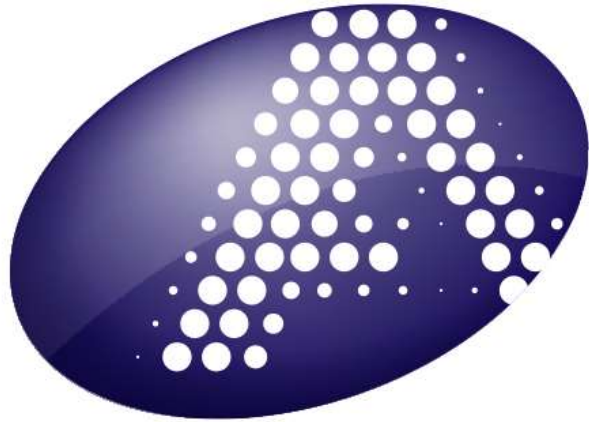


Producto Núm. YF-500



ATCC®

YF MAC-HD 1.0

**Kit para detectar IgM al
Virus de la Fiebre Amarilla**

**Para uso exclusivo en investigación (RUO)
No utilice en procedimientos
de diagnóstico**

**Almacene a 4°C
NO CONGELAR**



Uso Único

Contenido

informacion de fondo	3
principio de la prueba	3
Uso previsto	3
Tomas de muestras.....	3
Almacenamiento y transporte	4
Descarte	4
Recomendaciones.....	4
Limitaciones del YF MAC-HD.....	4
Características del YF MAC-HD	5
Artículos incluidos en el kit:	5
Artículos requeridos que no están incluidos en este kit:	6
Artículos recomendados que no están incluidos en este kit:6	
Protocolo YF MAC-HD (De rutina – hasta 24 muestras evaluadas en sencillo)	7
YF MAC-ON (HASTA 8 MUESTRAS ANALIZADAS EN TRIPLICADO DE LA NOCHE A LA MANAÑA) – Protocolo de resolución equivoca.....	8
NOTAS TECNICAS	8
CALCULOS AUTOMATICOS.....	10
CALCULOS MANUALES.....	11
Validez.....	11
Análisis de los resultados de la muestra.....	12
Interpretación de los resultados.....	12

YF MAC-ON [INCUBACION DE ANTIGENO DE LA NOCHE A LA
MANANA PARA UTILIZAR CON MUESTRAS EQUIVOCAS, HASTA

American Type Culture Collection (ATCC®)

10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

8 MUESTRAS, EVALUADAS EN TRIPLICADO] – Protocolo de resolución equivoca	14
APENDICE	16
Variabilidad entre réplicas del control.....	16
OD del control positivo reaccionado en YFVA	16
OD del control negativo reaccionado en YFVA.....	16
OD del control positivo reaccionado con el antígeno normal.....	17
Rendimiento del kit YF MAC-HD	18
Vida útil/estabilidad.....	18
Sensibilidad analítica (LOD)	18
Especificidad analítica.....	19
Panel de desempeño clínico	21
Sensibilidad clínica ¹	21
Especificidad clínica ¹	21
Estudios de rendimiento clínico adicionales	21
Uso en regiones endémicas	22
Precisión.....	22
REFERENCIAS.....	22

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: DOC-008788
Effective Date: 01 MAR 2023

INFORMACION DE FONDO

El virus de la fiebre amarilla pertenece al género Flavivirus y se encuentra en las áreas tropicales y subtropicales de América del Sur y África. Está relacionado con otros virus como los del dengue y del Nilo Occidental. Este virus se transmite a los seres humanos a través de las picaduras de mosquitos infectados. La gravedad de la enfermedad varía entre una enfermedad febril autolimitada y enfermedad hepática grave con hemorragia. La enfermedad de la fiebre amarilla se diagnostica según los síntomas, los hallazgos físicos, los análisis de laboratorio y los antecedentes de viaje, incluida la posibilidad de exposición a mosquitos infectados. No hay un tratamiento específico para la fiebre amarilla. La atención médica se basa en los síntomas e incluye descanso y líquidos, y el uso de analgésicos y medicamentos para reducir la fiebre. Las medidas para prevenir la infección por el virus de la fiebre amarilla incluyen usar repelente de insectos, ropa protectora, mosquiteros y ponerse la vacuna.

- En las personas que presentan síntomas, el periodo de incubación (tiempo entre el momento de la infección y la aparición de la enfermedad) es típicamente de 3 a 6 días.
- Los síntomas iniciales incluyen la aparición repentina de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza intenso, dolor de espalda, dolores corporales generales, náuseas y vómitos, fatiga y debilidad. La mayoría de las personas mejoran después de la aparición inicial de los síntomas.
- Después de una breve remisión que dura entre unas horas y un día, aproximadamente el 15 % de los casos evolucionan a una forma más grave de la enfermedad. Esta forma grave se caracteriza por fiebre alta, ictericia, hemorragias y, por último, choque e insuficiencia de múltiples órganos.
- De las personas que presentan la enfermedad grave, entre el 20 y el 50 % pueden morir.
- Las que se recuperan de la fiebre amarilla generalmente tienen inmunidad duradera contra la infección posterior.
- Un diagnóstico presuntivo de fiebre amarilla a menudo se basa en los signos clínicos del paciente, los lugares y fechas de viaje y el

historial epidemiológico del lugar donde se produjo la posible infección.

- La vigilancia de la fiebre amarilla es fundamental para la detección temprana de los brotes. La prueba de inmunoglobulina M (IgM) es un medio para identificar infecciones en la comunidad.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El YF MAC-HD es un ensayo cualitativo basado en el método MAC-ELISA, desarrollado por el CDC, que detecta IgM contra el virus de la fiebre amarilla (FA) (ver Referencia 1, Pagina 22). El YF MAC-HD utiliza IgM antihumana para capturar IgM en suero humano. Si hay presencia de IgM reactiva a la fiebre amarilla, ésta reacciona con el antígeno completo del virus de la fiebre amarilla no infeccioso, el cual se detecta utilizando un anticuerpo monoclonal reactivo contra el grupo de flavivirus, conjugado con peroxidasa de rábano. Esto produce una reacción colorimétrica medible utilizando un 3,3',5,5'-tetratrametilbencidina. El CDC MAC-ELISA se ha adaptado a un formato de kit que permite completar el análisis en menos tiempo, e incorpora estabilidad y uso fácil, haciéndolo conveniente en una amplia variedad de entornos de laboratorio. El protocolo para resolver discrepancias en los resultados está incluido en estas instrucciones de uso (Ver Página 8 "YF MAC-ON").

Uso previsto

El YF MAC-HD es solo para uso en investigación (RUO) y está diseñado para ser utilizado en la detección de IgM contra el virus de la fiebre amarilla en suero humano. Debe ser utilizado en un laboratorio por personal capacitado. Los resultados de este ensayo son cualitativos y deben utilizarse en el contexto de la vigilancia de laboratorio de la fiebre amarilla. Los resultados deben confirmarse de acuerdo con las recomendaciones que apliquen en cada laboratorio. Este ensayo no ha sido validado para propósitos clínicos (i.e., para el diagnóstico de la enfermedad de la fiebre amarilla).

Tomas de muestras

Las muestras de suero deben obtenerse utilizando tubos separadores de suero de acuerdo con las instrucciones del tubo. Antes de separar el suero, la muestra de sangre puede ser refrigerada por 24 horas a 4°C - 8°C. Debe dejarse que la muestra de sangre se coagule y retracte dejándola a

(800) 638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Doc ID: DOC-008788
Effective Date: 01 MAR 2023

American Type Culture Collection (ATCC®)

10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

temperatura ambiente por media hora a una hora. Separe el suero del coágulo centrifugando a 1000 x g por 10 minutos. El suero debe ser transferido inmediatamente a un tubo nuevo rotulado y almacenado a 4°C - 8°C hasta que se use en el ensayo. Si no tiene una centrifuga disponible, el suero puede ser separado del coagulo, de forma aséptica, utilizando una pipeta esterilizada y debe ser transferido a un tubo estéril nuevo rotulado y almacenado a 4°C - 8°C hasta que se use en el ensayo. Debe tener mucho cuidado para evitar transferir células rojas. **Hemolisis puede resultar en resultados incorrectos.** Pruebas usando suero separado deben ser ejecutadas lo más pronto posible y antes de 7 días. Después de completar la prueba, el suero restante puede ser almacenado a -20°C, o a menos de -60°C si va a ser utilizado para el procedimiento de aislamiento.

Almacenamiento y transporte

El kit YF MAC-HD debe almacenarse a 4°C hasta la fecha de caducidad, después de la cual debe descartarse (consulte la sección de descarte). La temperatura de transporte debe mantenerse a 4°C. A la botella del sustrato se le coloca un Tempilabel®. **Si el punto se ve negro, esto indica que el kit puede haberse visto comprometido debido a la exposición a altas temperaturas y que debe desecharse.**

ADVERTENCIA: MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO Este kit contiene reactivos elaborados con suero humano. El suero se obtiene comercialmente y es negativo para VIH-1 y VIH-2, VIH-Ag, VHC, HBsAg y RPR mediante métodos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés). Maneje todos los sueros y kits como si contuvieran agentes infecciosos. Al realizar los procedimientos, tome las precauciones necesarias para trabajar con agentes microbiológicos peligrosos y siga los procedimientos estándar para el descarte adecuado de las muestras.

Descarte

Los materiales restantes del kit YF MAC-HD deben descartarse por medio de la esterilización en autoclave o de acuerdo con los procedimientos estándar de su laboratorio.

Recomendaciones

- Para la interpretación de los resultados obtenidos utilizando este kit es crítico obtener la fecha de inicio de los síntomas, la fecha de colección de la muestra y el lugar de residencia/historial de viajes del paciente y cualquier otra información de salud relevante.
- Las muestras tomadas en los primeros días después del inicio de síntomas pueden no contener anticuerpos IgM contra la fiebre amarilla por lo que se debe obtener muestras de seguimiento.
- Los resultados deben ser interpretados de acuerdo con las pautas de vigilancia nacional, algoritmos de pruebas y tomando en consideración todo el historial clínico y de vacunación del paciente.

Limitaciones del YF MAC-HD

- Solo para uso en investigación/vigilancia epidemiológica de FA
- Se debe considerar la posibilidad de obtener resultados falsos positivos y falsos negativos, incluyendo falsos positivos debido a una infección aguda con malaria, niveles elevados de factor reumatoide y la reacción cruzada con la IgM de otros flavivirus
- Ya que el IgM de la FA puede ser detectado después de la vacunación, se debe procurar el historial de vacunación para ayudar a determinar el origen de la exposición (virus silvestre o vacunación)
- Este kit debe usarse de acuerdo con los algoritmos nacionales de FA y la confirmación de los resultados debe realizarse como se indica
- Este kit no puede distinguir entre anticuerpos inducidos por la vacuna y anticuerpos contra el virus de la fiebre amarilla silvestre
- Esta YF MAC-HD se considera una prueba de alta complejidad y solo debe realizarse en laboratorios con las condiciones adecuadas de almacenamiento y funcionamiento, y por personal de laboratorio capacitado

- El kit YF MAC-HD solo ha sido validado para su uso con suero; no se han validado otras posibles fuentes de anticuerpos (i.e. sangre anticoagulada, esputo)

Características del YF MAC-HD



- **Uso único (i.e., no almacene ningún componente restante de este kit aun si sobra alguno después de usarlo)**
- Úselo para analizar 24 muestras sin replicas o 8 muestras por triplicado siguiendo el protocolo de la noche a la mañana si la prueba es dudosa (YF MAC-ON)
- Toma aproximadamente 3.5 horas de principio a fin (sin incluir el tiempo de preparación de las muestras)
- Se incluyen todos los reactivos y diluyentes, excepto el agua que se usa para diluir el amortiguador de lavado.
- Los reactivos se proporcionan en diluciones listas para usar, o liofilizadas y en diluciones listas para usar tras su reconstitución. No se requiere la valoración ni mayor dilución de los reactivos.
- Todos los reactivos de almacenan juntos (Ver Nota técnica #2, página 8)
- Vida útil mínima de 1 año a partir de su fabricación.
- Tolerancia a la fluctuación de temperaturas durante su envío (Ver Nota técnica #3, página 8)
- Sensibilidad similar a la de la prueba CDC-ELISA (prueba de 72 horas).
- Especificidad similar a la de la prueba CDC-ELISA (Ver Nota técnica #4, página 8).
- Sin restricciones de envío para la solución quelante.
- La prueba ha sido optimizada para que la incubación del suero y el conjugado se realicen at 28°C (recomendado), pero 21°C, 26°C, y 37°C también funcionan para esta prueba, según datos limitados.
- Los resultados equívocos se deben verificar repitiendo el análisis de la muestra usando el protocolo de análisis de un día al otro (YF MAC-ON, página 8)
- Detecta la IgM en suero a las cepas naturales del virus o de las vacunas (Ver Nota técnica #5, página 8)

- **Las muestras deben ser manejadas usando las medidas de control de infección apropiadas para manejar especímenes clínicos. (Ver Nota técnica #1, página 8)**

Artículos incluidos en el kit:

1. Concentrado de amortiguador de lavado (líquido, a una concentración de 10X) (botella transparente) (YF-1)
2. Concentrado de conjugado (líquido en el estabilizador) (vial de color ámbar con tapa blanca) (YF-2)
3. Diluyente de conjugado (liofilizado) (vial de vidrio con **sello plateado** ●-marcado) (YF-3)
4. Agua estéril para reconstitución (botella opaca con etiqueta verde) (YF-4)
5. Control de suero negativo (liofilizado en amortiguador) (vial de vidrio con sello azul) (YF-5)
6. Antígeno normal - sobrenadante de cultivo de células Vero, inactivado de manera simulada mediante irradiación gamma y BPL (liofilizado en amortiguador) (vial de vidrio con **sello verde**) (YF-6) **Se requiere el antígeno normal para detectar las reacciones de fondo no específicas que se traducen como negativos. No se debe eliminar de la prueba.**
7. Una placa de microtitulación estabilizada de 96 pozos recubierta de IgM (YF-7)
8. Control positivo IgM FA de anticuerpos monoclonales humanizados (liofilizado en amortiguador) (vial de vidrio con **sello rojo**) (YF-8)
9. Diluyente de muestra (líquido, a dilución lista para usar) (botella opaca con **etiqueta naranja**) (YF-9)
10. Solución de parada (líquida, dilución lista para usar) (botella opaca) (YF-10)
11. Sustrato (líquido, dilución lista para usar) (botella marrón) (Ver nota técnica #6) (YF-11)
12. Antígeno FA - YF 17D sobrenadante del cultivo de células Vero, inactivado (liofilizado en amortiguador) (vial de vidrio con **sello plateado**) (YF-12)
13. Tres (3) sellados de placas de microtitulación

14. “Cuaderno de cálculos YF MAC-HD”, disponible en la versión Excel 2022. El cuaderno puede ser obtenido aquí: <https://www.atcc.org/federal-solutions/global-health-and-biodefense/yellow-fever-surveillance-kits>.

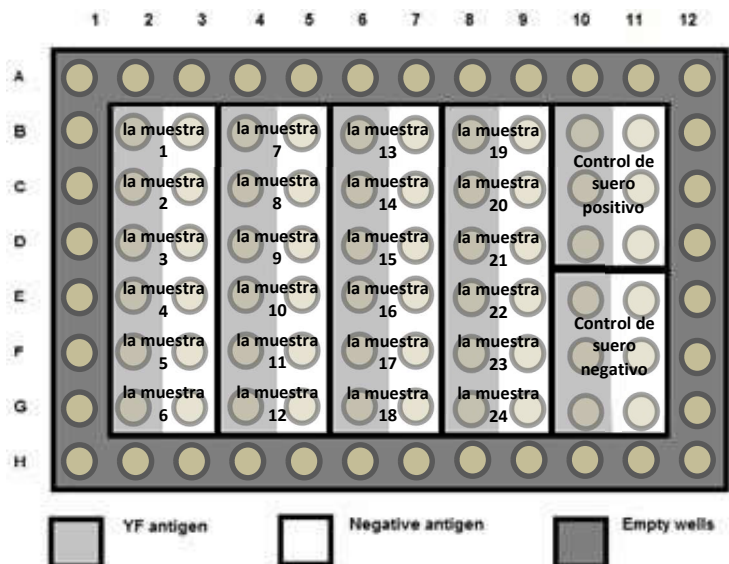
Artículos requeridos que no están incluidos en este kit:

1. Pipetas calibradas (P-10, P-200, P-1000, multicanal 200 µL)
2. Cabinas de bioseguridad para la manipulación de las muestras potencialmente infecciosas (Ver Nota técnica Note #1, página 8)
3. Reservorios para reactivos (mínimo de 2) – requerido para el uso con la pipeta multicanal
4. Agua desionizada para el amortiguador de lavado
5. Botella PETG de 1L o contenedor similar container para mezclar agua desionizada y amortiguador de lavado
6. Lector de placas (filtro 450 nm)
7. Refrigerados (2°C a 8°C)
8. Marcador permanente
9. Tubos para la dilución de muestras (i.e., polipropileno; tubos 1 mL; 1 por muestra) y cubre tubos

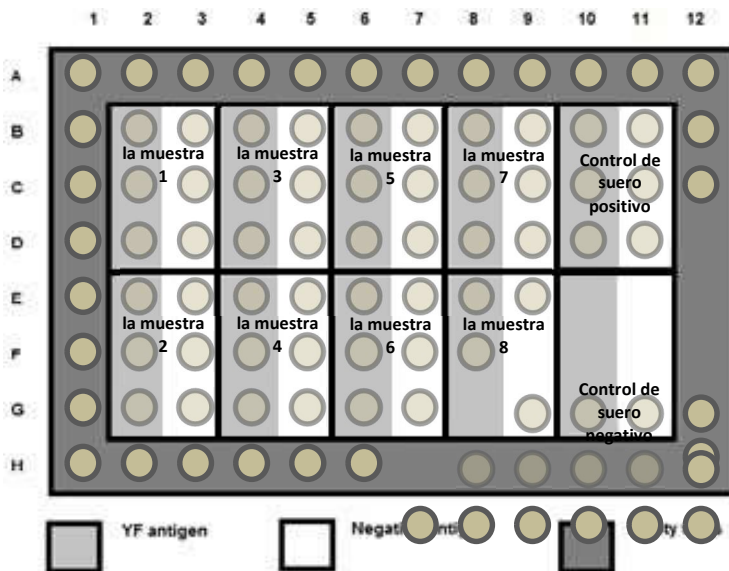
Artículos recomendados que no están incluidos en este kit:

1. **Control interno positivo para IgM de FA**– altamente recomendado para demostrar consistencia
2. Lavador de placas de microtitulación (se prefiere a manualmente lavar las placas de microtitulación)
3. Agitado Vortex (útil pero no necesario)
4. Incubadora fijada a 28°C (preferido)
5. Tijeras
6. Ayudante de pipeta (100 mL en 900 mL) o puede añadir un volumen medido de 100 mL del concentrado (10x) amortiguador de lavado a un volumen medido de 900 mL de agua desionizada

Formato para placa sencilla de rutina (hasta 24 muestras)



Formato para la resolución de pruebas dudosas (8 muestras por placa para el protocolo de la noche a la mañana YF MAC-ON)



American Type Culture Collection (ATCC®)
 10801 University Blvd.
 Manassas, VA 20110 USA
www.atcc.org

PROTOCOLO YF MAC-HD (DE RUTINA – HASTA 24 MUESTRAS EVALUADAS EN SENCILLO)

NO PERMITA QUE LA PLACA SE SEQUE EN NINGUN MOMENTO

1. Ponga todos los reactivos del kit a temperatura ambiente.
2. Diluya las muestras de suero para análisis y control positivo interno, usando el diluyente para muestras (provisto) en una proporción de 1:100; mezcle. (Se recomienda 4 µL de suero en 396 µL de diluyente de muestra para obtener un volumen total de 400 µL). Use una nueva punta de pipeta para cada muestra.
3. Agregue 400 µL de agua estéril (provista) a los viales del control positivo y negativo; mezcle; utilice los controles lo más pronto posible
4. Utilice tijeras para abrir el paquete que contiene la placa; marce los pocillos con un marcador permanente (los pocillos externos no están recubiertos). La ubicación para los controles positivos y negativos ya viene marcada.
5. Agregue 50 µL del suero a 2 pozos (1 antígeno viral + 1 pozo de antígeno normal por muestra). Añade 50 µL de controles positivos y negativos a 6 pozos por cada control (3 pozos de antígeno viral y 3 de antígeno normales).
6. Cubra la placa con el sellador. Incube por 30 minutos a 28°C (Ver Nota técnica #7, página 8).
7. Durante el periodo de incubación en el paso 6, prepare el amortiguador de lavado 1X. Agregue 900 mL de agua desionizada a 100 mL de amortiguador de lavado 10X (provisto).
8. 10 minutos antes de que termine la incubación del paso 6, reconstituya el antígeno de la FA y el antígeno normal en 1.8 mL de agua estéril y mezcle
9. Cuando el paso 6 este completado, cuidadosamente remueva el sellador y deseche.
10. Lave la placa usando 5 ciclos si usa una lavadora de placas o 3 ciclos si usa un lavado manual (Ver Nota técnica #8, página 9).
11. Agregue 50 µL de antígeno de la FA a cada pocillo en las columnas pares (izquierda); 50 µL de antígeno normal a las columnas impares (derecha).
12. Cubra la placa con el sellador. Incube por 2 horas a 4°C.
13. 5 minutos antes que termine la incubación del paso 12, agregue 3.45 ml de agua estéril al diluyente de conjugado y luego agregue 50 µL de conjugado al diluyente; mezcle.

14. Al terminar la incubación del paso 12; cuidadosamente remueva el sellador y deseche.
15. Lave la placa usando 5 ciclos si usa una lavadora de placas o 3 ciclos si usa un lavado manual (Ver Nota técnica #8, página 9).
16. Agregue 50 µL de mezcla conjugada por pocillo, a todos los pocillos. Cubra la placa con el sellador. Incube por 30 minutos a 28°C.
17. Al terminar la incubación del paso16; cuidadosamente remueva el sellador y deseche.
18. Lave la placa usando 15 ciclos girando la placa cada 5 ciclos si usa una lavadora de placas de 96-pozos, 10 ciclos si usa una lavadora de tiras, (Ver Nota técnica #9, página 9) o 6 ciclos si usa un lavado manual.
19. Agregue 75 µL de sustrato por pocillo, a todos los pocillos (Ver Nota técnica #3 and #6, página 8). Coloque la placa, sin cubrir, en la oscuridad. Incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
20. Agregue 75 µL de solución de parada por pocillo, a todos los pocillos, incluyendo A1-D1 (Ver Nota técnica #10, página 9).
21. Lea a 450 nm no más de 15 minutos después (Ver Nota técnica #11, página 8). Consulte las páginas 10-12 y Apéndice paginas 16-17 para hacer los cálculos.
22. **Deseche debidamente los componentes restantes del kit.**

YF MAC-ON (HASTA 8 MUESTRAS ANALIZADAS EN TRIPLICADO DE LA NOCHE A LA MAÑANA) – PROTOCOLO DE RESOLUCION EQUIVOCA

Este es un método opcional para ayudar a resolver resultados dudosos. Para analizar hasta 8 muestras por triplicado usando el YF MAC-HD, use el formato de 8 muestras en la página 7. Siga el protocolo para YF MAC-HD en la página 7 con las siguientes excepciones:

5. Agregue la muestra diluida a 3 pozos con antígeno viral y 3 normales.
10. Cubra la placa e incube el antígeno de la noche a la mañana (18-24h) a 4°C.

Para los cálculos, consulte las páginas 10 y 14.

NOTAS TECNICAS

1. Debido a la naturaleza potencialmente infecciosa de las muestras séricas, las condiciones mínimas de contención deben incluir el uso de una cabina de bioseguridad, gafas de seguridad, una bata de laboratorio y guantes. El amortiguador de lavado residual debe ser tratado con cloro o cualquier otro desinfectante aprobado. Si no hubiera una cabina de bioseguridad disponible, las muestras deben ser inactivadas en un baño de María a 56°C por 30 minutos antes de su uso, a fin de minimizar el riesgo. Tenga en cuenta que esto no garantiza la inactivación de todos los agentes infecciosos.
2. La estabilidad ha sido optimizada para el almacenamiento de todos los componentes del kit a 4°C. No se han estudiado otras temperaturas. El congelamiento inactivará el conjugado. **NO CONGELAR**
3. Si el sensor de temperatura en el contenedor de sustrato muestra un punto negro sólido, esto indica que el kit ha sido sometido a condiciones inaceptables durante el envío. Deseche el kit.
4. **Falsos positivos ocurren y pueden suceder por infección con otros flavivirus, malaria, vacunación contra la FA e interferencia por niveles elevados del factor reumatoide. Consulte sus pautas nacionales de WHO para las recomendaciones de pruebas adicionales.**
5. YF MAC-HD no ha sido validado para su uso con otros tipos de muestras que no sean suero.
6. Si el sustrato presenta un color azul claro, se debe descartar. Se recomienda que se vierta el sustrato en un depósito de reactivos (no incluido) y se use una pipeta multicanal para dispensarlo, debido a que el ingreso repetido de la punta de la pipeta en el sustrato causará contaminación de color.
7. Coloque las placas selladas en capas individuales para su incubación. No apilarlas una sobre la otra. El kit ha sido optimizado para la incubación de

suero y conjugados a 28°C. Según datos limitados, las temperaturas de incubación entre 21°C y 37°C también son aceptables.

8. Las placas lavadas con una **lavadora de tiras** se deben lavar usando 10 ciclos con 250 µL de amortiguador de lavado para el paso de lavado final.

9. Se recomienda el uso de una **lavadora de placas automática** (ya sea una lavadora de 96 pozos o una lavadora de tiras), con un programa de la siguiente manera:

a. Lavadora de placas (5 ciclos): Aspire 2 segundos, lave 1 segundo, aspire 2 s, lave 1 s, aspire 2 s, lave 1 s, aspire 2 s, lave 1 s, aspire 2 s, lave 1 s, aspire 4 s. El volumen del lavado es 250 µl por pocillo. Se debe agregar 100 ml de amortiguador de lavado 10X (provisto) a 900 ml de agua desionizada.

Si no hay un lavador de placas disponible, el lavado se puede hacer a mano con una pipeta multicanal de la siguiente manera:

b. Lavado manual de placas: Ponga el contenido de la placa en un recipiente para desechos (en una cabina de bioseguridad si las muestras fueran potencialmente infecciosas). Agregue 200 µL de amortiguador de lavado en cada pocillo. Descártelo. Repita para obtener el número requerido de ciclos. Después del ciclo final, seca la placa sin frotar, sobre una superficie absorbente para quitar el amortiguador de lavado que haya quedado en los pocillos. Los resultados de las placas lavadas a mano pueden variar levemente de los resultados obtenidos de las lavadas automáticamente

10. Para evitar crear burbujas, dispense la solución quelante sosteniendo las puntas de la pipeta contra las paredes de los pocillos. No dispense más allá de la primera posición de dispensado de la pipeta. La presencia de burbujas altera la lectura de DO, dando resultados incorrectos.

11. Si está utilizando el programa de Excel para los cálculos, no es necesario configurar el lector para que lea como blancos los pozos automáticamente usando A1, B1, C1, D1. Sin embargo, el blanqueo automático con el lector de placas es muy útil si los cálculos se hacen manualmente.

CALCULOS AUTOMATICOS

Se recomienda el uso del cuaderno de Excel “YF MAC-HD Calculations workbook”, disponible en las versiones de Excel 2022. El cuaderno se puede obtener de <https://www.atcc.org/federal-solutions/global-health-and-biodefense/yellow-fever-surveillance-kits>. Siga las instrucciones en la pestaña “Instrucciones”.

Cuando se corre el formato de 24 muestras (medio día de rutina), use la pestaña “YF MAC-HD” para ingresar los resultados de A₄₅₀ en las celdas A1: L8. La validez, los valores de control y los resultados de las pruebas se calcularán automáticamente.

Para analizar las muestras del protocolo de la noche a la mañana (por triplicado usando el formato de 8 muestras), use la pestaña “YF MAC-ON” para ingresar los resultados del A₄₅₀ en las celdas B2: M9. La validez, los valores de control y los resultados de las pruebas se calcularán automáticamente.

Los ejemplos para los diferentes formatos de las pruebas se muestran en pestañas separadas en el cuaderno “2022 Calculations workbook YF MAC-HD”.

CALCULOS MANUALES

Para realizar cálculos manuales, utilice la plantilla que se proporciona a continuación.

YF MAC-HD Formato de 24 muestras

Abreviaciones

YFVA = Fiebre Amarilla Antígeno Viral

NA = Antígeno Normal

PCVA = Promedio del Control Positivo que reacciona con YFVA

NCVA = Promedio de Control Negativo que reacciona con YFVA

PCNA = Control positivo promedio que reacciona con NA

Validez

1. Ingrese los ODs de la muestra, menos el promedio de los ODs de los blancos $[(A1 + B1 + C1 + D1) / 4]$ en la plantilla provista en la página 13.

2. Calcule PCVA.

Antes de calcular el PCVA, tome en cuenta cualquier variabilidad en las réplicas de control positivo del antígeno viral (ver el Apéndice, página 16-17).

Utilice las réplicas de PCVA que no excedan el límite de variabilidad (VL) de OD 0.3 para calcular PCVA.

Ejemplo: $(B10 + C10 + D10) / 3 = PCVA$

3. Calcule NCVA.

Antes de calcular el NCVA, tome en cuenta cualquier variabilidad en las réplicas del control negativo en YFVA (ver el Apéndice, página 16-17).

NOTA IMPORTANTE: si NCVA es <0.05 , utilice el valor NCVA de 0.05 para calcular los valores P/N; en esta situación, los cálculos de variabilidad no son necesarios.

Utilice las réplicas de NCVA que no excedan el límite de variabilidad (VL) de 0.025 para calcular el NCVA.

Ejemplo: $(E10 + F10 + G10) / 3 = NCVA$

4. Calcule PCNA.

Antes de calcular el PCNA, tome en cuenta cualquier variabilidad en las réplicas del control positivo en NA (ver el Apéndice, página 16-17).

Ejemplo: $(B11 + C11 + D11) / 3 = PCNA$

Tome en cuenta que los OD del control negativo que reaccionaron con NA no se utilizan en los cálculos.

5. Calcule el P/N del control positivo (P/N): $PCVA/NCVA = P/N$

6. Calcule la proporción de fondo normal (NBR): $PCVA/PCNA = NBR$

7. Determine si la prueba es válida:

- a. Si no se exceda el control positivo PCVA-VL, la prueba es válida. Si no, repita la prueba.
- b. Si PCVA es ≥ 0.6 , la prueba es válida. Si no, repita la prueba.
- c. Si no se exceda el control negativo NCVA-VL, la prueba es válida. Si no, repita la prueba.
- d. Si el NCVA es < 0.2 , la prueba es válida. Si no, repita la prueba.
- e. Si P/N del control positivo es ≥ 3 , la prueba es válida; si no, repita la prueba
- f. Si el NBR del control positivo es ≥ 2 , la prueba es válida; si no, repita la prueba

Nota: Si hay variabilidad en los OD de los controles, verifique las técnicas de pipeteo y mezclado, la lavadora de placas y la técnica del lavado manual.

Análisis de los resultados de la muestra

8. Calcule e ingrese el resultado (P/N) para cada muestra: $P/N = OD \text{ de la muestra con YFVA} / NCVA$

NOTA IMPORTANTE: si NCVA es < 0.05 , utilice el valor NCVA de 0.05 para calcular los valores P/N

9. Calcule e ingrese la proporción de fondo normal (NBR) para cada muestra: $NBR = OD \text{ de la muestra con YFVA} / OD \text{ de la muestra con NA}$

Interpretación de los resultados

10. Interprete los resultados usando la siguiente formula:

YF IgM positivo (POS)	$P/N \geq 2$	$NBR \geq 1.5$
YF IgM equívoco (EQ)*	$P/N \geq 1.5 < 2$	$NBR \geq 1.5$
YF IgM negativo (NEG)	$P/N < 1.5$	NBR CUALQUIERA
YF IgM negativo (NEG)	P/N CUALQUIERA	$NBR < 1.5$

*Realice una prueba opcional usando el protocolo de la noche a la mañana YF MAC-ON (p. 8)

Tabla de resultados 24 muestras										
	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Control positivo	Control positivo
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____		
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			
C	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		PCVA= _____	PCNA= _____
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			
D	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____			
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____		
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			
E	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Control negativo	
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____		
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			
F	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		NCVA= _____	Prueba válida si todo es verdadero: PCVA≥0.6 Control Pos P/N ≥3.0 NBR≥2.0 NCVA<0.2 PCVA/NCVA -VL no superado ¿La prueba es válida? Si/no
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____		
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			
G	Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____		Nombre de la muestra: _____			
	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____	P/N= _____	NBR= _____		
	Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____		Pos/Neg/EQ _____			

Método de lavado: Manual / Tira / 96 pocillos (un círculo)	Número de lote _____	Fecha de vencimiento del kit _____
--	----------------------	------------------------------------

ID de la placa _____	Nombre _____	Fecha _____	Laboratorio _____
----------------------	--------------	-------------	-------------------

YF MAC-ON [INCUBACION DE ANTIGENO DE LA NOCHE A LA MANANA PARA UTILIZAR CON MUESTRAS EQUIVOCAS, HASTA 8 MUESTRAS, EVALUADAS EN TRIPLICADO] – PROTOCOLO DE RESOLUCION EQUIVOCA

Realice la validación siguiendo los pasos del 1-7 en las páginas 11-1., Luego analice e interprete los resultados de la muestra de la siguiente manera:

Análisis de resultados de la muestra

8. Calcule e ingrese el resultado (P/N) para cada muestra:

P/N = DO promedio de la muestra en YFVA/NCVA

Si alguna réplica de la muestra que reaccionó en YFVA o NA es obviamente diferente de las otras 2 réplicas, descarte esa réplica y use las otras 2 para calcular el P/N.

NOTA IMPORTANTE: si NCVA es <0.05, use el valor de NCVA de 0.05 para calcular los valores de P / N.

9. Calcule e ingrese la proporción normal de la señal de fondo (NBR) para cada muestra:
la muestra en NA

NBR = DO promedio de la muestra en YFVA/DO promedio de

Interpretación de resultados

10. Interprete y circule los resultados usando lo siguiente:

IgM FA positivo (POS)	P/N ≥3	NBR ≥2.0
IgM FA equívoco (EQ)	P/N ≥2.0 <3.0	NBR ≥2.0
IgM FA negativo (NEG)	P/N <2.0	NBR CUALQUIERA
IgM FA negativo (NEG)	P/N CUALQUIERA	NBR <2.0

Tabla de resultados 8 muestras										
	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA	YF VA	NA
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Control positivo	Control positivo
B										
C										
D										
Mean OD									PCVA=	PCNA=
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=
Interp	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			Prueba válida si todo es verdadero: PCVA≥0.6 Control Pos P/N ≥3.0 NBR≥2.0 NCVA<0.2
	Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Nombre de la muestra:		Control negativo	
E										
F										
G										
Mean OD									NCVA=	PCVA/NCVA -VL no superado
	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=	P/N=	NBR=		¿La prueba es válida?
Interp	Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ		Pos/Neg/EQ			Si/no

Método de lavado: Manual / Tira / 96 pocillos (un círculo)	Número de lote _____	Fecha de vencimiento del kit _____
--	----------------------	------------------------------------

ID de la placa _____	Nombre _____	Fecha _____	Laboratorio _____
----------------------	--------------	-------------	-------------------

APENDICE

Variabilidad entre réplicas del control

OD del control positivo reaccionado en YFVA

Identifique si la variabilidad entre las réplicas excede el límite de variabilidad de PCVA (PCVA-VL) de OD 0,3.

1. Identifique la réplica con el valor medio y calcule la diferencia entre ella y los otros 2 valores:

- Si los valores superior e inferior son <0,3 diferentes del valor medio, utilice los 3 valores para calcular el PCVA. El valor del PCVA-VL no se excedió.
- Si los valores superior o inferior son $\geq 0,3$ diferentes del valor medio, descarte el valor con $\geq 0,3$ diferencia. Calcule el PCVA utilizando los 2 valores restantes. El valor del PCVA-VL no se excedió.
- Si los valores superior e inferior son $\geq 0,3$ diferentes del valor medio, la prueba excedió el PCVA-VL; repita la prueba. Verifique las técnicas de pipeteo, la mezcla de reactivos y el método de lavado de placas.

Ejemplo:

Réplica 1 1.495 Réplica 2 0.975 Réplica 3 1.167

1. El número medio es Réplica 3 (1.167)

Réplica 1 menos Réplica 3 = 0,328

Réplica 3 menos Réplica 2 = 0,192

a) No aplicable

b) La Réplica 1 es $\geq 0,3$ diferente de Réplica 3. Descarte Réplica 1. Réplica 3 es <0.3 diferente de Réplica 2; utilice Réplicas 2 y 3 para calcular el PCVA. $PCVA (0,975+1,167) / 2 = 1,071$

c) No aplicable

OD del control negativo reaccionado en YFVA

Identifique si la variabilidad entre las réplicas excede el límite de variabilidad de NCVA (NCVA-VL) de OD 0,025.

1. Identifique la réplica con el valor medio y calcule la diferencia entre ella y los otros 2 valores:

- Si los valores superior e inferior son <0,025 diferentes del valor medio, utilice los 3 valores para calcular el NCVA. No se excedió NCVA-VL.
- Si los valores superior o inferior son $\geq 0,025$ diferentes del valor medio, descarte el valor con $\geq 0,025$ diferencia. Calcule el NCVA utilizando los 2 valores restantes. No se excedió NCVA-VL.

c) Si los valores superior e inferior son $\geq 0,025$ diferentes del valor medio, la prueba excede el NCVA-VT. Repita la prueba y verifique las técnicas de pipeteo, la mezcla de reactivos y el método de lavado de placas.

Ejemplo:

Réplica 1 0.053 Réplica 2 0.045 Réplica 3 0.063

1. El número medio es Réplica 1 (0.053).

Réplica 3 menos Réplica 1 = 0,01

Réplica 1 menos Réplica 2 = 0,008

a) Si los valores superior e inferior son $< 0,025$ diferentes del valor medio; utilice los 3 valores para calcular el PCVA. $PCVA = (0,053+0,045+0,063)/3 = 0,054$

b) No aplicable

c) No aplicable

OD del control positivo reaccionado con el antígeno normal

Identifique si hay demasiada variabilidad entre las réplicas. Nota: no hay umbral de variabilidad para el PCNA.

1. Identifique la réplica con el valor medio y calcule la diferencia entre ella y los otros 2 valores:

a) Si los valores superior e inferior son $< 0,3$ diferentes del valor medio, utilice los 3 valores para calcular el PCNA.

b) Si los valores superior e inferior son $\geq 0,3$ diferentes del valor medio, descarte el valor con $\geq 0,3$ diferencia. Calcule el PCNA usando los 2 valores restantes.

c) Si los valores superior e inferior son $\geq 0,3$ diferentes del valor medio, calcule el PCNA utilizando los 3 valores, pero verifique las técnicas de pipeteo, la mezcla de reactivos y el método de lavado de placas.

Ejemplo:

Réplica 1 0.102 Réplica 2 1.345 Réplica 3 0.187

1. El número medio es Réplica 3 (1.187).

Réplica 2 menos Réplica 3 = 1.158

Réplica 3 menos Réplica 1 = 0,085

a) No aplicable

b) La Réplica 2 es $\geq 0,3$ diferente de Réplica 3. Descarte Réplica 2. Réplica 1 es $< 0,3$ diferente de Réplica 3. Utilice las Réplicas 1 y 3 para calcular el PCNA. $PCNA = (0,102+0,187) / 2 = 0,145$

c) No aplicable

RENDIMIENTO DEL KIT YF MAC-HD

Vida útil/estabilidad

12 meses a partir de la fecha de manufactura. El kit debe ser almacenado a 4 °C, hasta al menos 1 y no se deben usar después de la fecha de vencimiento. Los kits son para ser utilizados una sola vez y los componentes restantes una vez abierto, deben ser descartados.

Sensibilidad analítica (LOD)

En ausencia de un estándar internacional, se hizo una estimación comparativa de la sensibilidad analítica para YF MAC-HD, utilizando 3 réplicas de cada una de las 8 concentraciones de muestras positivas para IgM de FA baja, media y alta. Esta se comparó con valoraciones similares de las muestras utilizando el MAC-ELISA CDC YF. Cada muestra se utilizó sin diluir, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16, 1:32, 1:64, 1: 128, donde las diluciones se realizaron en suero humano normal. Posteriormente, las diluciones de la muestra se volvieron a diluir a la dilución de trabajo del ensayo, utilizando el diluyente de muestra apropiado y se analizaron. Se utilizaron muestras de suero positivas para IgM de FA bajo, medio y alto.

Prueba	Muestra No.	Neat	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
YF MAC-HD CDC MAC-ELISA	1 (Pos bajo)	POS POS	POS POS	POS EQ	EQ EQ	EQ NEG	NEG NEG	NEG NEG	NEG NEG
YF MAC-HD CDC MAC-ELISA	2 (Pos medio)	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS EQ	NEG EQ	NEG EQ	NEG EQ
YF MAC-HD CDC MAC-ELISA	3 (Pos medio)	POS POS	POS POS	POS EQ	NEG NEG	NEG NEG	NEG NEG	NEG NEG	NEG NEG
YF MAC-HD CDC MAC-ELISA	4 (Pos alto)	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS EQ	POS EQ	EQ NEG	NEG NEG
YF MAC-HD CDC MAC-ELISA	5 (Pos alto)	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS POS	POS EQ

Conclusión: Todas las muestras dieron resultados positivos en el YF MAC-HD a diluciones iguales o superiores a las del CDC MAC-ELISA de referencia.

Especificidad analítica

Se analizaron muestras de suero que contenían IgM contra flavivirus distintos al de la FA, a alfavirus y otras infecciones o sustancias utilizando el YF MAC-HD para determinar el potencial de detección de esta prueba para IgM específico solo a FA.

Virus	No. of muestras	YF MAC-HD resultados POS	YF MAC-HD resultados NEG	% ESPECIFICIDAD ⁴
Flavivirus				
Dengue ³	10	4	6	60
Zika ³	10	1	9	90
Virus del Nilo Oriental ²	20	4	16	80
Powassan ²	19	6	13	68
Encefalitis Japonesa ³	9	5	4	44
Encefalitis de St. Louis ²	2	0	2	100
Hepatitis C ³	20	0	20	100
Alfavirus				
Chikungunya ³	2	0	2	100
Encefalitis Equina del Este ³	2	0	2	100
Fiebre del Rio Ross ²	11	0	11	100
Otras Infecciones o Sustancias				
Cytomegalovirus ²	7	2	5	71
Leptospira ²	7	1	6	85
Virus de Epstein-Barr ²	2	1	1	50
Virus de la Varicella-Zoster ¹	1	0	1	100
Malaria ³	10	9	1	10
Factor Reumatoide ³	3	2	1	33
Antígenos leucocitarios Humanos ¹	3	0	3	100
Anticuerpo Antinuclear ²	11	1	10	90
Posible ictericia obstructiva ¹	9	0	9	100
Suero de pacientes reumaticos ¹	3	1	2	66
Anticuerpo anti-ratón Humano ³	5	0	5	100
Autoanticuerpo positivo ¹	2	0	2	100
Virus de Inmunodeficiencia Humano ⁵	9	0	9	100

¹Datos de ensayos realizados por el CDC.

²Datos del CDC y de ensayos realizados por un laboratorio independiente.

³Datos de ensayos realizados por un laboratorio independiente.

⁴El limitado número de muestras puede que no refleje los niveles actuales de especificidad.

⁵Ensayo realizado en ATCC usando suero positivo al VIH.

Conclusión: El YF MAC-HD reacciona de forma inespecífica con algunas muestras positivas de IgM anti-flavivirus arbovirales, especialmente aquellas que tienen títulos altos. Esto es de esperarse, ya que el antígeno usado en el kit YF MAC-HD incluye la proteína de envoltura, que se sabe que tiene epítomos que causan reacción cruzada con otros flavivirus. Es consistente con la referencia CDC YF MAC-ELISA. Las muestras con una reacción positiva en el YF MAC-HD deben investigarse más a fondo utilizando métodos adicionales para confirmar la infección por fiebre amarilla.

Panel de desempeño clínico

Se utilizaron muestras de África y América para evaluar el desempeño clínico del YF MAC-HD.

Sensibilidad clínica¹

Suero positivo FA IgM	No. de muestras	Resultados POS YF MAC-HD	Resultados NEG YF MAC-HD	% Sensibilidad clínica	95% Intervalo de Confianza
Positivo alto	14	14	0	100%	78.5% - 100%
Positivo medio	13	13	0	100%	77.2% - 100%
Positivo bajo	3	1	2	33%	6.2% - 79.2%
Total	30	28	2	93%	78.7% - 98.2%

Especificidad clínica¹

	No. de muestras	Resultados POS YF MAC-HD	Resultados NEG YF MAC-HD	% Especificidad clínica	95% Intervalo de Confianza
Suero negativo FA IgM	50	1	49	98%	89.5% - 99.6%

¹Datos de ensayos realizados en un laboratorio independiente.

Estudios de rendimiento clínico adicionales

Un total de 237 muestras de referencia positivas y 398 muestras de referencia negativas de África y América del Sur dieron una sensibilidad del 95% y una especificidad del 97%, utilizando kits YF MAC-HD producidos por un fabricante diferente utilizando la misma metodología que la ATCC. Se corrieron paneles de competencia utilizando el YF MAC-HD en laboratorios de 43 países de África y América. Estos constaban de 10-20 muestras positivas y negativas de FA. 42/43 laboratorios identificaron correctamente el 100% de las muestras.

Uso en regiones endémicas

Cuarenta y tres laboratorios nacionales de África y América recibieron kits de YF MAC-HD producidos por un fabricante alternativo y paneles de competencia de 10 a 20 muestras. Cuarenta y dos de los laboratorios identificaron correctamente el 100% de las muestras y 1 laboratorio identificó correctamente el 90%. Esto indica que YF MAC-HD es útil en condiciones de laboratorio en regiones endémicas de FA.

Precisión

La precisión entre ensayos se midió usando tres réplicas de cada una de las 10 muestras de diferente positividad de IgM de FA, evaluadas en la misma prueba, al mismo tiempo, por el mismo operador. El coeficiente de variación (CV) fue del 5% (rango 0-8%). La precisión entre un mismo ensayo se midió utilizando tres réplicas de cada una de las 10 muestras de diferente positividad de IgM evaluadas por tres operadores diferentes en tres días diferentes. El CV fue del 14.6% (rango 10-18%).

REFERENCIAS

1. Martin DA¹, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. ***J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1823-6.**
2. Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Laven J, Panella AJ, Kosoy O, Lanciotti R, Johnson BW. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. ***Journal of Virological Methods.* 2015; 225:41-48.**
3. Goodman C, Demanou M, Mulders M, Mendez-Rico J, Basile AJ. Technical viability of the YF MAC-HD ELISA kit for use in yellow fever-endemic regions. ***PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2021; 15(6): e0009417.**