

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

El ampliCube Respiratory Viral Panel 2 es un test in-vitro cualitativo usado para identificar específicamente el RNA de los virus de la parainfluenza (1-4) y el ADN de los bocavirus humanos en el esputo, frotis, BAL (lavado broncoalveolar) o secreción traqueal humanos.

2 Campo de aplicación

El ampliCube Respiratory Viral Panel 2 se usa para el diagnóstico diferencial seguro, sobre todo en lactantes y niños pequeños que presentan síntomas similares a la gripe y síntomas respiratorios. Los virus humanos de la parainfluenza (HPIV) pertenecen a la familia de los paramixovirus y se dividen en cuatro tipos. HPIV-1 y HPIV-2 son los causantes principales de la laringitis con afección de la tráquea y bronquios en los niños pequeños. HPIV-3 puede causar bronquitis y pulmonías, sobre todo en los lactantes. HPIV-4 causa probablemente desarrollos más leves. Los bocavirus pertenecen a la familia de los parvovirus y pueden causar síntomas respiratorios hasta pulmonías acompañadas de fiebre alta, sobre todo en lactantes y niños. El bocavirus humano se presenta frecuentemente como una coinfección con otros agentes patógenos virales durante las infecciones respiratorias.

3 Principio del test

El test es un sistema PCR real time (tiempo real) RT (Reverse Transkriptase). Utiliza primers (iniciadores) específicos y sondas marcadas para la delimitación del RNA en el cADN, amplificación y detección del RNA y ADN de los virus de la parainfluenza y de los bocavirus. Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la prueba del paciente no contengan sustancias inhibitorias de RT-PCR, se somete la prueba a un control interno (IC) durante la aislación del ácido nucleico. Este IC se delimita, amplifica y detecta en la misma mezcla reactiva de RT-PCR en el cADN. De esta manera es posible excluir resultados negativos incorrectos del test debidos a una inhibición de la reacción RT-PCR. El IC se usa al mismo tiempo para la comprobación de la extracción del ácido nucleico de la prueba del paciente.

Las sondas para la detección específica del agente patógeno específico del ácido nucleico están marcadas con el colorante reportero FAM (virus 1-4 de la parainfluenza) y HEX (bocavirus). Las sondas para la detección del control interno están marcadas con ATTO 647N. De este modo es posible la detección simultánea de todas las secuencias objetivo en una mezcla de reacción.

El valor Ct (*cycle threshold*) describe la parte de la curva, en la cual la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente superando el valor de fondo.

4 Reactivos

4.1 Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 50 comprobaciones. Cada set de reactivos contiene:

P&P MIX	150 µl de primer & mezcla de prueba para el panel viral 2 y el control interno (tapón verde)
ENZYME	600 µl mezcla de enzimas (tapón blanco) Contiene transcriptasa inversa y polimerasa de ADN. (El componente está coloreado de azul.)
CONTROL INT	250 µl control interno (tapón incoloro)
CONTROL +	170 µl control positivo (tapón rojo)
CONTROL -	2 x 1800 µl control negativo (tapón azul)
INSTRU	1 Instrucciones de uso

4.2 Reactivos, materiales y aparatos requeridos adicionalmente

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation para Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit comercial para aislar el ácido nucleico. Recomendamos utilizar el siguiente sistema de extracción del ácido nucleico: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Termociclador en tiempo real. Recomendamos utilizar el siguiente termociclador: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Placas para PCR de 96 pocillos y láminas o recipientes de reactivo (PCR-clean), en función del termociclador
- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl

- Mezclador tipo Vórtex
- Minicentrifugadora
- En caso dado, centrifugadoras de placas
- Guantes protectores desechables exentos de talco
- Bloque de refrigeración

5 Durabilidad y manejo

- Almacenar los reactivos antes y después de su uso entre -25°C y -18°C.
- Es preciso evitar descongelar y volver a congelar repetidas veces los componentes (no más de diez veces). Recomendamos llevar a cabo un cálculo alícuota de los componentes del test después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2°C – +8°C).
- Proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución del análisis.
- Antes de iniciar el test es necesario descongelar completamente todos los reactivos, mezclarlos brevemente con el Vortex y luego centrifugarlos.
- Los envases llevan una fecha de caducación. A partir de esta fecha rechazaremos todo reclamo por garantía de calidad.
- El análisis debe ser llevado a cabo exclusivamente por personal profesional autorizado.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones sustanciales del producto o bien de la prescripción de uso, es posible que la aplicación del producto esté en desacuerdo con el uso previsto especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede conducir a resultados incorrectos del test. Agregar cuidadosamente las pruebas de pacientes y los controles. Tomar cuidado de evitar que las mezclas de reactivos se depositen en otras concavidades.

6 Advertencias y medidas de seguridad

- Utilizar el producto exclusivamente para el diagnóstico in vitro.
- Todas las pruebas de pacientes deben manejarse como si fueran potencialmente infecciosas.
- Durante todo el análisis es necesario llevar guantes desechables adecuados.
- Todos los reactivos y materiales que entran en contacto con las pruebas potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o deben desecharse de acuerdo con las prescripciones de higiene vigentes en el lugar de aplicación. Es necesario observar las concentraciones y tiempos de incubación especificados por el fabricante.
- Nunca reemplazar ni mezclar los reactivos con reactivos de otros lotes de kits, con otros kits de PCR de MIKROGEN ni con reactivos de otros fabricantes.
- Leer detenidamente y observar las instrucciones de uso, antes de iniciar el análisis. La no observancia del protocolo indicado en las instrucciones de uso puede conducir a resultados incorrectos.

7 Toma de pruebas y preparación de los reactivos

7.1 Material de pruebas

El material inicial para el ampliCube Respiratory Viral Panel 2 es el ADN y RNA extraído del esputo, frotis, BAL o secreción traqueal de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado del test. Es necesario asegurar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología PCR en tiempo real.

7.2 Extracción de los ácidos nucleicos

Extraiga usted los ácidos nucleicos de la prueba del paciente y del control negativo (NC). Para la extracción recomendamos un volumen inicial de 200 µl y para la elución un volumen de 50 µl. Las extracciones de 400 µl de material inicial eluidas en 100 µl mostraron resultados similares. Seguir las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

- Descongelar el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).
Asegurarse que el IC y el NC estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar el IC y el NC brevemente con el Vortex y luego centrifugarlos durante corto tiempo!
- Durante la extracción agregar 5 µl de IC a cada prueba del paciente y al NC (en relación con 50 µl de eluato). El IC debe agregarse a la mezcla del tampón para lisis de las pruebas y no directamente al material de prueba. (Nota: ¡No es posible aplicar el IC a la PCR sin llevar a cabo la extracción!)
- Extraer las pruebas del paciente y el NC. (Nota: ¡No es posible aplicar el NC a la PCR sin llevar a cabo la extracción!)
- El control positivo no se extrae.

Recomendamos utilizar el siguiente sistema de extracción del ácido nucleico que se usó para evaluar la prestación:

Sistema de extracción	Volumen de pruebas	Volumen de elución
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Si usted desea utilizar otros métodos de extracción, consulte previamente al fabricante para aclarar la compatibilidad.

7.3 Hacer la mezcla maestra

- Descongelar el Primer & Mezcla de prueba (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteger los reactivos contra la luz.
Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar los reactivos con el Vortex y luego centrifugarlos durante un breve tiempo!
- Preparar la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Componente	Mezcla maestra para 1 reacción
Primer & Mezcla de prueba	3 µl
Mezcla de enzimas	12 µl
Volumen total	15 µl

- Mezclar con el Vortex la mezcla maestra y luego centrifugarla durante un breve tiempo.
- Preparar 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de PCR.

7.4 Preparar la reacción de PCR

- Descongelar el control positivo (PC) (tapón rojo).
Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar los reactivos con el Vortex y luego centrifugarlos durante un breve tiempo!

Componente	1 Reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluato de prueba o eluato de NC o bien PC	10 µl

- Pipetear respectivamente 10 µl del eluato de prueba en la mezcla maestra.
- Pipetear 10 µl del control positivo (no preparado) en la mezcla maestra.
- Pipetear 10 µl del eluato de control negativo en la mezcla maestra.

¡Cada protocolo debe contener un control positivo y un control negativo!

Cerrar la placa PCR con un folio óptico adhesivo y los recipientes de reactivo con los tapones previstos.



Las placas de RCP o los tubos de reacción se deben agitar en vórtice a máxima velocidad durante al menos 10 segundos y luego se deben centrifugar brevemente.

8 Programación del termociclador en tiempo real

El ampliCube Respiratory Viral Panel 2 se evaluó con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Ajuste de los canales de detección

	Virus 1-4 de la parainfluenza	Bocavirus	Control interno (IC)
Colorante reportero	FAM	HEX	ATTO 647N
Color	verde	amarillo	rojo
Emisión	510 nm	580 nm	660 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

Las especificaciones respecto a las longitudes de onda de los canales de detección se refieren al LightCycler® 480 II.

Para el LightCycler® 480 II es necesario utilizar previamente una compensación de color provista por Mikrogen.

8.2 Programa PCR

Transcripción inversa	50°C	8 min.
Desnaturalización	95°C	3 min.
Amplificación	45 ciclos	
• Desnaturalización	95°C	10 seg.
• Recocido/Elongación	60°C	45 seg.

Para informaciones básicas sobre la programación de los diferentes termocicladores en tiempo real véase el manual de instrucciones del respectivo termociclador. Para informaciones más detalladas acerca de la programación del termociclador PCR de tiempo real usado en combinación con el ampliCube Respiratory Viral Panel 2 en diversos instrumentos PCR de tiempo real, sírvase consultar al fabricante.

9 Resultados

La evaluación de los datos en el LightCycler® 480 II tiene lugar con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validación

- El control negativo debe encontrarse bajo el *límite*. Si estos controles se contaminan (curva positiva) el test no será evaluable.
- El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor Ct del control positivo debe ser < 33. Si el control positivo se encuentra fuera de esta tolerancia, significa que hay un problema con la amplificación.
- La curva debe ser positiva en el control interno de pruebas negativas y en el control negativo. Si hay desviaciones en la curva del IC en una prueba negativa en comparación con el control negativo, significa que hay un problema en la extracción o inhibición de la RT-PCR.

9.2 Evaluación

Las señales mayores que el *límite* se evalúan como resultados positivos. Los campos vacíos se evalúan como resultado negativo.

	Virus 1-4 de la parainfluenza	Bocavirus	Control interno (IC)
Color			
verde	positivo		
amarillo		positivo	
rojo			positivo*

*Si los canales de detección presentan señales positivas, no se requiere la señal del control interno para interpretar el test. Si la prueba del paciente presenta una gran carga de agente patógeno, puede que se reduzca o que falte la señal para el control interno.

10 Límites del método, restricciones

- Los resultados del test deben contemplarse siempre en relación con los hallazgos clínicos. Las consecuencias terapéuticas del hallazgo deben contemplarse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo del test del virus de la parainfluenza y del bocavirus no significa que puede excluirse una infección con los respectivos agentes patógenos.

11 Características de la prestación

11.1 Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad se determinaron mediante pruebas definidas como positivas y pruebas definidas como negativas.

Tabla 1: Define pruebas positivas

ampliCube Respiratory Viral Panel 2	Virus de la parainfluenza (1-4) (n=66)	Bocavirus (n=16)
Negativo	0	0
Positivo	66	16
Sensibilidad	100%	100%

Tabla 2: Define pruebas negativas

ampliCube Respiratory Viral Panel 2	Virus de la parainfluenza (1-4) (n=19)	Bocavirus (n=73)
Negativo	19	73
Positivo	0	0
Especificidad	100%	100%

11.2 Sensibilidad analítica

El límite de comprobación (LoD) del ampliCube Respiratory Viral Panel 2 se determinó en un sistema LightCycler® 480 II (Roche) mediante series de diluciones de ADN de plasmidio de concentración conocida. El límite de comprobación de 95% se determinó mediante un análisis Probit con el software CombiStats™ Versión 5.0 (Council of Europe).

Tabla 3: Límite de comprobación (LoD)

	Virus de la parainfluenza (1-4)	Bocavirus
LoD		
Límite de detección de 95%	23,29* (13,94 – 61,34)	21,31 (12,46 – 55,66)
Genomio/PCR		

*Los datos se refieren al virus 2 de la parainfluenza; además se analizaron los virus 1, 3 y 4 de la parainfluenza. Los límites de comprobación fluctuaban entre 23,46 y 905,51.

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los primers y sondas seleccionados del ampliCube Respiratory Viral Panel 2 detectan específicamente los patógenos seleccionados. La especificidad se determinó además mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus y patógenos humanos.

Tabla 4: Bacterias y virus analizados para indicar la especificidad analítica del ampliCube Respiratory Viral Panel 2.

Bacterias	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Adenovirus B (serotipo 3)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus C (serotipo 1)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Coronavirus 229E
<i>Escherichia coli</i>	Coronavirus HKU1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Coronavirus MERS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coronavirus NL63
<i>Legionella pneumoniae</i>	Coronavirus OC43
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Coxsackievirus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cytomegalovirus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enterovirus 68
<i>Staphylococcus aureus</i>	Virus Epstein-Barr
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Metaneumovirus A humano
	Virus de influenza A
	Virus de influenza B
	Virus de influenza A H1N1
	Measles Virus
	Virus de paperas
	Parechovirus
	Virus respiratorio sincitial A
	Virus respiratorio sincitial B
	Rinovirus

Ninguna de estas pruebas presentó una señal positiva. Los primers y sondas utilizados en el ampliCube Respiratory Viral Panel 2 no mostraron reacción cruzada alguna con los agentes patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) era válido en todos los análisis.

11.4 Equivalencia de diferentes materiales de prueba

Se determinó el coeficiente de variación (VK) del valor Ct entre el agua y el extracto del respectivo material de prueba después de agregar ADN de plasmidio de una concentración conocida.

Tabla 5: Equivalencia de diferentes materiales de prueba

	Virus de la parainfluenza (1-4)	Bocavirus
VK [%] (BAL, H ₂ O)	0,65	0,64
VK [%] (esputo, H ₂ O)	1,48	1,68
VK [%] (frotis, H ₂ O)	0,59	0,91

El coeficiente de variación (VK), basado en el valor Ct (*cycle threshold*) entre el agua y los extractos de ácido nucleico (obtenidos de los diferentes materiales de prueba), era ≤ 1,68% en todos los genes dirigidos.

12 Bibliografía

- Jin Li et. al. (2013): A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus Types/Subtypes. *BioMed Research International*, June 2013, Volume 2013, Article ID 327620, 8 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/327620>
- Ozeas Galeno da rocha Neto et. al. (2013): Update on viral community-acquired pneumonia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, Sept. 2012, 59(1):78-84
- Andrew T. Pavia (2011): Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2011;52(S4):S284–S288
- Fanny Renois et. al. (2010): Rapid Detection of Respiratory Tract Viral Infections and Coinfections in Patients with Influenza-Like Illnesses by Use of Reverse Transcription-PCR DNA Microarray Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2010, Volume 48, No. 11, p. 3836-3842, doi:10.1128/JCM.00733-10
- Henrick Schomacker et. al. (2012): Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol*. June 2012, 2(3): 294–299, doi:10.1016/j.coviro.2012.02.001
- John S. Tregoning et. al. (2010): Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2010, Vol. 23, No. 1, p. 74-98, doi:10.1128/CMR.00032-09

Bajo consulta enviamos a usted complacidos literatura más detallada.

13 Explicación de los símbolos

	El contenido es suficiente para <n> análisis Cantidad de análisis
	Primer & Mezcla de prueba
	Mezcla de enzimas
	Control interno
	Control positivo
	Control negativo
	Instrucciones de uso
	Observar las Instrucciones de uso
	Contenido, contiene
	Medio de diagnóstico in vitro
	Número de lote/versión
	Número de pedido
	Utilizable hasta Fecha de vencimiento
	Almacenamiento desde x°C hasta y°C
	Fabricante

14 Datos del fabricante y de la versión

ampliCube Respiratory Viral Panel 2	Nº de artículo 50112
Instrucciones de uso válido a partir de	GAACRV2002ES 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Alemania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de



GAACRV2002