

## **Instrucciones de uso**

# **RealStar<sup>®</sup> PIV RT-PCR Kit 2.0**

11/2019 ES



# RealStar<sup>®</sup>

## PIV RT-PCR Kit 2.0

Para utilizar con

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



262013



96



11 2019



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

## Contenido

<b>1.</b>	<b>Uso indicado.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componentes del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Almacenamiento .....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Información general.....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descripción del producto.....</b>	<b>10</b>
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	12
6.2	Tipos de muestras.....	12
<b>7.</b>	<b>Advertencias y precauciones .....</b>	<b>13</b>
<b>8.</b>	<b>Procedimiento .....</b>	<b>14</b>
8.1	Preparación de las muestras .....	14
8.2	Configuración de Master Mix .....	16
8.3	Configuración de reacción .....	18
<b>9.</b>	<b>Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....</b>	<b>18</b>
9.1	Configuración .....	19
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	19
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia .....	20
<b>10.</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>20</b>
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas .....	21
10.1.1	Serie válida de tests diagnósticos.....	21
10.1.2	Serie no válida de tests diagnósticos.....	21
10.2	Interpretación de los resultados .....	22
10.2.1	Análisis cualitativo.....	22

<b>11. Evaluación de rendimiento .....</b>	<b>23</b>
11.1 Sensibilidad analítica .....	23
11.2 Especificidad analítica.....	27
11.3 Exactitud .....	28
11.4 Evaluación del diagnóstico.....	31
<b>12. Limitaciones .....</b>	<b>33</b>
<b>13. Control de calidad.....</b>	<b>34</b>
<b>14. Asistencia técnica.....</b>	<b>34</b>
<b>15. Bibliografía .....</b>	<b>34</b>
<b>16. Marcas comerciales y aviso legal.....</b>	<b>35</b>
<b>17. Explicación de los símbolos .....</b>	<b>36</b>

## 1. Uso indicado

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de RNA específico de human parainfluenza virus (PIV) de las especies 1, 2, 3 y 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Asimismo, el test permite diferenciar entre RNA específico para el género *Respirovirus* (PIV-1 y PIV-3) y el género *Rubulavirus* (PIV-2 y PIV-4).

## 2. Componentes del kit

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control PIV-1 + PIV-2	1	250
Naranja	Positive Control PIV-3 + PIV-4	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

### 3. Almacenamiento

- El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

#### 4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de escritorio con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

##### NOTA



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

##### NOTA



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



## 5. Información general

Los virus de la parainfluenza humana (VPI) son virus de ARN monocatenarios de sentido negativo de la familia *Paramyxoviridae*. Los VPI humana se dividen en cuatro especies pertenecientes a dos géneros diferentes: PIV-1 y PIV-3 pertenecen al género *Respirovirus*, mientras que PIV-2 y PIV-4 se incluyen en el género *Rubulavirus*. Se describieron dos subespecies para PIV-4 (PIV-4a y PIV-4b) poco después de que se identificara este virus en 1959. Actualmente, se ha notificado la existencia de diversos genotipos para todas las especies de VPI.

Después del *virus sincitial respiratorio humano* (VSRH, virus sincitial respiratorio humano), las infecciones por VPI son la segunda causa más frecuente de enfermedad grave del tracto respiratorio inferior (ETRI) en niños de corta edad. Los estudios serológicos han demostrado que entre el 90 % y el 100 % de los niños de 5 años o mayores presentan anticuerpos para PIV-3 y aproximadamente el 75 % cuentan con anticuerpos para PIV-1 y PIV-2. Las infecciones con virus de parainfluenza también representan un problema significativo para las personas de edad avanzada, con enfermedades cardiopulmonares y en individuos con inmunidad comprometida. Se producen reinfecciones repetidas durante toda la vida, pero habitualmente en adultos se manifiestan como una enfermedad del tracto respiratorio superior (ETRS) leve.

En general, los VPI se han asociado a cualquier tipo de ETRI y ETRS. A menudo se observan las siguientes relaciones entre las especies y los síndromes clínicos específicos, la edad de los pacientes y la estación del brote:

- PIV-1 es la causa principal de crup agudo en lactantes y niños de corta edad, pero también provoca infecciones del tracto respiratorio superior leves, faringitis y traqueobronquitis en todos los grupos de edad. En climas templados, PIV-1 causa brotes bienales de crup en los meses de otoño.
- Por lo general, PIV-2 se asocia a tasas de infección más bajas que PIV-1 o PIV-3 y provoca ETRS leves, además de crup en niños y, ocasionalmente, ETRI. Al igual que en el caso de PIV-1, los brotes suelen suceder principalmente en los meses de otoño con frecuencia anual o bienal.

- PIV-3 es una causa importante de ETRI en lactantes y niños de corta edad y a menudo provoca crup, bronquitis y neumonía en niños menores de 1 año. En niños de mayor edad y adultos, puede causar ETRS o traqueobronquitis. Las infecciones por PIV-3 pueden darse en cualquier estación, con máximos de actividad durante los meses de primavera y principios de verano de cada año.
- PIV-4 es la menos común de este grupo y, por lo general, se asocia con ETRS leves.

#### NOTA



***Debido a la evolución molecular relativamente rápida de los virus de ARN, hay un riesgo inherente para cualquier sistema de pruebas basado en RT-PCR de que la acumulación de mutaciones con el tiempo pueda provocar resultados de falsos negativos.***

## 6. Descripción del producto

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de RNA específico de human parainfluenza virus (PIV) de las especies 1, 2, 3 y 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Asimismo, el test permite diferenciar entre RNA específico para el género *Respirovirus* (PIV-1 y PIV-3) y el género *Rubulavirus* (PIV-2 y PIV-4).

La prueba incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de RT-PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real, utilizando una reacción de transcriptasa inversa (RT) para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de secuencias objetivo específicas y sondas objetivo específicas para la detección de ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Las sondas específicas para PIV-1 y PIV-3 están marcadas con el luminóforo FAM™, mientras que las sondas específicas para PIV-2 y PIV-4 están marcadas

con el luminóforo Cy<sup>®</sup>5. La sonda específica para el Internal Control (control interno) está marcada con el luminóforo JOE<sup>™</sup>.

El uso de sondas ligadas a tintes distinguibles permite la detección paralela de PIV-1/3 (género *Respirovirus*), PIV-2/4 (género *Rubulavirus*) y el Internal Control (control interno) en los correspondientes canales del detector del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de tres procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Transcripción inversa del ARN objetivo y control interno en ADNc
- Amplificación de PCR de objetivo y control interno en ADNc
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control PIV-1 + PIV-2
- Positive Control PIV-3 + PIV-4
- Water (PCR grade)

Internal Control (IC) = Control interno

Positive Control = Control positivo

Water (PCR grade) = Agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, transcriptasa inversa, ADN-polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la transcripción inversa, la amplificación mediada por PCR y la detección de RNA específico de PIV-1 - 4 y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

## 6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

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

## 6.2 Tipos de muestras

El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se ha validado para su uso con el siguiente tipo de muestra:

- Hisopos con muestras respiratorias humanas recogidos en un medio de transporte universal (UTM)

El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se ha validado usando el AltoStar® Purification Kit 1.5 en el AltoStar® Automation System AM16 para la extracción y la purificación de ácido nucleico.

Si se aplica un procedimiento apropiado de extracción de ácido nucleico, se pueden utilizar tipos de muestras adicionales junto con el RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico, así como el uso de tipos de muestras adicionales, debe validarla el usuario.

## 7. Advertencias y precauciones

*Lea detenidamente las Instrucciones de uso antes de usar el producto.*

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes en cuanto a:
  - Integridad
  - Si el número, el tipo y el relleno están completos (véase el capítulo 2. Componentes del kit)
  - Etiquetado correcto
  - Si ha llegado congelado
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y *en procedimientos de diagnóstico in vitro*.
- La muestra clínica siempre se debe tratar como infecciosa y/o con peligro biológico de conformidad con los procedimientos de laboratorio seguros.
- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasa (ADNasa/ARNasa) de las muestras y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Lleve siempre guantes protectores desechables sin polvo al manipular componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de forma unidireccional. Lleve siempre guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de entrar en una zona diferente.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de todos los demás componentes del kit.

- No abra las placas o los tubos de reacción después de la amplificación para evitar la contaminación con amplímeros.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto no degradará el ácido nucleico amplificado y se corre el riesgo de contaminar la zona de laboratorio.
- No use componentes del kit cuya fecha de caducidad haya expirado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Preparación de las muestras

El ARN extraído es el material de partida para el RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0.

La calidad del ARN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Hay que asegurarse de que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología PCR en tiempo real.

Por lo general, los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- AltoStar® Automation System AM16
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se ha validado usando el AltoStar® Purification Kit 1.5 en el AltoStar® Automation System AM16 para la extracción y la purificación de ácido nucleico.

También pueden ser apropiados otros sistemas y kits de extracción de ácido nucleico. No obstante, su idoneidad para el uso con RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 debe validarla el usuario.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aprox. 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

### PRECAUCIÓN



***Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.***

**PRECAUCIÓN**

*El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.*

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

## 8.2 Configuración de Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de RT-PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de RT-PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de RT-PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
<b>Master Mix de volumen</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>



- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de RT-PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl de IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix (gen GPC Master Mix y gen L Master Mix) de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Master Mix de volumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

### PRECAUCIÓN



*Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.*

### PRECAUCIÓN



*Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.*

### 8.3 Configuración de reacción

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Asegúrese de que utiliza todos los controles positivos y al menos un control negativo por Master Mix y serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrifuga con un rotor de placa de microtítulos durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

## 9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

### 9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

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

### 9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Desactivador fluorescente
RNA específico de PIV-1 y PIV-3	PIV-1/3	FAM™	(Ninguno)
RNA específico de PIV-2 y PIV-4a/b	PIV-2/4	Cy®5	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	IC	JOE™	(Ninguno)

### 9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la adquisición de colorantes:

	Fase	Repeti- ciones de ciclos	Adquisición	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Transcripción inversa	Retención	1	-	55	20:00
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclos	45	-	95	0:15
			sí	55	0:45
			-	72	0:15

## 10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

## 10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

### 10.1.1 Serie válida de tests diagnósticos

Una serie de tests diagnósticos es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

ID de control	Canal de detección		
	FAM™	Cy <sup>®</sup> 5	JOE™
Control positivo PIV-1 + PIV-2	+	+	+/-*
Control positivo PIV-3 + PIV-4	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	+

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

### 10.1.2 Serie no válida de tests diagnósticos

Una serie de tests diagnósticos es **no válida**, (i) si no se ha completado la serie o (ii) si no se cumple alguna de las condiciones de control para una serie de tests diagnósticos **válida**.

En el caso de una serie **no válida** de tests diagnósticos, repita las pruebas usando los ácidos nucleicos purificados restantes o empiece de nuevo a partir de las muestras originales.

## 10.2 Interpretación de los resultados

### 10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección			Interpretación del resultado
FAM™	Cy®5	JOE™	
+	-	+*	Se ha detectado ARN específico de PIV-1 y/o PIV-3.
-	+	+*	Se ha detectado RNA específico de PIV-2 y/o PIV-4a/b.
+	+	+*	Se ha detectado RNA específico de PIV-1 y/o PIV-3 y PIV-2 y/o PIV-4a/b.
-	-	+	No se ha detectado RNA específico de PIV-1 ni de PIV-2 ni de PIV-3 ni de PIV-4a ni de PIV-4b. La muestra no contiene cantidades detectables de estos RNA específicos.
-	-	-	Inhibición de RT-PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

\* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en el canal de detección de FAM™ o en el canal de detección de Cy®5. Una elevada carga de RNA de PIV en la muestra puede dar lugar a señales reducidas o ausentes del Internal Control (control interno).

## 11. Evaluación de rendimiento

La evaluación del rendimiento del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se realizó usando material vírico de las siguientes cepas de VPI: PIV-1: ATCC® VR-94™; PIV-2: ATCC® VR-92™; PIV-3: ATCC® VR-93™; PIV-4a: ATCC® VR-1378™; PIV-4b: ATCC® VR-1377™.

### 11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se define como la concentración (copias/ml) de moléculas de RNA específico de PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a o PIV-4b que se pueden detectar con un índice de positividad del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de especies de VPI en medio de transporte universal. La American Type Culture Collection (ATCC) proporcionó material vírico de PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a y PIV-4b.

Cada dilución se analizó en 8 repeticiones en 3 días diferentes (total n = 24 por dilución) usando combinaciones de 3 lotes de RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0, 3 lotes de AltoStar® Purification Kit 1.5 y 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5. Las series se realizaron usando 3 AltoStar® Automation System AM16 diferentes, así como 3 instrumentos CFX96™ Deep Well Real- Time PCR Detection System distintos.

Se combinaron los datos de todas las series y se realizó un análisis de probit para determinar el valor del 95 % del límite de detección.

**Tabla 1:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de RNA específico de PIV-1

Concentración [copias/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	22	92
3,16E+01	24	12	50
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	3	13
1,00E+00	24	1	4

**Tabla 2:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de RNA específico de PIV-2

Concentración [copias/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	17	71
1,00E+01	24	9	38
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	3	13



**Tabla 3:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de RNA específico de PIV-3

Concentración [copias/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	17	71
3,16E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

**Tabla 4:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de RNA específico de PIV-4a

Concentración [copias/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	23	96
1,00E+02	24	14	58
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	0	0
1,00E+00	24	0	0

**Tabla 5:** Resultados de RT-PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de RNA específico de PIV-4b

Concentración [copias/ml]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	22	92
1,00E+02	24	9	38
3,16E+01	24	3	13
1,00E+01	24	2	8
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

La sensibilidad analítica del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de RNA específico de PIV-1, la sensibilidad analítica es 203 copias/ml [intervalo de confianza (IC) del 95 %: 114 - 493 copias/ml]
- Para la detección de RNA específico de PIV-2, la sensibilidad analítica es 146 copias/ml [intervalo de confianza (IC) del 95 %: 78 - 383 copias/ml]
- Para la detección de RNA específico de PIV-3, la sensibilidad analítica es 301 copias/ml [intervalo de confianza (IC) del 95 %: 186 - 656 copias/ml]
- Para la detección de RNA específico de PIV-4a, la sensibilidad analítica es 456 copias/ml [intervalo de confianza (IC) del 95 %: 256 - 1.096 copias/ml]
- Para la detección de RNA específico de PIV-4b, la sensibilidad analítica es 754 copias/ml [intervalo de confianza (IC) del 95 %: 436 - 1.754 copias/ml]

## 11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se garantiza mediante la selección minuciosa de oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se comprobaron mediante el análisis de comparación de secuencias con las secuencias disponibles públicamente para garantizar la detección de todas las especies de VPI relevantes.

La especificidad analítica del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se evaluó mediante el análisis de patógenos relacionados con el VPI y/o que pueden causar síntomas similares a los del VPI.

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 no mostró ninguna reacción cruzada con ninguno de los siguientes patógenos:

- Adenovirus humano 1
- Adenovirus humano 2
- Adenovirus humano 3
- Adenovirus humano 4
- Virus sincitial respiratorio humano A
- Virus sincitial respiratorio humano B
- Metapneumovirus humano A2
- Metapneumovirus humano B2
- Virus de la gripe A
- Virus de la gripe B
- Enterovirus (Coxsackievirus A3)
- Rinovirus
- Coronavirus humano
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

Adicionalmente, se analizaron las especies de VPI de la 1 a la 4. El RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 no mostró señales de falsos positivos en el canal de detección específico de PIV-1 y PIV-3 cuando se analizaron PIV-2, PIV-4a y/o PIV-4b. Asimismo, no se observaron señales de falsos positivos en el canal de detección específico de PIV-2 y PIV-4 cuando se analizaron PIV-1 y/o PIV-3.

### 11.3 Exactitud

La precisión del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de coeficiente de variación basado en valores de ciclo de umbral ( $C_t$ ). Se analizaron al menos 6 repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

**Tabla 6:** Datos de precisión (% de CV [valores  $C_t$ ]) para PIV-1 muestras UTM de alto positivo

	Muestra de alto positivo de PIV-1 [% de CV basado en valor $C_t$ ]
Variabilidad intraensayo	0,41 - 2,90
Variabilidad interensayo	1,11 - 1,99
Variabilidad interlote	1,79
Variabilidad total	1,56

Todas las muestras analizadas con el triple del límite de detección (muestras de bajo positivo) se detectaron como positivas.

**Tabla 7:** Datos de precisión (% de CV [valores C<sub>i</sub>]) para PIV-2 muestras UTM de alto positivo

	Muestra de alto positivo de PIV-2 [% de CV basado en valor C <sub>i</sub> ]
Variabilidad intraensayo	0,21 - 1,91
Variabilidad interensayo	1,38 - 2,19
Variabilidad interlote	1,35
Variabilidad total	1,95

Todas las muestras analizadas con el triple del límite de detección (muestras de bajo positivo) se detectaron como positivas.

**Tabla 8:** Datos de precisión (% de CV [valores C<sub>i</sub>]) para PIV-3 muestras UTM de alto positivo

	Muestra de alto positivo de PIV-3 [% de CV basado en valor C <sub>i</sub> ]
Variabilidad intraensayo	0,45 - 4,04
Variabilidad interensayo	1,55 - 2,41
Variabilidad interlote	2,80
Variabilidad total	2,42

Todas las muestras analizadas con el triple del límite de detección (muestras de bajo positivo) se detectaron como positivas.

**Tabla 9:** Datos de precisión (% de CV [valores  $C_t$ ]) para PIV-4a muestras UTM de alto positivo

	Muestra de alto positivo de PIV-4a [% de CV basado en valor $C_t$ ]
Variabilidad intraensayo	0,35 - 0,77
Variabilidad interensayo	1,40 - 1,88
Variabilidad interlote	1,07
Variabilidad total	1,96

Todas las muestras analizadas con el triple del límite de detección (muestras de bajo positivo) se detectaron como positivas.

**Tabla 10:** Datos de precisión (% de CV [valores  $C_t$ ]) para PIV-4b muestras UTM de alto positivo

	Muestra de alto positivo de PIV-4b [% de CV basado en valor $C_t$ ]
Variabilidad intraensayo	0,63 - 1,50
Variabilidad interensayo	2,09 - 3,07
Variabilidad interlote	1,35
Variabilidad total	2,42

Todas las muestras analizadas con el triple del límite de detección (muestras de bajo positivo) se detectaron como positivas.

**Tabla 11:** Datos de precisión (% de CV [valores C<sub>i</sub>]) para la detección del Internal Control (control interno) en muestras UTM negativas para VPI

	Internal Control (control interno)
Variabilidad intraensayo	0,33 - 0,94
Variabilidad interensayo	0,82 - 2,07
Variabilidad interlote	0,47
Variabilidad total	1,64

## 11.4 Evaluación del diagnóstico

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se evaluó en un estudio comparativo con el kit RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit con marcado CE.

Se analizaron retrospectivamente 80 muestras de hisopos respiratorios en paralelo usando el RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit en combinación con el MagNA PURE 96 DNA y Viral NA Small Volume Kit (Roche), el MagNA Pure 96 System (Roche) y el kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en combinación con el AltoStar® Purification Kit 1.5 y el AltoStar® Internal Control 1.5 en el AltoStar® Automation System AM16 y el CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System. Para el análisis cualitativo se excluyeron todas las muestras con un resultado no válido para uno o ambos ensayos. Los resultados para las 72 muestras restantes figuran en la tabla 12.

**Tabla 12:** Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en hisopos respiratorios

		RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm)	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0	POSITIVO	32	1
	NEGATIVO	0	39

La sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 en comparación con el RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit fueron del 100 % y el 97,5 %, respectivamente.



## 12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de RT-PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del PIV cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una o fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier test diagnóstico, los resultados del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

### 13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

### 14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

**E-mail:**                    **support@altona-diagnostics.com**

**Teléfono:**                **+49-(0)40-5480676-0**

### 15. Bibliografía

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

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

## 16. Marcas comerciales y aviso legal

RealStar® (altona Diagnostics); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

El kit RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE de conformidad con la directiva 98/79/CE para diagnóstico *in vitro*.

Producto sin licencia de Health Canada y no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2019 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

## 17. Explicación de los símbolos

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

**Notas:**

**Notas:**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

