

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

ampliCube Respiratory Viral Panel 5 es una prueba cualitativa *in vitro* para identificar específicamente el RNA del virus de la gripe A, del virus de la gripe B y del virus respiratorio sincitial A y B (VRS A/B) en *esputo, frotis, LBA* (lavado broncoalveolar) o *secreción traqueal humanos*.

2 Campo de aplicación

Los virus de la gripe A y B son patógenos de la gripe estacional y pertenecen a la familia de los ortomixovirus. Los virus respiratorios sincitiales A y B pertenecen la familia Pneumoviridae. Estos virus pueden causar síntomas, sobre todo en las vías respiratorias superiores. En los niños pequeños, y especialmente en los lactantes, las infecciones por VRS suelen ser más graves y pueden requerir tratamiento hospitalario. Muchos otros patógenos respiratorios, como los rinovirus y los metaneumovirus humanos, pueden causar cuadros clínicos muy similares. En términos de sensibilidad y especificidad, la detección biológica molecular de la gripe se considera el método de referencia.

3 Principio de la prueba

La presente prueba es un sistema de análisis de RCP (transcriptasa inversa) (TI) en tiempo real. Utiliza cebadores específicos y sondas marcadas para la transcripción del ARN en ADNc y la amplificación y detección del ARN de los virus de la gripe A y B y del VRS (A/B). Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la muestra del paciente no contienen sustancias inhibitoras de la RCP-RT, se añade a la muestra un control interno (IC) durante el aislamiento del ácido nucleico. Este IC se transcribe, amplifica y detecta en la misma mezcla reactiva de RCP-RT en el ADNc. De esta manera se pueden excluir resultados negativos falsos de la prueba debidos a una inhibición de la reacción de RCP-RT. El IC se usa al mismo tiempo para la comprobación de la extracción del ácido nucleico de la muestra del paciente.

Las sondas para la detección de los ácidos nucleicos específicos del patógeno están marcadas con el colorante reportero FAM (virus de la gripe A) HEX (virus de la gripe B) y ATTO Rho 12 (VRS A/B); las sondas para la detección del control interno están marcadas con ATTO 647N. Esto permite la detección simultánea de todas las secuencias objetivo en una mezcla de reacción.

El valor Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) describe la parte de la curva en la que la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente, sobrepasando el valor de fondo.

4 Reactivos

4.1 Contenido del envase

Un envase contiene reactivos suficientes para 50 determinaciones. Cada kit de reactivos contiene:

P&P MIX	150 µl de Primer & Probe-Mix para Respiratory Viral Panel 5 y control interno (tapón verde)
ENZYME	600 µl de Enzym Mix (tapón blanco); contiene transcriptasa inversa y polimerasa de ADN (componente teñido en azul.)
CONTROL INT	250 µl de control interno (tapón incoloro); para todos los kit y lotes de los ampliCube Respiratory Viral Panels y el Coronavirus Panel
CONTROL +	170 µl de control positivo (tapón rojo)
CONTROL -	2 x 1800 µl de control negativo (tapón azul) para todos los kit y lotes de los ampliCube Respiratory Bacterial Panels, Respiratory Viral Panels y el Coronavirus Panel
INSTRU	1 Instrucciones de uso

4.2 Otros reactivos, materiales y aparatos necesarios

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation para Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit comercial para aislamiento de ácido nucleico. Se recomienda el siguiente sistema de extracción de 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 RCP de 96 pocillos y láminas o recipientes de reacción (PCR-clean), en función del termociclador
- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl
- Agitadora vorticial
- Minicentrífugadora
- En caso necesario, centrifugadora de placas
- Guantes protectores desechables sin talco
- Bloque de refrigeración

5 Vida útil y manipulación

- Conservar los reactivos antes y después de su uso entre -25 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 alicotado de los componentes de la prueba después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2 °C a +8 °C).
- Proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución de la prueba.
- Antes de iniciar la prueba, todos los reactivos se deben descongelar completamente, mezclar (brevemente con la agitadora vorticial) y centrifugar.
- Los envases llevan una fecha de caducidad, a partir de la cual ya no se concederá ninguna garantía de calidad.
- La prueba la debe llevar a cabo exclusivamente personal especializado debidamente formado y autorizado.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones sustanciales del producto o de las instrucciones de uso, es posible que la aplicación ya no cumpla el propósito especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede producir resultados incorrectos de la prueba. Añada cuidadosamente las muestras de los pacientes y los controles. Evite arrastrar las mezclas de reactivos a otros pocillos.
- El control interno (IC) incluido en este kit se puede utilizar para todos los kit y lotes de los ampliCube Respiratory Viral Panels y el ampliCube Coronavirus Panel. Se deberá observar la vida útil.
- EL control negativo (NC) se puede utilizar para todos los kit y lotes de los ampliCube Respiratory Bacterial Panels, ampliCube Respiratory Viral Panels y el ampliCube Coronavirus Panel. Se deberá observar la vida útil.

6 Advertencias y medidas de seguridad

- Utilizar el producto exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras 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 muestras potencialmente infecciosas se deben tratar con desinfectantes adecuados o eliminar de acuerdo con las normas de higiene. Se deben observar las concentraciones y los tiempos de incubación especificados por los fabricantes.
- No sustituya ni mezcle los reactivos con reactivos de otros lotes ni con otros kits de RCP MIKROGEN ampliCube, a menos que esté específicamente previsto. Tampoco con reactivos de otros fabricantes.
- Lea detenidamente y observe las instrucciones de uso completas, antes de iniciar la prueba. Las desviaciones del protocolo de análisis indicado en las instrucciones de uso puede producir resultados incorrectos.

7 Toma de muestras y preparación de los reactivos

7.1 Material de muestra

El material de partida para el ampliCube Respiratory Viral Panel 5 es el RNA extraído de esputos, frotis, LBA o secreción traqueal de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado de la prueba. Es necesario asegurar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología de RCP en tiempo real.

7.2 Extracción de ácidos nucleicos

Extraiga ácidos nucleicos de la muestra del paciente y del control negativo (NC). Para la extracción recomendamos un volumen de partida de 200 µl, y un volumen de elución de 50 µl. Las extracciones de 400 µl de material partida eluidas en 100 µl mostraron resultados comparables. Observe las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

Si desea analizar el eluido de la extracción en paralelo a los kits ampliCube Respiratory Viral Panel con ampliCube Respiratory Bacterial Panel Kits, tenga en cuenta el uso diferente del control interno. Encontrará indicaciones correspondientes en las instrucciones de uso de los kits ampliCube Respiratory Bacterial Panel.

- Descongele el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).
Asegúrese de que el IC y el NC estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle el IC y el NC con la agitadora vorticial y centrifúguelos brevemente.
- Durante la extracción, agregue 5 µl de IC a cada muestra del paciente y al NC (en relación con 50 µl de eluido). El IC debe agregarse a la mezcla de tampón de lisis y muestra y no directamente al material de muestra.
- Extraiga las muestras del paciente y el NC. (Nota: No se puede introducir el NC en la RCP sin llevar a cabo la extracción.)
- El control positivo no se extrae.

Recomendamos utilizar el siguiente sistema de extracción de ácido nucleico que se usó para evaluar el rendimiento:

Sistema de extracción	Volumen de muestra	Volumen de elución
MagNAPure [®] Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

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

7.3 Preparación de la mezcla maestra

- Descongele la mezcla de cebador y muestra (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteja los reactivos contra la luz.
Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con la agitadora vorticial y centrifúguelos brevemente.
- Prepare la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Componente	Mezcla maestra para 1 reacción
Primer & Probe-Mix	3 µl
Enzym Mix	12 µl
Volumen total	15 µl

- Mezcle la mezcla maestra con la agitadora vorticial centrifúguela brevemente.
- Prepare 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de RCP.

7.4 Preparación de la reacción de RCP

- Descongele el control positivo (PC) (tapón rojo). **Asegúrese de que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con la agitadora vorticial y centrifúguelos brevemente.**

Componente	1 reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluido de muestra o eluido de NC o PC	10 µl

- Pipetee 10 µl de eluido de muestra en 15 µl de mezcla maestra.
- Pipetee 10 µl de control positivo (no preparado) en 15 µl de mezcla maestra.
- Pipetee 10 µl de eluido del control negativo en 15 µl de mezcla maestra.

Cada ciclo debe incluir un control positivo y uno negativo.

Selle la placa de RCP con una lámina óptica adhesiva u obture los recipientes de reacción 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

ampliCube Respiratory Viral Panel 5 se evaluó con LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche).

8.1 Ajuste de los canales de detección

	Virus de la gripe A	Virus de la gripe B	VRS (A/B)	Control interno (IC)
Canal	FAM	HEX	ROX	Cy5
Colorante reportero	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Color	verde	amarillo	naranja	rojo
Emisión	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

Las indicaciones relativas a las longitudes de onda de los canales de detección se refiere al LightCycler[®] 480 II.

Con el LightCycler[®] 480 II es necesario utilizar previamente una compensación de color proporcionada por MIKROGEN.

8.2 Programa de RCP

Transcripción inversa	50°C	8 min.
Desnaturalización	95°C	3 min.
Amplificación	45 ciclos	
• Desnaturalización	95°C	10 s
• Hibridación/prolongación	60°C	45 s

Encontrará información básica sobre la programación de los diferentes termocicladores en tiempo real en el manual de instrucciones del termociclador correspondiente. Consulte al fabricante para obtener información específica sobre la programación del termociclador de RCP de tiempo real usado en combinación con el ampliCube Respiratory Viral Panel 5.

9 Resultados

9.1 Validación

- El control negativo debe encontrarse debajo del *umbral*. La curva del control interno (IC) en el control negativo debe ser positiva. Si el control negativo muestra una curva positiva (contaminación) o si el IC en el control negativo no es válido, el ciclo de análisis no podrá evaluarse.
- El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor Ct del control positivo debe ser <33. Un control positivo fuera de este intervalo indica un problema con la amplificación.
- La curva debe ser positiva en el control interno (IC) de muestras negativas.
La señal del IC de una muestra de paciente se debe comparar con la señal del IC en el control negativo extraído. Una diferencia >3 Ct del IC entre la muestra y el control negativo o la ausencia de una señal de IC en la muestra pueden indicar una inhibición significativa de la reacción RCP-RT. En estos casos, no es válido un resultado negativo de la prueba.

9.2 Evaluación

La evaluación de los datos puede llevarse a cabo con el correspondiente software de termociclador RCP o con una solución de software admitida específicamente por MIKROGEN para la evaluación automatizada de la RCP. Al utilizar un LightCycler[®] 480 II la evaluación se puede realizar con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recomendado) o con el método *Abs Quant/Fit Points*. Solicite a MIKROGEN más información e instrucciones correspondientes.

Las señales mayores que el *umbral* se valoran como resultados positivos. Los campos vacíos de tabla se valoran como resultado negativo.

	Virus de la gripe A	Virus de la gripe B	VRS (A/B)	Control interno (IC)
Color				
verde	positivo			
amarillo		positivo		
naranja			positivo	
rojo				positivo

*Si los canales de detección del patógeno presentan señales positivas, ya no se requiere la señal del control interno para interpretar la prueba. Una muestra del paciente con gran carga de patógenos puede producir una reducción de la señal o una ausencia de señal para el control interno.

10 Límites del método, restricciones

- Los resultados de la prueba deben contemplarse siempre en relación con el cuadro clínico. Las consecuencias terapéuticas del hallazgo deben contemplarse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo de la prueba con respecto al virus de la gripe A, de la gripe B y del VRS (A/B) no significa que pueda excluirse una infección con los patógenos correspondientes.

11 Características de rendimiento

11.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

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

Tabla 1. Muestras definidas como positivas

ampliCube Respiratory Viral Panel 5	Virus de la gripe A (n=20)	Virus de la gripe B (n=20)	VRS (A/B) (n=20)
Negativo	0	0	0
Positivo	20	20	20
Sensibilidad	100%	100%	100%

Tabla 2. Muestras definidas como negativas

ampliCube Respiratory Viral Panel 5	Virus de la gripe A (n=20)	Virus de la gripe B (n=20)	VRS (A/B) (n=20)
Negativo	20	20	20
Positivo	0	0	0
Especificidad	100%	100%	100%

11.2 Sensibilidad analítica

El límite de detección (LoD) del ampliCube Respiratory Viral Panel 5 se determinó mediante series de diluciones de ADN plasmídico de concentración conocida en un sistema LightCycler® 480 II (Roche). El límite de detección del 95 % se determinó mediante un análisis Probit con el software CombiStats™ Versión 5.0 (Council of Europe).

Tabla 3: Límite de detección (LoD)

	Virus de la gripe A	Virus de la gripe B	VRS (A/B)
LoD			
Límite de detección del 95 % Genoma/RCP	5,34 (3,03 – 14,85)	3,10 (1,63 – 8,90)	1,98 (1,33 – 3,90)

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los cebadores y las sondas seleccionados del ampliCube Respiratory Viral Panel 5 detectan específicamente los patógenos seleccionados. Además, se determinó la especificidad mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus patógenos para el ser humano.

Tabla 4: Bacterias y virus analizados para mostrar la especificidad analítica del ampliCube Respiratory Viral Panel 5.

Bacterias	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Adenovirus serotipo 1 (C)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus serotipo 3 (B)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bocavirus
<i>Escherichia coli</i>	Coronavirus 229 E
<i>Haemophilus influenzae</i>	Coronavirus HKU1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coronavirus del SROM
<i>Legionella pneumoniae</i>	Coronavirus NL63
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Coronavirus OC43
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus de Coxsackie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Citomegalovirus
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterovirus 68
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus de Epstein-Barr
	Virus del sarampión
	Virus de las paperas
	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4

Ninguna de estas muestras presentó una señal positiva. Los cebadores y las sondas utilizados en el ampliCube Respiratory Viral Panel 5 no mostraron ninguna reacción cruzada con los patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) fue válido en todos los análisis.

11.4 Equivalencia de diferentes materiales de muestra

Se determinó el coeficiente de variación (CV) del valor de Ct entre el agua y el extracto del material de muestra correspondiente después de añadir ADN plasmídico de concentración conocida.

Tabla 5. Equivalencia de diferentes materiales de muestra

	Virus de la gripe A	Virus de la gripe B	VRS (A/B)
CV [%] (BAL, H ₂ O)	1,06	1,44	1,14
CV [%] (esputo, H ₂ O)	2,16	1,44	2,77
CV [%] (frotis, H ₂ O)	1,16	0,75	0,89

El coeficiente de variación (CV), basado en el valor Ct (*cycle threshold*) entre el agua y los extractos de ADN (obtenidos de los diferentes materiales de muestra), fue $\leq 2,77\%$ en todos los genes objetivo.

12 Bibliografía

- Matthew J. Binnicker et. al. (2015): Direct Detection of Influenza A and B Viruses in Less Than 20 Minutes Using a Commercially Available Rapid PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2015, Volume 53, Number 7, doi:10.1128/JCM.00791-15
- E. Benites et. al. (2014): Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90(4):370–376
- Daniela Huzly et. al. (2016): Influenza A virus drift variants reduced the detection sensitivity of a commercial multiplex nucleic acid amplification assay in the season 2014/15. *Arch Virol*, June 2016, DOI 10.1007/s00705-016-2930-8
- R. Martins Júnior et. al. (2014): Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 109(6): 716–721, September 2014
- 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
- Xuezheng Ma et. al. (2015): A multiplex PCR assay for the detection of five influenza viruses using a dual priming oligonucleotide system. *BMC Infectious Diseases*, 15:93, 2015, DOI 10.1186/s12879-015-0818-y
- 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
- Jayme Parker et. al. (2015): Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses. *PLoS ONE*, Nov. 2015, 10(11): e0143164. doi:10.1371/journal.pone.0143164
- 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–S289
- O.Primo et. al. (2014): Detection of Respiratory Viruses in Nasopharyngeal Swab and Adenoid Tissue from Children Submitted to Adenoidectomy: Pre- and Postoperative Analysis. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2014;18:150–154
- 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

Con mucho gusto le enviaremos bibliografía más detallada previa solicitud.

13 Explicación de los símbolos

	Contenido suficiente para <n> análisis Número de preparaciones
P&P MIX	Primer & Probe-Mix
ENZYME	Enzym Mix
CONTROL INT	Control interno
CONTROL +	Control positivo
CONTROL -	Control negativo
INSTRU	Instrucciones de uso
	Observar las instrucciones de uso
CONT	Contenido, contiene
IVD	Productos para diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	Número de lote/versión
REF	Número de pedido
	Fecha de caducidad
	Almacenamiento de x °C a y °C
	Fabricante

14 Datos del fabricante y de la versión

ampliCube Respiratory Viral Panel 5	N.º de artículo 50152
Instrucciones de uso válidas a partir de	GAACRV5002ES 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	
	



GAACRV5002