

RIDA® GENE Flu & RSV

REF PG0545



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®GENE Flu & RSV, realizada en el Roche LightCycler® 480II, es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y diferenciación de ARN del virus de la influenza (influenza A e influenza B) y de ARN del virus sincicial respiratorio (VSR A y B) en hisopos nasales/faríngeos humanos y LBA de personas con signos y síntomas de infección respiratoria aguda.

La prueba RIDA®GENE Flu & RSV está destinada a asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones causadas por virus de la influenza (influenza A e influenza B) y virus sinciciales respiratorios (VSR A y B) en pacientes con síntomas de una infección respiratoria en relación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por virus de la influenza (influenza A, influenza B) o virus sinciciales respiratorios (VSR A y B) y no deben usarse como la única base para el diagnóstico. El producto está destinado a ser utilizado por profesionales que trabajan en laboratorios hospitalarios, laboratorios de referencia, laboratorios privados o laboratorios públicos.

2. Resumen y descripción del ensayo

También llamada gripe, la influenza es una de las enfermedades respiratorias infecciosas más importantes y es causada por los virus de la influenza.

En todo el mundo, de tres a cinco millones de personas contraen influenza cada año, y aproximadamente 290 000 a 650 000 personas mueren a causa de la enfermedad. Las epidemias anuales de influenza pueden tener un impacto importante en el sistema de atención médica y la economía.¹

En la temporada 2018/19, las estimaciones sitúan el número de visitas al médico relacionadas con la influenza en Alemania en aproximadamente 3,8 millones. El número de hospitalizaciones relacionadas con la influenza provenientes de consultas de atención primaria se estimó en 18 000 casos.²

El Grupo de Trabajo sobre la Influenza (AGI, en inglés) del Instituto Robert Koch estima que hay entre uno y siete millones de visitas al médico relacionadas con la influenza cada año. Durante una ola grave de influenza, como en la temporada 2012/2013, hubo aproximadamente 30 000 hospitalizaciones relacionadas con la influenza y 20 000 muertes. Por el contrario, las temporadas templadas (como 2013/14) solo presentaron un estimado de 3000 hospitalizaciones y no se detecta el exceso de mortalidad asociado a la influenza.³

Los virus de la influenza son virus de ARN que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se dividen en subtipos A, B y C. La característica de los virus de la influenza es su alta variabilidad de los antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) debido a mutaciones (deriva antigénica). Los tipos de influenza A y B causan las epidemias anuales de influenza, mientras que las infecciones con los virus de la influenza C solo causan enfermedad leve.

Epidemiológicamente, los virus de la influenza A son los más importantes debido a su diversidad: fueron responsables de tres pandemias en el siglo XX, así como de la mayoría de las epidemias de gripe. La mayoría de las infecciones por influenza de tipo A en humanos se deben a los subtipos H1N1 y H3N2. Además de la deriva antigénica resultante de la mutación, la mezcla de una cepa de influenza A humana y una no humana puede crear nuevos subtipos de influenza A (cambio antigénico), que pueden desencadenar una pandemia. El subtipo de influenza A H1N1 está asociado con pandemias de influenza pasadas y potencialmente nuevas (por ejemplo, la gripe española en 1918/19 y la gripe porcina en 2009). Hoy en día, este subtipo de influenza A se llama H1N1v. Los virus de la influenza o gripe se transmiten por gotitas y aerosoles. El periodo de incubación es de aproximadamente 1 a 4 días. Los síntomas clínicos son enfermedades graves, principalmente de las vías respiratorias, acompañadas de tos y fiebre alta. Es característica la aparición repentina de síntomas. En el curso de una enfermedad grave, pueden ocurrir neumonías y sobreinfecciones bacterianas, que pueden ser fatales, especialmente para los ancianos y los niños.⁴

Los virus sinciciales respiratorios (VSR) pertenecen a la familia *Pneumoviridae* y son virus de ARN monocatenario (ARNmc) con envoltura. Circulan dos grupos de VSR: A y B, mientras que el VSR A predomina en la mayoría de los años.⁵

El VSR es un patógeno mundial muy extendido y puede causar enfermedades de las vías respiratorias superior e inferior a cualquier edad. En los bebés, en particular los prematuros y los niños pequeños, el VSR es uno de los patógenos más importantes de las infecciones de las vías respiratorias.⁵ El VSR se transmite por contacto o infección por gotitas, y se manifiesta con síntomas como rinitis, resfriado, tos, bronquitis aguda e incluso infección del oído medio. Puede haber una evolución aguda si hay una sobreinfección bacteriana.⁶ Los niños pequeños y los bebés suelen tener un caso grave que requiere hospitalización. Los síntomas incluyen fiebre, congestión nasal y taquipnea. Las estimaciones sitúan la incidencia de infecciones por VRS en todo el mundo en 48,5 casos y 5,6 casos graves por cada 1000 niños en el primer año de vida. Mientras que entre el 50 y el 70 % de los bebés y niños pequeños tienen una infección por VSR en su primer año de vida, casi el 100 % ha tenido una después del segundo año de vida.⁵

3. Principio del ensayo

La prueba RIDA[®]GENE Flu & RSV es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y diferenciación de ARN del virus de la influenza (influenza A e influenza B) y de ARN del virus sincicial respiratorio (VSR A y B) en hisopos nasales/faríngeos humanos y LBA (consulte la sección 9.4). La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) va seguida de la PCR en un vial de reacción. En el proceso, el ARN aislado se transcribe en ADNc con la ayuda de una transcriptasa inversa. Los fragmentos de genes específicos para influenza A, influenza B y VSR (influenza A/B: Gen M y gen NP1; VSR: Gen F) se amplifican luego usando PCR en

tiempo real. 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 equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Flu & RSV contiene un **Internal Control RNA** (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	Amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	Rojo
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	Café
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- 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 a 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).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & RSV se verificó con la siguiente combinación de plataforma de extracción e instrumento de PCR en tiempo real:

Tab.2a: Equipo necesario (verificado)

Tampón de extracción	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480II

Además, el ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & RSV es compatible para utilizarse con la siguiente plataforma de extracción e instrumentos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario (compatible)

Tampón de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Dispositivos de PCR en tiempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Al emplear el Rotor-Gene Q (QIAGEN), use únicamente viales de reacción de 0,1 ml.

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm para comprobar la compatibilidad en mdx@r-biopharm.de.

- Sistema de recolección con hisopo estéril (por ejemplo, medio ESwab® Amies, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) al usar el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, viales de reacción, cubiertas de plástico)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Seguir siempre las instrucciones de uso 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, coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.
- Asegúrese de que la extracción, la preparación de PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- 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.
- Deseche el kit de ensayo cuando alcance la fecha de caducidad.
- Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ARN a partir de hisopos nasales y faríngeos

Para la preparación de ARN a partir de hisopos nasales y faríngeos, se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, Maxwell®RSC [Promega]) que estén disponibles en el mercado. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Le recomendamos que utilice la cantidad de medio especificada por el fabricante en la extracción de ácido nucleico del kit de extracción de ácido nucleico o del sistema de extracción de ácido nucleico, y que siga las instrucciones del fabricante. El ensayo RIDA®GENE Flu & RSV 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 extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control RNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control RNA** debe añadirse a la mezcla de muestra y tampón de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda añadir 1 µl por cada reacción del **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR de control negativo y a la de control positivo.

8.2 Preparación de ARN a partir de LBA

Para la preparación de ARN a partir de LBA, se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, Maxwell®RSC [Promega]) que estén disponibles en el mercado. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Le recomendamos que utilice la cantidad de medio especificada por el fabricante en la extracción de ácido nucleico del kit de extracción de ácido nucleico o del sistema de extracción de ácido nucleico, y que siga las instrucciones del fabricante. El ensayo RIDA®GENE Flu & RSV 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 extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4). Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control RNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control RNA** debe añadirse a la mezcla de muestra y tampón de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda añadir 1 µl por cada reacción del **Internal Control RNA** 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**, mezcle bien (excepto la mezcla de enzimas) y centrifugue por un tiempo corto. Refrigere siempre los reactivos de forma adecuada durante las etapas del trabajo (2 °C - 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo la preparación de la mezcla maestra para diez (10) reacciones (ICR como control de extracción y 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 producción de la mezcla maestra para diez (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 (vial/placa).

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

Nota: Si 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 la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Añada 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl del **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si 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 la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Selle los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® y en el RIDA®CYCLER

<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 pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Nota: El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
R-Biopharm RIDA®CYCLER	VSR A/B	Verde	-
	ICR	Amarillo	
	Influenza B	Naranja	
	Influenza A	Rojo	
Roche LightCycler® 480II	VSR A/B	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	VSR A/B	FAM	Establezca el colorante de referencia en "none" (ninguno).
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
ABI 7500 Fast Dx	VSR A/B	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	VSR A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	VSR A/B	Verde	La ganancia debe establecerse en 5 (predeterminado de fábrica) para todos los canales.
	ICR	Amarillo	
	Influenza B	Naranja	
	Influenza A	Rojo	

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8 y las figuras 1, 2 y 3).

El **Positive Control** tiene 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 8: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

**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 correcta de la prueba

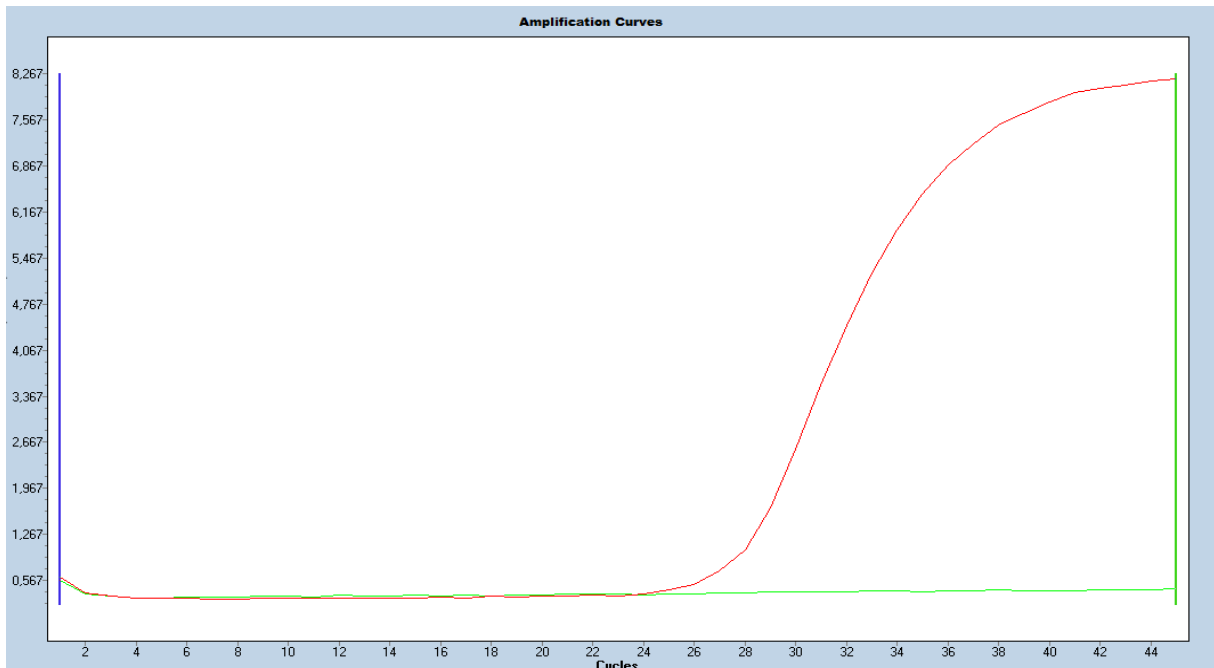


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo (VSR) (rojo) y del control negativo (verde) en el LightCycler® 480II

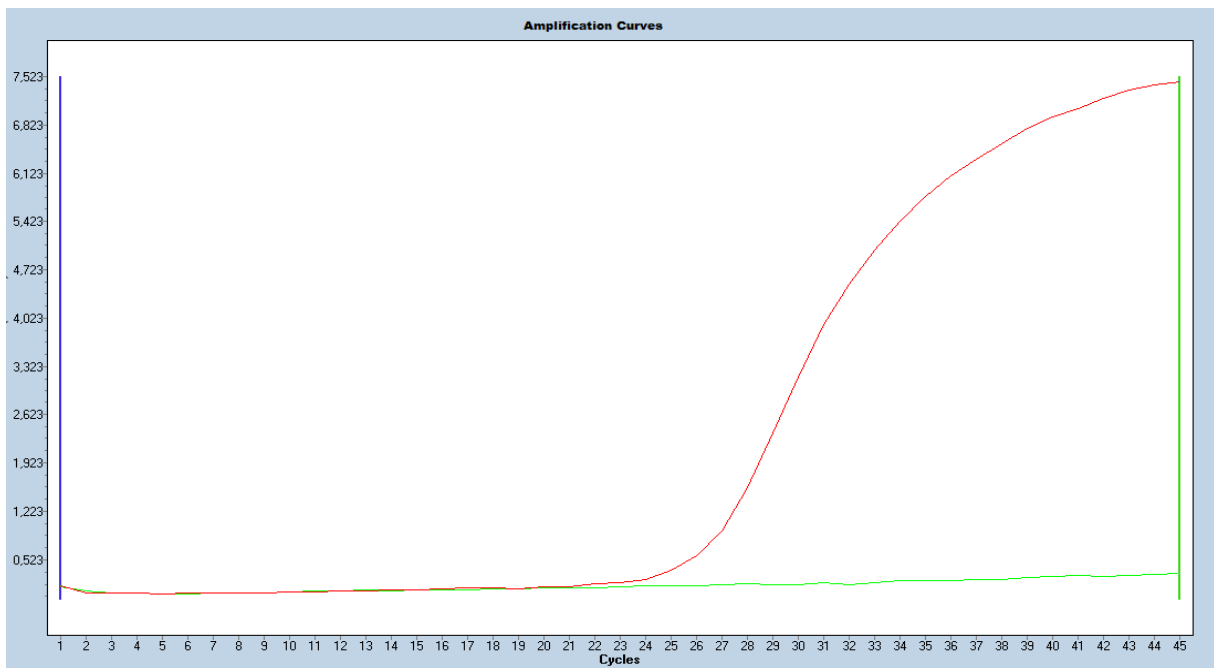


Figura 2: Procesamiento correcto del control positivo (influenza B) (rojo) y del control negativo (verde) en el LightCycler® 480II

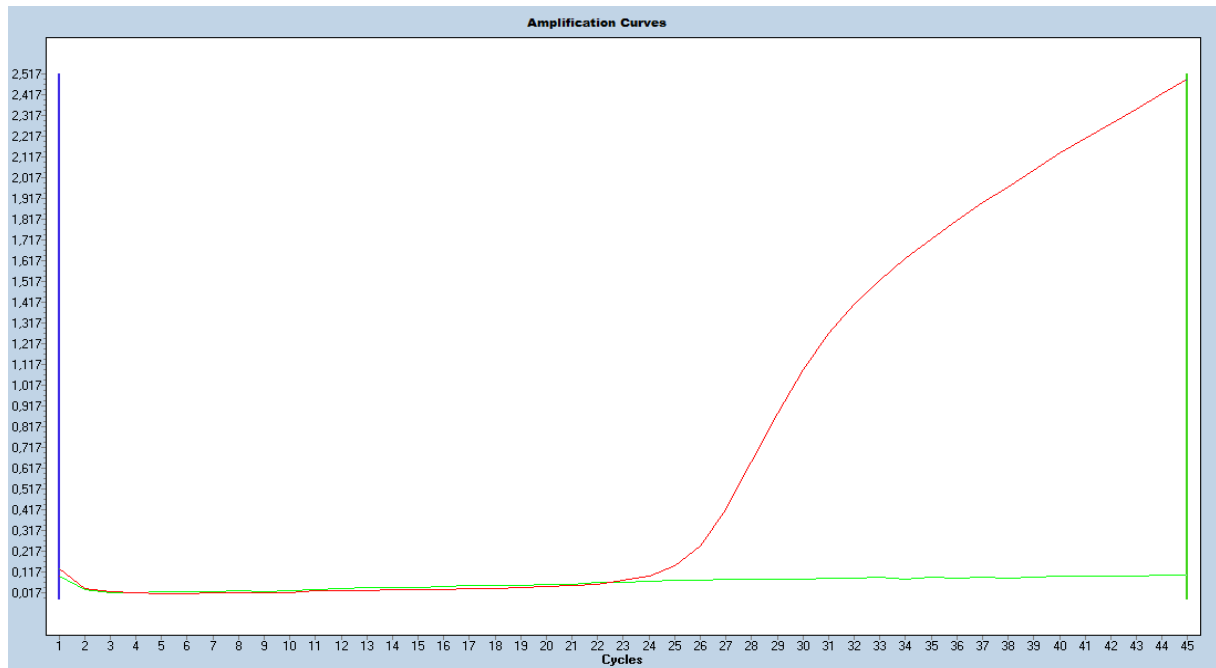


Figura 3: Procesamiento correcto del control positivo (influenza A) y del control negativo (verde) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de las muestras

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Detección de			ICR	Resultado
Gen F (VSR A/B)	Gen NP1 (influenza B)	Gen M (influenza A)		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	VSR detectable
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Influenza B detectable
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Influenza A detectable
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	VSR e influenza B detectables
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	VSR e influenza A detectables
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Influenza B e influenza A detectables
positivo	positivo	positivo	positivo	Influenza A, influenza B y VSR detectables
negativo	negativo	negativo	positivo	Gen diana no detectable
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

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

Una muestra también es positiva si el ARN de la muestra presenta señal de amplificación, pero no se puede ver ninguna señal de amplificación para el Internal Control RNA en el sistema de detección. La detección del Internal Control RNA no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del Internal Control RNA.

Una muestra es negativa si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero hay señal de amplificación del Internal Control RNA en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del Internal Control RNA.

Una 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. La

muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. Esta prueba está destinada únicamente a hisopos nasales/faríngeos y LBA.
2. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
3. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados no evaluables.
4. 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 Flu & RSV.
5. 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 (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
6. Esta prueba no se puede utilizar para detectar virus de influenza C.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos capaces de reproducirse. Un resultado positivo indica que los genes diana (influenza A/B: Gen M y gen NP1; VSR: Gen F) están presentes.
8. A una concentración probada de 3,0 % y superior, la paracodina muestra un efecto inhibitorio.
9. A una concentración probada de 17,5 mg/ml y superior, el ciprofloxacino muestra un efecto inhibitorio.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & RSV tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ARN/reacción para VSR, influenza B e influenza A.

Las figuras 4, 5 y 6 siguientes muestran la dilución seriada de VSR, influenza B e influenza A (cada una con 5×10^5 a 5×10^1 copias de ARN/reacción) en el LightCycler® 480II.

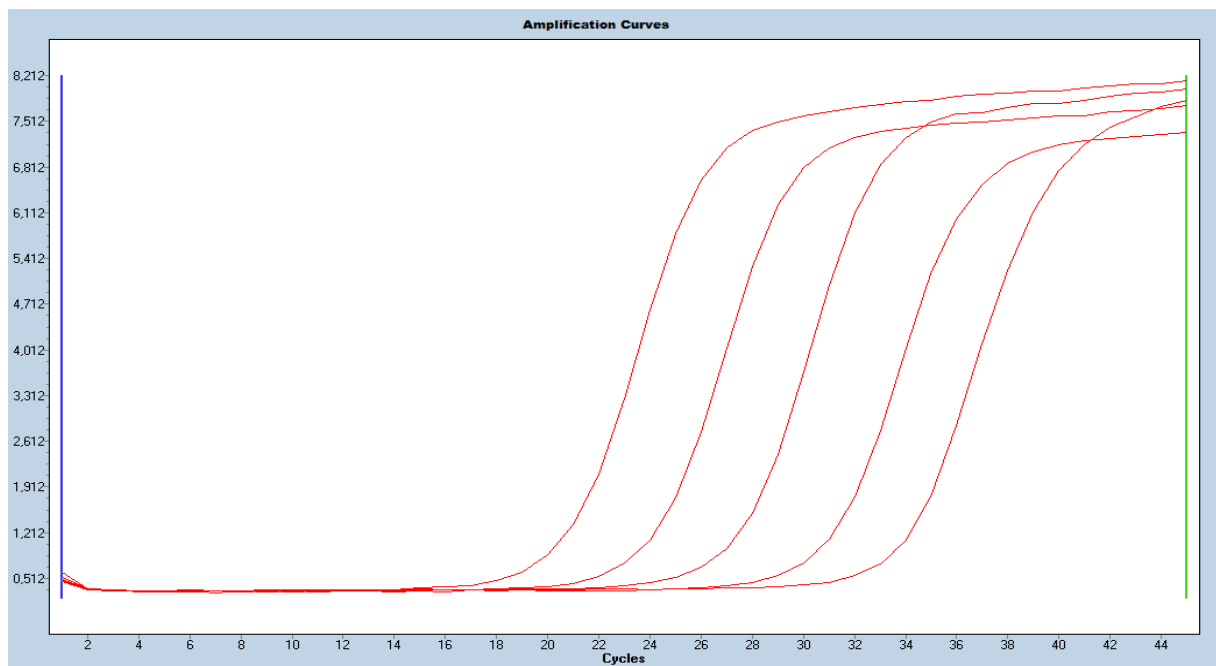


Figura 4: Dilución seriada de VSR (5×10^5 a 5×10^1 copias de ARN/reacción) en el LightCycler® 480II

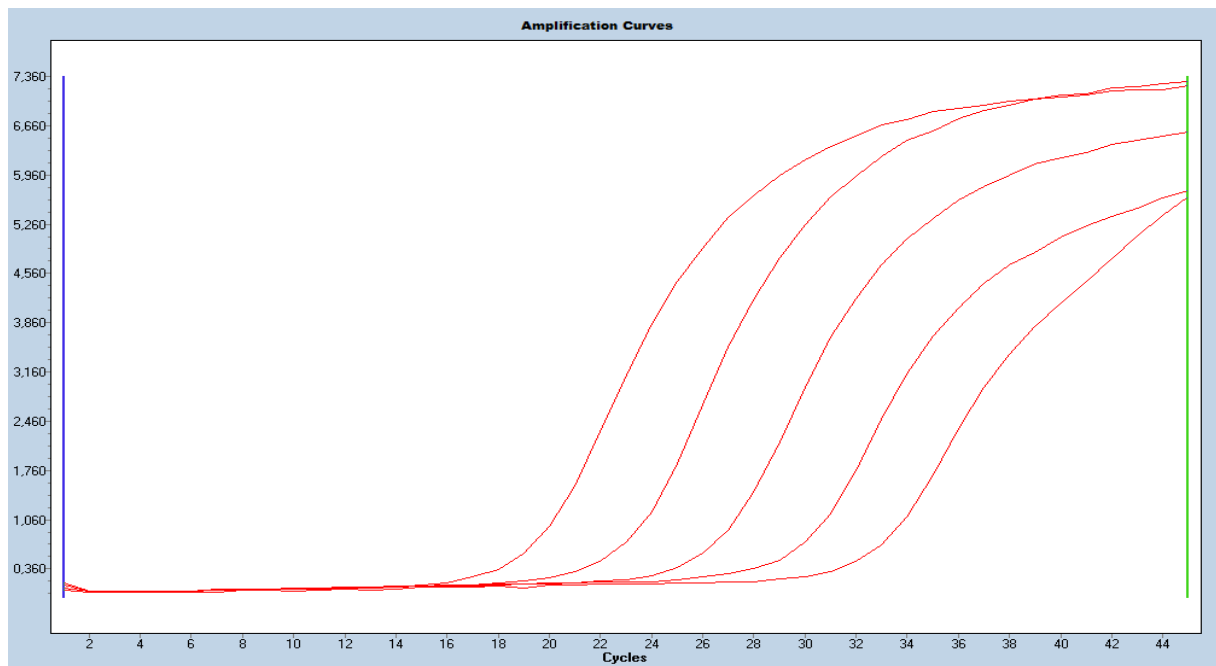


Figura 5: Dilución seriada de influenza B (5×10^5 a 5×10^1 copias de ARN/reacción) en el LightCycler® 480II

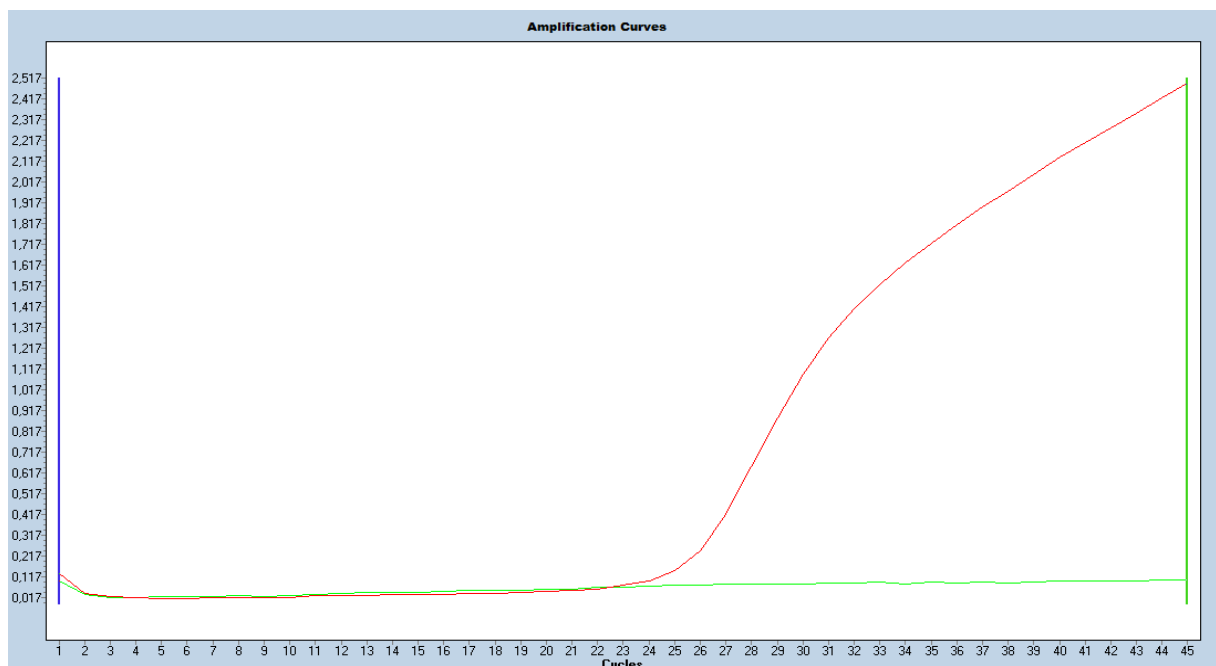


Figura 6: Dilución seriada de influenza A (5×10^5 a 5×10^1 copias de ARN/reacción) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el proceso depende de la matriz de la muestra, la extracción del ARN y la concentración de ARN.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & RSV es específico para VSR A/B, influenza A e influenza B. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la Tabla 10).

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i> , cepa 5377	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	Virus de Coxsackie humano B4	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (Control de corrida externa de recombinante NATtrol)	-
Adenovirus 1, humano, cepa adenoide 71	-	Ecovirus tipo 11	-	Citomegalovirus humano	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 4	-	Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	-	Metaneumovirus humano	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Virus de la parainfluenza humana 1, cepa C35	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
Adenovirus 31	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Virus de la parainfluenza humana 2, cepa Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-
Adenovirus 34	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Virus de la parainfluenza humana, serotipo 3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Adenovirus 37	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus de la parainfluenza humana 4a, cepa M-25	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	Enterovirus tipo 71, cepa aislada 2003	-	Rinovirus humano, genogrupo A	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i> , cepa 12822	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Coronavirus humano OC43	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-		
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Coronavirus humano 229E	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	-		
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Virus de Coxsackie humano A2, cepa Fleetwood	-	<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	-		

13.4 Reactividad analítica

Se examinó la reactividad del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & RSV utilizando diferentes cepas de virus de influenza A/influenza B y VSR (ver Tabla 11).

Tabla 11: Pruebas de reactividad analítica

Subtipo	Cepa	VSR	Influenza B	Influenza A
H1N1v	Influenza A/Brisbane/02/2018	negativo	negativo	positivo
H1N1v	Influenza A/Michigan/45/2015	negativo	negativo	positivo
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	negativo	negativo	positivo
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Kansas/14/2017	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Singapur/INFIMH-16-0019/2016	negativo	negativo	positivo
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	negativo	negativo	positivo










H3N2	Influenza A/Suiza/9715293/2013	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Texas/50/2012	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Victoria/361/2011	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Brisbane/10/2007	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Australia del Sur/34/2019	negativo	negativo	positivo
H7N9	Influenza A/Anhui/1/2013	negativo	negativo	positivo
	Influenza B/Colorado/06/2017/ linaje Victoria	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Brisbane/60/2008/ linaje Victoria	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Washington/02/2019/ linaje Victoria	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Massachusetts/2/2012/ linaje Yamagata	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Phuket/3073/2013/ linaje Yamagata	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Wisconsin/1/2010/ linaje Yamagata	negativo	positivo	negativo
	VSR A (Aislado: aislado 2006)	positivo	negativo	negativo
	Cepa VSR A Long	positivo	negativo	negativo
	VSR B (cepa: CH93(18)-18)	positivo	negativo	negativo
	VSR B cepa 9320	positivo	negativo	negativo

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2014-07-01	Versión anterior
2020-10-13	Revisión general: 1. Uso previsto 2. Resumen y descripción del ensayo 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos necesarios no suministrados 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de las muestras 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos 16. Bibliografía

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvense las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografía

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal)
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html. Last accessed: 09.10.2020.
2. Robert Koch Institut
RKI_Influenzabericht_2018-19
https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI_Influenzabericht_2018-19.pdf. Last accessed: 30.10.2020
3. Robert Koch Institut
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html. Last accessed: 09.10.2020.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
5. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html
Last accessed: 15.10.2020