

RIDA® GENE Parainfluenza

REF PG5805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania
☎ +49 (0) 61 51 81 02-0 / 📠 +49 (0) 61 51 81 02-20 / 🌐 www.r-biopharm.com



RIDA®GENE Parainfluenza

REF PG5805

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®GENE Parainfluenza, realizada en el Roche LightCycler® 480 II, es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 en hisopos nasofaríngeos no tratados de personas con signos y síntomas de infección respiratoria aguda.

El ensayo RIDA®GENE Parainfluenza está previsto para asistir en el diagnóstico de infecciones por parainfluenza (parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4) en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por el virus de la parainfluenza (parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4) y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

El producto está previsto para uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los virus de la parainfluenza humanos (VPIh) son virus de ARN de cadena simple con envoltura de la familia *Paramyxoviridae*⁽¹⁻³⁾. Pueden causar una serie de enfermedades respiratorias, al infectar inicialmente el epitelio mucociliar pseudoestratificado de las vías respiratorias de la nariz y la orofaringe antes de extenderse a las vías respiratorias grandes y pequeñas⁽¹⁾. Los VPIh son la segunda causa de hospitalización en niños menores de 5 años⁽²⁾ y son responsables de hasta el 17 % de las hospitalizaciones⁽³⁾.

Los VPIh pueden dividirse genética y antigénicamente en cuatro serotipos que pueden infectar al ser humano: VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3 y VPIh-4^(1, 2). Los VPIh-1 y -3 pertenecen al género *Respirovirus*, mientras que los VPIh-2 y -4 se clasifican en el género *Rubulavirus*^(1, 3). La presentación clínica varía de un tipo a otro: Los VPIh-1 y -2 suelen causar síntomas parecidos a los de la laringotraqueobronquitis y la gripe, mientras que el VPIh-3 suele estar asociado a la neumonía y la bronquiolitis. Hasta ahora, el VPIh-4 no está tan bien caracterizado, pero se sospecha que tiene una presentación clínica similar a la del VPIh-3⁽²⁾. Incluso el patrón estacional es diferente entre los cuatro serotipos: El VPIh-1 suele producirse en otoño de los años

impares, mientras que la VPIh-2 se produce en otoño de los años pares. Las infecciones por VPIh-3 estallan anualmente de abril a junio⁽²⁾ y son, por tanto, la principal causa de infecciones clínicamente significativas entre los virus de la parainfluenza⁽¹⁾. Por ejemplo, el 60 % de los niños de 2 años están infectados por el VIH-3, mientras que la cifra aumenta hasta el 80 % entre los niños de hasta 4 años⁽³⁾. Por lo general, los bebés, los niños pequeños, las personas mayores y las personas inmunodeprimidas tienen un mayor riesgo de sufrir una infección grave por VPIh, mientras que la infección por el VPIh en adultos sanos suele limitarse a síntomas leves de las vías respiratorias superiores^(2, 3). La infección por el virus del VPIh se transmite normalmente de persona a persona a través del aire al toser y estornudar, por contacto humano estrecho o por tocarse las manos u objetos que contienen el VPIh y luego tocarse la boca, los ojos o la nariz⁽⁴⁾.

3. Principio del ensayo

La prueba RIDA®GENE Parainfluenza es una RT-PCR múltiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 en hisopos nasofaríngeos humanos.

Tras el aislamiento del ARN, se amplifican los fragmentos genéticos específicos (si están presentes) de la parainfluenza 1, la parainfluenza 3 y la parainfluenza 2/4 (gen HN). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq-Polymerase** separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un dispositivo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Parainfluenza contiene un **Internal Control RNA** (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones.

Tabla 1: Reactivos suministrados

REF	Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
PGZ5805RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarillo, listo para usar
PGZ5805EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rojo, listo para usar
PGZ5805IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	café, listo para usar
PGZ5805NC	N	No Template Control	1 ×	450 µL	blanco, listo para usar
PGZ5805PC	P	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la Tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 °C - 8 °C).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-20 °C	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
abierto	-20 °C	20 ciclos de descongelación y congelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Reactivos suministrados

Los siguientes reactivos son necesarios para realizar la prueba RIDA®GENE Parainfluenza:

Reactivos
Agua para PCR (agua sin nucleasas)

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar los ensayos RIDA®GENE Parainfluenza:

Equipo
Plataforma de extracción: Equipo MagNA Pure 96 (Roche)
Equipo de PCR en tiempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Consumibles para ensayo de PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, papeles aluminio)
Centrífuga con rotor para placas
Agitador de vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

Si tiene preguntas sobre el uso de equipos para el procesamiento automatizado, póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y los resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni combine los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Los materiales peligrosos se indican según las obligaciones de etiquetado. Para obtener más información al respecto, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS).

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

El resumen de seguridad y funcionamiento (SSP) de este producto estará disponible en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una vez que se ponga en marcha la Base de Datos Europea de Productos Sanitarios (EUDAMED). En la base de datos, busque el dispositivo utilizando el UDI-DI situado en el embalaje exterior del equipo.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ARN a partir de hisopos nasofaríngeos

Para la preparación de ARN a partir de hisopos nasofaríngeos, se recomienda el kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV en el equipo MagNA Pure 96 (Roche). Para esto, use el protocolo Pathogen Universal 200 y eluya en 50 µL. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Parainfluenza contiene un **Internal Control RNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control RNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de proceso (control de extracción e inhibición).

Cuando el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición para la amplificación, se debe añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (consulte la Tabla 4).

Cuando el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición para la amplificación, se deben añadir 20 µL de **Internal Control RNA** durante la extracción. Se recomienda añadir el ARN de control interno al cartucho de muestra antes de añadir la muestra, si es posible. Se recomienda pipetear 1 µL del **Internal Control RNA** por reacción a la mezcla para PCR de control negativo y a la de control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte las Tablas 3 y 4). Antes de usar, descongele la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA**, agite (excepto la mezcla de enzimas) y centrifugue por un tiempo corto. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante la etapa de trabajo (2 °C - 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

Tabla 4: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
R	Internal Control RNA	1,0 µL	11 µL
	Total	21,0 µL	231,0 µL

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µL de mezcla maestra en cada vial de reacción (placas).

Control negativo: Pipetee 5 µL del **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a cada mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Añada 5 µL de eluato a cada mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µL de **Positive Control** a la mezcla maestra correspondiente.

Nota: Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a cada mezcla para RT-PCR del control positivo.

Tape las placas, centrifugue brevemente a baja velocidad y colóquelas en el equipo de PCR en tiempo real. Comience el ensayo de PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (Tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®GENE, el ensayo RIDA®GENE Parainfluenza fue verificado en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. Por lo tanto, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 5: Perfil universal de PCR en tiempo real en el equipo LightCycler® 480 II

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 6: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
Roche LightCycler® 480 II	Parainfluenza 1	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Parainfluenza 3	533/610	
	Parainfluenza 2/4	618/660	

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la Tabla 7).

El **Positive Control** está disponible en una concentración de 10^3 copias/ μ L. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

Tabla 7: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de genes diana
Control positivo	+	N/D *1	Ver Certificate of Analysis
Control negativo	-	Ct > 20	0

**1 No es necesario tener un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.*

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, vuelva a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Interpretación de los resultados

En este momento, no existe ningún método de referencia o material de referencia reconocido internacionalmente para la normalización. Los materiales de control pueden ser trazados metrológicamente a los estándares internos de R-Biopharm AG basados en amplificaciones específicas de ARN.

Para obtener más información sobre la trazabilidad metrológica, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

Los valores ajustados, las fluctuaciones y otros detalles se encuentran en el certificado de análisis (CoA) adjunto.

Los datos se evalúan en el LightCycler® 480 II utilizando el método del punto de ajuste. Las señales superiores al umbral se consideran un resultado positivo.

Para determinar el límite de detección (LoD 95 %) (Sección 13.2.1), el umbral se fijó como sigue:

Detección	Umbral alto (% de fluorescencia total)
Parainfluenza 1	2,39 %
Parainfluenza 2	20,21 %
Parainfluenza 3	9,09 %
Parainfluenza 4A	6,62 %

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 8.

Tabla 8: Interpretación de los resultados*

Detección de				
Parainfluenza 1	Parainfluenza 3	Parainfluenza 2/4	ICD	Resultado
+	-	-	+/-	Parainfluenza 1 detectable
-	+	-	+/-	Parainfluenza 3 detectable
-	-	+	+/-	Parainfluenza 2/4 detectable
+	+	-	+/-	Parainfluenza 1 y parainfluenza 3 detectables
+	-	+	+/-	Parainfluenza 1 y parainfluenza 2/4 detectables
-	+	+	+/-	Parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 detectables
+	+	+	+/-	Parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

* + = positivo
 - = negativo

Una muestra es positiva si tanto el ARN de la muestra como el **Internal Control RNA** presentan una amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también se califica como positiva si el ARN de la muestra presenta amplificación, pero el **Internal Control RNA** no muestra amplificación en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria en este caso debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal de **Internal Control RNA** sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si la muestra de ARN no presenta amplificación, pero el **Internal Control RNA** presente amplificación en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** puede descartar la inhibición de la reacción de PCR.

La muestra no es válida si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA®GENE Parainfluenza detecta el ARN de parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 en hisopos nasofaríngeos humanos no tratados. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está validada únicamente para hisopos nasofaríngeos.
4. El muestreo, transporte, almacenamiento y manipulación inadecuados o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica de la prueba pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
5. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LoD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
7. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados negativos falsos con RIDA®GENE Parainfluenza.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes objetivo (parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 (gen HN)) están presentes.
9. Incluso en pequeñas cantidades, las sustancias sangre y dihidrocodeína pueden tener propiedades interferentes. La sangre humana interfiere a partir de una concentración del 2,4 % [v/v]. La paracodina (dihidrocodeína) interfiere a partir de una concentración del 3 % [v/v].
10. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir con precisión las indicaciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento analíticas

13.1.1 Límite de detección (LoD 95 %)

El LoD se determinó midiendo una muestra de control positivo (hisopos nasofaríngeos negativos, con picos) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo y matriz con 20 réplicas por paso en un lote. A continuación, se realizó un análisis probit. A continuación, se confirmó el LoD calculado con 20 réplicas por objetivo y matriz para el paso de dilución/concentración calculado.

Se utilizaron las siguientes cepas para las pruebas:

Parainfluenza 1: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 2: ZeptoMetrix (#0810015CF)

Parainfluenza 3: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 4a: ZeptoMetrix (#0810060CF)

Para la detección de ARN de parainfluenza 1, parainfluenza 3 y parainfluenza 2/4 utilizando el ensayo RIDA®GENE Parainfluenza, el instrumento MagNA Pure 96 y el LightCycler® 480 II, se determinaron los siguientes límites de detección (LoD).

Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Resultados del límite de detección de la prueba RIDA®GENE Parainfluenza para los parámetros Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 2/4

	Parainfluenza 1	Parainfluenza 2	Parainfluenza 3	Parainfluenza 4
LoD	0,05 [TCID ₅₀ /mL]	354,00 [TCID ₅₀ /mL]	3,69 [TCID ₅₀ /mL]	67,61 [TCID ₅₀ /mL]

El LoD para el parámetro Parainfluenza 1 en los hisopos nasofaríngeos se determinó en 0,05 [TCID₅₀*/mL].

El LoD para el parámetro Parainfluenza 2 en los hisopos nasofaríngeos se determinó en 354,00 [TCID₅₀*/mL].

El LoD para el parámetro Parainfluenza 3 en los hisopos nasofaríngeos se determinó en 3,69 [TCID₅₀*/mL].

El LoD para el parámetro Parainfluenza 4 en los hisopos nasofaríngeos se determinó en 67,61 [TCID₅₀*/mL].

13.1.2 Límite de detección del dispositivo

Para determinar el límite de detección del dispositivo, se midieron 20 réplicas de una muestra de control (50 copias/reacción) en el LightCycler® 480 II. Todas las réplicas fueron positivas.

Por lo tanto, el límite de detección del dispositivo es de 50 copias/reacción.

13.1.3 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones de las vías respiratorias, o la ocurrencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados del ensayo se examinaron primero en un cribado de interferencia. Diversas sustancias que podrían estar presentes, bien como residuos de la extracción, debido a su uso generalizado en las infecciones respiratorias (diversos medicamentos de farmacia o de prescripción), bien por su presencia generalizada en las correspondientes muestras de control (p. ej., mucinas de la superficie de las mucosas o sangre) se examinaron inicialmente a concentraciones elevadas (tres veces la dosis diaria o simulando el "peor caso"). Si se encontraba una interferencia potencial en este cribado de interferencia para una sustancia examinada, se establecía una relación dosis-efecto entre la concentración de la sustancia en cuestión y la interferencia.

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la Tabla 10.

Tabla 10: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Amoxicilina	1 mg/mL
Etanol*	5 % [v/v]
Clorhidrato de guanidina*	5 % [p/v]
Mucina	60 µg/mL
Mucosolvan	10 % [v/v]
Nasivin/oximetazolina	10 % [v/v]
Cloruro de sodio	10 % [v/v]
Oseltamivir	25 mg/mL
Paracetamol	10 mg/mL

* en función del volumen de eluato

Se observaron efectos inhibitorios con las sustancias sangre humana (2,4 %) y paracodina (dihidrocodeína) (3 %) (véanse las limitaciones del método).

Reactividad cruzada

Se examinaron diversos organismos que suelen encontrarse en los hisopos nasofaríngeos (bacterias, parásitos, hongos y virus). Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en hisopos nasofaríngeos, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos respiratorios. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos, fúngicos o víricos; sobrenadantes de cultivos bacterianos, fúngicos o víricos; y estándares LGC y NIBSC de los respectivos organismos.

La PCR múltiplex en tiempo real para la parainfluenza RIDA®GENE es específica para la parainfluenza 1, la parainfluenza 3 y la parainfluenza 2/4. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 11):

Tabla 11: Organismos con posible reactividad cruzada

Microorganismo	Resultados del ensayo*		
	Parainfluenza 1	Parainfluenza 3	Parainfluenza 2/4
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	-	-
Adenovirus 1, humano, cepa adenoide 71	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	-	-
Enterovirus tipo 71	-	-	-
Virus Epstein-Barr, B95-8	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Coronavirus humano 229E	-	-	-
Coronavirus humano OC43	-	-	-
Coronavirus humano NL63	-	-	-
Metaneumovirus humano	-	-	-
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	-	-
Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Virus de la gripe B/Colorado/6/2017	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-
<i>Lactobacillus crispatus</i> cepa VPI3199	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	-	-

MERS-CoV	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa (FH de Eaton Agent)	-	-	-
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (Control de corrida externa de recombinante NATtrol)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rinovirus 1A cepa MRC-5	-	-	-
VSR (cepa Long)	-	-	-
VSR (cepa 9320)	-	-	-
SARS	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (NCTC 7465)	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-

* - = negativo

13.1.4 Precisión

La precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Parainfluenza se determinó para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de cinco muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480 II en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control en 20 ensayos por duplicado en 10 días de trabajo (2 ensayos por día) realizadas por diferentes operadores en condiciones reproducibles.

Precisión interlote: las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los datos de precisión se obtuvieron utilizando cinco muestras de control, así como el PTC y el NTC pertenecientes al ensayo.

Los coeficientes obtenidos de la variación de cada medición con el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Parainfluenza en LightCycler® 480 II fueron inferiores al 3,06 %.

Tabla 12: Resultados de precisión de la prueba RIDA®GENE Parainfluenza para la parainfluenza 1.

Ct- Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1–3
1	Ct	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	30,9	30,7	30,8	30,8	30,6	30,5
	CV (%)	0,68 %	0,78 %	0,82 %	1,06 %	1,07 %	1,01 %
3	Ct	31,1	30,7	30,9	30,6	30,5	30,5
	CV (%)	0,91 %	1,06 %	1,13 %	1,19 %	0,91 %	0,90 %
4	Ct	27,3	27,0	27,1	26,9	26,9	27,0
	CV (%)	0,57 %	1,09 %	0,70 %	1,28 %	1,39 %	1,30 %
5	Ct	23,4	23,7	23,8	23,7	23,6	23,7
	CV (%)	0,87 %	1,19 %	0,65 %	1,39 %	1,51 %	1,25 %

Tabla 13: Resultados de precisión de la prueba RIDA®GENE Parainfluenza para la parainfluenza 3.

Ct- Valor medio/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1–3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	31,3	31,1	30,8	30,8	30,8	30,5	30,7
	CV (%)	0,74 %	1,03 %	1,30 %	1,55 %	1,37 %	1,16 %	1,45 %
3	Ct	32,2	31,9	31,7	31,3	31,6	31,5	31,5
	CV (%)	0,92 %	1,33 %	1,03 %	2,04 %	1,39 %	1,44 %	1,69 %
4	Ct	26,0	25,7	25,5	25,0	25,4	25,2	25,2
	CV (%)	1,06 %	1,57 %	1,17 %	2,78 %	2,61 %	1,85 %	2,51 %
5	Ct	22,5	22,7	21,9	21,8	22,0	21,9	21,9
	CV (%)	1,12 %	1,48 %	1,39 %	2,63 %	2,32 %	1,98 %	2,35 %

Tabla 14: Resultados de precisión de la prueba RIDA®GENE Parainfluenza para la parainfluenza 2/4.

Ct- Valor medio/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1–3
1	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	31,6	32,0	31,6	32,1	31,5	31,6	31,7
	CV (%)	1,29 %	1,44 %	2,46 %	1,55 %	2,02 %	1,90 %	2,05 %
3	Ct	31,9	32,2	32,2	31,8	31,9	31,8	31,8
	CV (%)	1,88 %	3,06 %	2,60 %	2,11 %	2,12 %	2,30 %	2,14 %
4	Ct	27,0	26,9	26,8	26,5	26,6	26,9	26,7
	CV (%)	1,48 %	2,66 %	2,42 %	2,46 %	2,92 %	2,13 %	2,56 %
5	Ct	22,7	23,6	23,3	23,2	23,1	23,1	23,1
	CV (%)	1,30 %	2,05 %	2,03 %	1,90 %	2,86 %	2,28 %	2,38 %

13.1.5 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Parainfluenza se estudió con varias cepas de parainfluenza (consulte la tabla 15).

Tabla 15: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Concentración	Resultado*		
		Parainfluenza 1	Parainfluenza 3	Parainfluenza 2/4
Parainfluenza 1 C35	0,417 ng	+	-	-
Parainfluenza 2 Greer	0,01005 ng	-	-	+
Parainfluenza 3 C243	0,0201 ng	-	+	-
Parainfluenza 4a M-25	$10^{3.25}$ TCID ₅₀ /0.2 mL	-	-	+
Parainfluenza 4b CH 19503	1,524 ng	-	-	+

* + = positivo
- = negativo

14. Historial de versiones

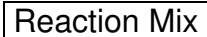
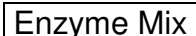
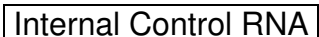
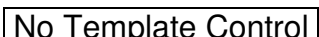
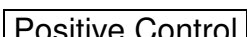
Número de versión	Sección y designación
2021-10-27	Versión anterior
2022-01-20	Revisión general: 4. Reactivos suministrados

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cumplir con el manual de instrucciones
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Mezcla enzimática
	Control de extracción/inhibición
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

1. Russell E, Ison MG. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. Clin Infect Dis. 2017;65(9):1570-6.
2. DeGroote NP, Haynes AK, Taylor C, Killerby ME, Dahl RM, Mustaquim D, et al. Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011-2019. J Clin Virol. 2020;124:104261.
3. Pawełczyk M, Kowalski ML. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17(3):16.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Human Parainfluenza Viruses (HPIVs) - Transmission 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/parainfluenza/about/transmission.html>.] 15.10.2021