i>Mobiluncus curtisii</i>
—	Virus del herpes simple tipo 1	<i>Mycoplasma hominis</i>
—	Virus del herpes simple tipo 2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
—	Virus del papiloma humano tipo 16	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
—	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Prevotella bivia</i>
—	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
—	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
—	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
—	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
—	—	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Interferencia en las muestras de sangre

Se evaluó la posible interferencia de sustancias endógenas mediante el análisis de muestras de plasma de pacientes con las características que aparecen en Tabla 8. Se incluyeron diez muestras de plasma para cada característica. Cada una de las muestras se dividió en dos alícuotas. Una alícuota fue enriquecida con plasma con ZIKV positivo a una concentración de 18 copias/ml. Las alícuotas enriquecidas y no enriquecidas se analizaron con el Aptima Zika Virus Assay. Con todas las muestras no enriquecidas, se obtuvieron resultados negativos. Con una alícuota enriquecida se obtuvo un resultado negativo en el análisis inicial. Se determinó que el resultado negativo se debió a un error durante la adición. Se enriqueció una alícuota nueva de la muestra y se la volvió a analizar. Se obtuvo un resultado positivo después de repetir la prueba.

Tabla 8: Resumen de los resultados del Aptima Zika Virus Assay con respecto a la interferencia de sustancias endógenas

Virus del Zika	Muestra	N	Cant. de P	% P	S/CO del IC			S/CO del analito		
					Media	SD	CV	Media	SD	CV
No enriquecida	Ictérica	10	0	0 %	1,88	0,03	2 %	0,00	0,00	N/C
	Lipémica	10	0	0 %	1,84	0,05	3 %	0,00	0,00	N/C
	Hemolizada	10	0	0 %	1,86	0,05	3 %	0,00	0,00	N/C
	Anticuerpo antinuclear	10	0	0 %	1,92	0,06	3 %	0,00	0,00	N/C
	Mieloma múltiple	10	0	0 %	1,87	0,05	3 %	0,00	0,00	N/C
	Lupus eritematoso sistémico	10	0	0 %	1,89	0,07	4 %	0,00	0,00	N/C
	Factor reumatoide	10	0	0 %	1,93	0,04	2 %	0,00	0,00	N/C
	Ictérica	10	10	100 %	2,25	0,21	9 %	31,69	0,69	2 %
	Lipémica	10	10	100 %	2,19	0,26	12 %	31,96	1,58	5 %
	Hemolizada	10	10	100 %	2,12	0,25	12 %	31,51	0,49	2 %
Enriquecida (18 copias/ml)	Anticuerpo antinuclear	10	10	100 %	2,09	0,42	20 %	31,84	5,18	16 %
	Mieloma múltiple	10	10	100 %	2,14	0,23	11 %	31,73	1,28	4 %
	Lupus eritematoso sistémico	10	9 ^a	90 %	2,35 ^b	0,39 ^b	17 %	32,92 ^b	0,69 ^b	2 %
	Factor reumatoide	10	10	100 %	2,13	0,34	16 %	32,86	0,66	2 %

N = cantidad de muestras; cant. de P = cantidad de resultados positivos; % P = porcentaje de resultados positivos; IC = control interno; S/CO = relación de señal/punto de corte; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; N/C = no corresponde.

^a Se enriqueció una alícuota nueva de la muestra y se la volvió a analizar. El resultado después de volver analizar la alícuota fue positivo.

^b Calculado con resultados positivos.

Equivalencia de las matrices en las muestras de sangre

A fin de comparar el rendimiento de las muestras de suero y plasma en el Aptima Zika Virus Assay, se extrajo sangre de 10 donantes normales con los siguientes anticoagulantes y tipos de tubos: 1) ácido etilendiaminotetraacético disódico (K2 EDTA), 2) ácido etilendiaminotetraacético, sal tetrasódico (K3 EDTA), 3) ácido cítrico dextrosa con adenina (ACD-A), 4) citrato de sodio (NAC), 5) tubos para la preparación de plasma (Plasma Preparation Tube, PPT), 6) tubo para la separación de suero (Serum Separation Tube, SST) y 7) tubo para suero (suero). Para los 10 donantes, la sangre se extrajo con cada uno de los 7 tipos de tubos. Cada una de las muestras de los donantes se dividió en dos alícuotas. Una alícuota fue enriquecida con plasma con ZIKV positivo a 18 copias/ml. Las alícuotas enriquecidas y no enriquecidas se analizaron con el Aptima Zika Virus Assay.

Con las alícuotas no enriquecidas, se obtuvieron resultados negativos con las 70 muestras en el Aptima Zika Virus Assay. La relación media de S/CO del IC varió de 1,83 a 1,90 con un porcentaje del CV del 2 % al 3 % para cada tipo de tubo (Tabla 9). Con las alícuotas enriquecidas, se obtuvieron resultados positivos con las 70 muestras en el Aptima Zika Virus Assay. La relación media de S/CO del analito para cada uno de los 7 tipos de tubos varió de 31,90 a 34,20 con un porcentaje del CV del 3 % al 4 % (Tabla 10).

Tabla 9: Resultados del Aptima Zika Virus Assay para las muestras de plasma y suero no enriquecidas recopiladas en diferentes tipos de tubos

Tubo de recopilación	N	Cant. de P	% P	S/CO del IC			S/CO del analito		
				Media	SD	CV	Media	SD	CV
K2EDTA	10	0	0 %	1,89	0,06	3 %	0,00	0,01	N/C
K3EDTA	10	0	0 %	1,87	0,04	2 %	0,00	0,00	N/C
ACD-A	10	0	0 %	1,87	0,04	2 %	0,00	0,00	N/C
PPT	10	0	0 %	1,83	0,04	2 %	0,00	0,00	N/C
NAC	10	0	0 %	1,84	0,06	3 %	0,00	0,00	N/C
Suero	10	0	0 %	1,85	0,06	3 %	0,00	0,00	N/C
SST	10	0	0 %	1,90	0,05	3 %	0,00	0,00	N/C

N = cantidad de muestras; cant. de P = cantidad de resultados positivos; % P = porcentaje de resultados positivos;
IC = control interno; S/CO = relación de señal/punto de corte; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación;
N/C = no corresponde.

Tabla 10: Resultados del Aptima Zika Virus Assay para las muestras de plasma y suero enriquecidas recopiladas en diferentes tipos de tubos

Tubo de recopilación	N	Cant. de P	% P	S/CO del IC			S/CO del analito		
				Media	SD	CV	Media	SD	CV
K2EDTA	10	10	100 %	2,05	0,45	22 %	32,77	1,23	4 %
K3EDTA	10	10	100 %	1,99	0,39	20 %	32,63	0,82	3 %
ACD-A	10	10	100 %	1,88	0,44	23 %	32,02	1,32	4 %
PPT	10	10	100 %	1,92	0,25	13 %	32,32	1,24	4 %
NAC	10	10	100 %	1,91	0,50	26 %	31,90	1,31	4 %
Suero	10	10	100 %	1,78	0,31	18 %	34,20	1,34	4 %
SST	10	10	100 %	1,77	0,51	29 %	32,52	1,32	4 %

N = cantidad de muestras; cant. de P = cantidad de resultados positivos; % P = porcentaje de resultados positivos;
IC = control interno; S/CO = relación de señal/punto de corte; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación.

Evaluación clínica de las muestras de sangre

Se obtuvieron veintiséis (26) muestras de plasma de tres fuentes comerciales. Los proveedores determinaron que, con las 26 muestras, se obtuvieron resultados positivos para el ZIKV de acuerdo con los resultados del ensayo TrioPlex CDC (dos proveedores) o una prueba validada de RT-PCR en tiempo real. Las muestras se volvieron a analizar con una prueba validada diferente de RT-PCR en tiempo real. Se obtuvieron resultados positivos con 24 de las 26 muestras. Las dos muestras que obtuvieron resultados negativos en la repetición de la prueba se consideran negativas para el resultado de referencia en el análisis que sigue a continuación. Las 26 muestras clínicas en su totalidad obtuvieron resultados positivos en el Aptima Zika Virus Assay. En la Tabla 11, se observan los resultados de las 24 muestras positivas de referencia.

Tabla 11: Resultados de las 24 muestras clínicas con ZIKV positivo con el Aptima Zika Virus Assay

Identificación de la muestra	País de origen	Ct/Cp de referencia	Resultado del Aptima Assay	S/CO del Aptima Assay
08847156	Colombia	34,14	Positivo	30,5
08847163	Colombia	34,90	Positivo	31,3
08847229	Colombia	31,43	Positivo	31,3
08847260	Colombia	32,75	Positivo	32,5
08847264	Colombia	36,32	Positivo	32,8
08847284	Colombia	33,14	Positivo	32,5
08847325	Colombia	36,22	Positivo	31,2
08847716	Colombia	31,76	Positivo	29,8
1043-TDS-0112	República Dominicana	31,80	Positivo	30,9
1043-TDS-0114	República Dominicana	35,20	Positivo	31,8
1043-TDS-0115	República Dominicana	24,74	Positivo	32,3
1043-TDS-0119	República Dominicana	30,69	Positivo	32,1
1043-TDS-0122	República Dominicana	35,05	Positivo	30,6
1043-TDS-0129	República Dominicana	37,24	Positivo	31,8
1043-TDS-0130	República Dominicana	34,23	Positivo	33,4
1043-TDS-0131	República Dominicana	29,66	Positivo	30,3
1043-TDS-0134	República Dominicana	37,30	Positivo	31,0
1043-TDS-0135	República Dominicana	34,07	Positivo	32,1
1043-TDS-0137	República Dominicana	29,54	Positivo	31,7
1043-TDS-0141	República Dominicana	30,71	Positivo	32,0
1043-TDS-0143	República Dominicana	28,73	Positivo	29,6
1043-TDS-0144	República Dominicana	34,19	Positivo	29,8
1043023924	Colombia	34,69	Positivo	30,3
8798593	Colombia	22,75	Positivo	31,7

Se preparó un total de 90 muestras artificiales con la adición de plasma con ZIKV positivo en muestras individuales de plasma a una concentración de 18 copias/ml. Las 90 muestras incluyen 10 muestras individuales de plasma de los pacientes que obtuvieron resultados positivos para el parvovirus B19, virus del dengue, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), HIV o el virus del Nilo occidental (West Nile virus, WNV); 10 muestras de plasma de un donante vacunado contra el virus HBV; y 10 muestras de plasma de donantes normales.

Se utilizó un total de 72 muestras individuales de plasma como muestras negativas de ZIKV. Las setenta (70) muestras incluyen 10 muestras individuales de plasma que tienen las siguientes características: resultados positivos para los anticuerpos antinucleares; hemolizadas (aumento de la hemoglobina); ictericas (alto nivel de bilirrubina); lipémicas (alto nivel de lípidos); mieloma múltiple; artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico. También se incluyen dos muestras que obtuvieron resultados positivos en la prueba inicial de referencia y resultados negativos en la repetición del análisis. Estas dos muestras obtuvieron resultados positivos con el Aptima Zika Virus Assay. Los resultados de la evaluación clínica se resumen en Tabla 12.

Tabla 12: Resultados de la evaluación clínica del Aptima Zika Virus Assay

Categoría de las muestras	Aptima Zika Virus Assay		
	Cantidad analizada	ZIKV positivo	ZIKV negativo
Muestras naturales con virus del Zika positivo	24	24/24	0/24
Muestras clínicas artificiales con virus del Zika positivo (3 x LoD)	90 ^a	90/90	0/90
Muestras clínicas previstas con virus del Zika negativo	72 ^b	2/72	70/72
Coincidencia de porcentaje positivo	100 % (114/114) CI del 95 %: Desde el 96,7 % al 100 %		
Coincidencia de porcentaje negativo	97,2 % (70/72) ^b CI del 95 %: Del 90,4 % al 99,2 %		

CI = intervalo de confianza.

^a Incluye las alícuotas enriquecidas con el virus del Zika obtenidas de 80 muestras de plasma analizadas en el estudio de reactividad cruzada y las alícuotas enriquecidas con el virus del Zika obtenidas de 10 muestras de plasma analizadas en el estudio de equivalencia de matrices.

^b Incluye dos muestras de pacientes que obtuvieron resultados positivos en las pruebas iniciales de referencia inicial y resultados negativos cuando se repitió la prueba con un método alternativo de PCR que se consideraron falsos positivos.

Prueba de especificidad adicional para las muestras de sangre

Se evaluó más detalladamente la especificidad del Aptima Zika Virus Assay en la plataforma del instrumento Panther mediante el análisis de 775 muestras de plasma y 240 muestras de suero de donantes de sangre normales. Todos los resultados fueron negativos. La especificidad en el Aptima Zika Virus Assay fue del 100 % (1015/1015) con un intervalo de confianza por debajo del 95 % del 99,6 %. De las 1015 muestras analizadas con el Aptima Zika Virus Assay, no se obtuvieron resultados no válidos (Tabla 13).

Tabla 13: Especificidad en muestra de plasma y suero

	Tipo de muestra		Total
	Plasma	Suero	
Cantidad de muestras válidas	775	240	1015
Cantidad de resultados negativos	775	240	1015
Especificidad	100,0	100,0	100,0
CI del 95 %, límite más bajo	99,5	98,4	99,6
CI del 95 %, límite más alto	100,0	100,0	100,0

CI = intervalo de confianza.

Porcentaje de resultados no válidos para las muestras de sangre

El porcentaje de resultados no válidos causados por errores químicos en el análisis clínico y analítico de las muestras fue de 0,09 % (3/3375). Se obtuvieron 12 resultados no válidos debido

a fallas de hardware o problemas en las muestras: 1 CLT (coágulo en la muestra), 1 RDFS (error al dosificar la muestra), 2 VVFS (error al verificar el volumen), 3 QNS (cantidad de muestras insuficiente) y 5 PTF (no se puede elegir una punta con el mango del pipeteador debido a un error de carga del operador). El porcentaje total de resultados no válidos fue de 0,44 % (15/3375). Se repitió el análisis de todas las réplicas no válidas con resultados válidos.

Evaluación de la ejecución con muestras de orina

Se evaluó la ejecución del Aptima Zika Virus Assay con muestras de orina procesada. Para el procesamiento, se mezcló la orina con el medio de transporte de la orina Aptima en una proporción de 1:1 (se agregaron 2 ml de orina al tubo de transporte de muestras de orina Aptima, que contenía 2 ml del medio de transporte de la orina).

Límite de detección (LoD) de las muestras de orina

El límite de detección (LoD) se define como la concentración del RNA del ZIKV que se detecta al 95 % o una probabilidad mayor de acuerdo con CLSI EP17-A2.¹⁹ El LoD se determinó mediante el análisis de una muestra de plasma con ZIKV positivo diluida en serie en orina negativa combinada. El mayor volumen de plasma positivo que se agregó a la orina fue de 5,5 %. La muestra de plasma positiva se extrajo de un donante de sangre durante el brote del virus del Zika en Brasil, en 2015. La muestra se cuantificó mediante un ensayo validado de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) en tiempo real. Para preparar los miembros del panel de sensibilidad de la orina, se agregó en la orina una muestra de plasma con ZIKV positivo en la concentración indicada. Los miembros enriquecidos del panel se procesaron mediante la mezcla con el medio de transporte de la orina (Urine Transport Medium, UTM) en una proporción de 1:1 antes del análisis. Se utilizaron tres instrumentos Panther para analizar 30 réplicas de cada nivel seleccionado. Los resultados se resumen en Tabla 14.

Tabla 14: Detección del virus del Zika en muestras de orina procesada con el Aptima Zika Virus Assay en el sistema Panther

Copias/ml del virus	Cantidad de réplicas analizadas	Cantidad de resultados positivos	Positividad		
			% P	CI inferior al 95 %	CI superior al 95 %
0	30	0	0	0	11
0,3	30	3	10	3	26
1	30	6	20	10	37
3	30	14	47	30	64
10	30	30	100	89	100
30	30	30	100	89	100
90	30	30	100	89	100

% P = porcentaje de resultados positivos; CI = intervalo de confianza.

La probabilidad de detección del 95 % se determinó por medio de un análisis Probit. Se estableció que el límite de detección del virus del Zika en orina procesada fue de 8,5 copias/ml con una probabilidad de detección del 95 % (Tabla 15).

Tabla 15: Detección por medio del análisis Probit

Muestra de orina	Probabilidad de detección del 95 % en copias/ml (Límites de confianza del 95 %)
Orina procesada	8,5 (6,0-15,3)

Evaluación clínica de las muestras de orina

Se obtuvieron 10 muestras combinadas (muestras combinadas de plasma, suero y orina recopiladas de 10 pacientes sintomáticos) de un recurso comercial. El proveedor determinó que se obtuvieron resultados positivos para el ZIKV en los 10 pacientes sintomáticos de acuerdo con los resultados de las muestras de suero analizadas con el ensayo validado de RT-PCR en tiempo real. Las muestras de orina se procesaron antes del análisis. Las diez muestras de orina procesada se analizaron junto con las muestras de plasma y suero de cada uno de los 10 pacientes con el Aptima Zika Virus Assay. En el análisis inicial, se obtuvieron resultados positivos con todas las muestras. En Tabla 16, se observan los resultados de las 10 muestras combinadas.

Tabla 16: Resultados de las 10 muestras clínicas con ZIKV positivo del Aptima Zika Virus Assay

Identificación de la muestra	País de origen	Cp de referencia (Suero)	Plasma		Suero		Orina procesada	
			Resultado	S/CO	Resultado	S/CO	Resultado	S/CO
1043-TDS-0159	República Dominicana	36,31	Positivo	33,1	Positivo	31,7	Positivo	32,9
1043-TDS-0163	República Dominicana	32,54	Positivo	33,4	Positivo	33,4	Positivo	17,0
1043-TDS-0165	República Dominicana	40,38	Positivo	32,8	Positivo	32,6	Positivo	33,7
1043-TDS-0173	República Dominicana	33,15	Positivo	32,6	Positivo	32,8	Positivo	34,1
1043-TDS-0206	República Dominicana	36,62	Positivo	31,6	Positivo	30,8	Positivo	32,4
1043-TDS-0221	República Dominicana	38,11	Positivo	17,8	Positivo	33,5	Positivo	32,8
1043-TDS-0223	República Dominicana	32,50	Positivo	34,0	Positivo	33,4	Positivo	31,9
1043-TDS-0224	República Dominicana	31,81	Positivo	33,8	Positivo	31,6	Positivo	33,6
1043-TDS-0230	República Dominicana	30,51	Positivo	33,8	Positivo	33,7	Positivo	34,7
1043-TDS-0231	República Dominicana	35,63	Positivo	31,6	Positivo	33,8	Positivo	34,4

Se preparó un total de 99 muestras de orina artificiales con la adición de plasma con ZIKV positivo en muestras individuales de orina: 33 muestras se enriquecieron a 20 copias/ml, 33 muestras se enriquecieron a 36 copias/ml y 33 muestras se enriquecieron a 100 copias/ml. Cada muestra de orina enriquecida se procesó antes del análisis con el Aptima Zika Virus Assay. Se obtuvieron resultados positivos con todas las muestras artificiales de orina procesada.

Se utilizó un total de 123 muestras individuales de orina como muestras negativas del RNA del ZIKV. Se recopilaron 87 muestras de orina de una población normal. Se recopilaron 36 muestras de orina individuales de mujeres de una población de pacientes (7 pacientes con cáncer de mama, 6 pacientes con enfermedad renal crónica, 6 pacientes con lupus eritematoso sistémico, 4 pacientes con neumonía, 8 pacientes con diabetes y 5 pacientes con infección del tracto urinario). Cada muestra de orina se procesó antes del análisis con el Aptima Zika Virus Assay. Se obtuvieron resultados negativos con todas las muestras. Los resultados de la evaluación clínica se resumen en Tabla 17.

Tabla 17: Resultados de la evaluación clínica de las muestras de orina procesada

Categoría de las muestras	Aptima Zika Virus Assay		
	Cantidad analizada	ZIKV positivo	ZIKV negativo
Muestras naturales con virus del Zika positivo	10	10/10	0/10
Muestras clínicas artificiales con virus del Zika positivo	99	99/99	0/99
Muestras clínicas previstas con virus del Zika negativo	123	0/123	123/123
Coincidencia de porcentaje positivo		100 % (109/109)	
		CI del 95 %: Del 96,6 % al 100 %	
Coincidencia de porcentaje negativo		100 % (123/123)	
		CI del 95 %: Del 97,0 % al 100 %	

CI = intervalo de confianza

Porcentaje de resultados no válidos de las muestras de orina

El porcentaje de resultados no válidos causados por errores químicos durante el análisis clínico y analítico de las muestras de orina que se describen en esta sección fue de 0 % (0/482). No se obtuvieron resultados no válidos debido a fallas de hardware o problemas en las muestras. El porcentaje total de resultados no válidos fue de 0 % (0/482).

Evaluación de la sensibilidad analítica con material de referencia de la FDA

La evaluación de la sensibilidad analítica se realizó con material de referencia (S1 y S2) y un protocolo estándar proporcionados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA). El estudio constó de un estudio de determinación de intervalo y un estudio de confirmación del LoD. Los resultados se resumen en Tabla 18.

Tabla 18: Resultado del estudio de confirmación del LoD con materiales de referencia de la FDA

Materiales de referencia proporcionados por la FDA	Tipo de muestra	LoD confirmado según el protocolo de la FDA (Unidades de detección de RNA/ml con NAAT)
S1 (1 x 10 ⁶ unidades de detección de RNA/ml con NAAT)	Plasma	100
	Orina procesada	300
S2 (5 x 10 ⁶ unidades de detección de RNA/ml con NAAT)	Plasma	150
	Orina procesada	150

Bibliografía

1. **International Committee on Taxonomy of Viruses.** <http://www.ictvonline.org/>
2. **Musso D, Gubler DJ.** 2016. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* Jul;29(3):487-524.
3. **Kitchen SF, Haddow AJ.** 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 46:509–520.
4. **Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB.** 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
5. **Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D.** 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1085–1086.
6. **Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI.** 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885–1886. doi: 10.3201/eid2110.150847.
7. **Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K.** 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:569-572.
8. **Cao-Lormeau, V.-M. et al.** Guillain–Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case–control study. *Lancet* [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6).
9. **Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR.** 2016. Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016 May 19;374(20):1981-1987. doi: 10.1056/NEJMs1604338. PubMed PMID: 27074377.
10. **Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM.** 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21: 359-61.
11. **U.S. Centers for Disease Control and Prevention.** <http://www.cdc.gov/zika/transmission/blood-transfusion.html>
12. **Kacian DL, Fultz TJ** 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. U.S. Patent 5,399,491.
13. **Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35:1588-1594.
14. **Nelson NC, Cheikh A, Matsuda E, Becker M.** 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* 35:8429-8438.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
16. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
17. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 Estados Unidos

Atención al cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com
Soporte técnico: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Para obtener información de contacto adicional, visite www.hologic.com.

Hologic, Aptima, Panther y los logotipos asociados son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. o sus subsidiarias en Estados Unidos y en otros países.

Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en este folleto son propiedad de sus respectivos dueños.

Este producto puede estar cubierto por una o más patentes de Estados Unidos que se detallan en www.hologic.com/patents.

© 2016-2017 Hologic, Inc. Todos los derechos reservados.

AW-15406-2401 Rev. 003
2017-03 (3/24/17)