

RIDA® GENE RSV & hMPV

REF PG5905



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



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®GENE RSV & hMPV, 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 del virus sincicial respiratorio (A/B) y el metapneumovirus humano (A/B) en hisopos nasales/faríngeos y LBA no tratados de personas con signos y síntomas de infección respiratoria aguda.

El ensayo RIDA®GENE RSV & MPVh está previsto para asistir en el diagnóstico de infecciones virales (VSR y MPVh) en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por VSR o MPVh y no deben usarse como base única para el diagnóstico.

El producto está previsto para uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

El virus sincicial respiratorio (VSR) humano se considera uno de los patógenos más potentes para las infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores, como la inflamación pulmonar y la bronquiolitis^(1,2,3). Se ha encontrado una alta incidencia de infecciones por VSR, especialmente en niños menores de 6 meses^(4,5). El VSR se asocia a una elevada morbilidad y mortalidad no solo en niños, sino también en ancianos, pacientes con enfermedades previas y adultos inmunodeprimidos^(2,6). El VSR es un virus de ARN no segmentado con envoltura que pertenece a la familia Pneumoviridae^(2,3). El genoma viral, una molécula de ARN de cadena simple (ssRNA), codifica 11 proteínas⁽⁶⁾. Dada la antigenicidad de su proteína G, la cepa se divide en dos grupos de antígenos: VSR A y B. Actualmente se conocen 14 genotipos del VSR A y 25 genotipos del VSR B^(2,6). Varios estudios han llegado a la conclusión unánime de que el VSR es el virus respiratorio más comúnmente detectado^(2,6,7). En particular, los brotes del VSR se producen durante el invierno, de noviembre a marzo. El punto álgido de las infecciones ocurre principalmente en enero^(1,3,8). El VSR suele manifestarse junto con otros virus respiratorios^(2,3).

El metapneumovirus humano (MPVh) se aisló por primera vez en 2001 en muestras de las vías respiratorias de niños menores de 5 años⁽⁹⁾. El metapneumovirus humano es una partícula con envoltura, similar a un virus, que pertenece a la familia Pneumoviridae como el VSR. El genoma viral es un ARN de cadena simple (ssRNA) que consta de 8 genes. La cepa del MPVh se dividió en dos genotipos diferentes, A y B. Cada grupo se divide además en dos subgenotipos 1 y 2 (A1, A2, B1, B2) que se basan en las diferencias genéticas de las proteínas de superficie F y G. Ambos genotipos pueden coexistir y circular simultáneamente durante el mismo periodo, mientras que el grupo A es generalmente el genotipo dominante. Sin embargo, la distribución depende de la estacionalidad y de la región^(3,5,9,10). Las infecciones por el MPVh pueden producirse a lo largo de todo el año, pero la infección suele alcanzar

su punto máximo al final de la estación de invierno. Es evidente la estacionalidad, especialmente con altas tasas de infección en enero^(9,11). Se han descrito en varias ocasiones coinfecciones con otros patógenos de las vías respiratorias, como el virus sincitial respiratorio (VSR)⁽⁹⁾.

Según los estudios, el VSR y el MPVh, además de la influenza, son los patógenos virales predominantes durante la estación de invierno y, por lo tanto, muestran una estacionalidad constante⁽¹²⁾. Los síntomas más comunes de las infecciones agudas de las vías respiratorias son fiebre, tos, dolor de garganta, cefaleas, taquipnea, estertores, estridor, sibilancias o síntomas de las vías respiratorias superiores (rinorrea y estornudos) y fatiga^(9,11).

3. Principio del ensayo

La prueba RIDA[®]GENE RSV & hMPV es un ensayo de RT-PCR múltiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación del ARN del virus sincitial respiratorio (A/B) y del metapneumovirus humano (A/B) a partir de hisopos nasofaríngeos y LBA humanos.

Tras el aislamiento del ADN, se amplifican los fragmentos genéticos específicos del VSR (gen F) y del MPVh (glicoproteína F) (si está presente). 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 RSV & hMPV 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
PGZ5905RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	amarillo, listo para usar
PGZ5905EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	rojo, listo para usar
PGZ5905IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	naranja, listo para usar
PGZ5905NC	N	No Template Control	1 ×	450 µl	blanco, listo para usar
PGZ5905PC	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 RSV & hMPV:

Reactivos
Agua para PCR (agua sin nucleasas)

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar los ensayos RIDA®GENE RSV & hMPV:

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 y LBA

Para la preparación de ARN a partir de hisopos nasofaríngeos y LBA, 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 RSV & hMPV 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 RSV & hMPV 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	VSR	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	MPVh	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	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	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 13.1.1), el umbral se fijó como sigue:

Detección	Matriz	Umbral alto (% de fluorescencia total)
VSR A	LBA	4,9 %
	Hisopo nasofaríngeo	6,5 %
VSR B	LBA	3,5 %
	Hisopo nasofaríngeo	6,0 %
MPVh A1	LBA	7,9 %
	Hisopo nasofaríngeo	7,0 %
MPVh A2	LBA	9,9 %
	Hisopo nasofaríngeo	10,9 %

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

Tabla 8: Interpretación de los resultados

Detección de			
VSR	MPVh	ICR	Resultado
positivo	negativo	positivo/ negativo	VSR detectable
negativo	positivo	positivo/ negativo	MPVh detectable
positivo	positivo	positivo/ negativo	VSR y MPVh detectables
negativo	negativo	positivo	Gen diana no detectable
negativo	negativo	negativo	No válido

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 RSV & hMPV detecta el ARN del virus sincicial respiratorio (A/B) y del metapneumovirus humano (A/B) a partir de hisopos nasofaríngeos y LBA 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 nasales/faríngeos y LBA.
4. 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 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 (LD 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 falsos negativos con RIDA®GENE RSV & hMPV.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes objetivo (VSR [gen F] y MPVh [glicoproteína F]) están presentes.
9. Incluso en pequeñas cantidades, las sustancias dihidrocodeína y azitromicina pueden tener propiedades interferentes. La paracodina interfiere a partir de una concentración del 3,0 % [v/v]; la azitromicina interfiere a partir de una concentración de 25,2 mg/ml.
10. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento analíticas

13.1.1 Límite de detección (LoD 95 %)

Se midió una muestra de control positivo (LBA negativo o hisopo nasofaríngeo, enriquecido) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo y matriz con 20 réplicas por paso en un lote para determinar el LoD. 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:

Aislado de VSR A 2006, ZeptoMetrix, #0810040ACF

Cepa VSR B: CH93(18)-18, ZeptoMetrix, #0810040CF

Cepa MPVh-16 tipo A1: IA10-2003, ZeptoMetrix, #0810161CF

Cepa MPVh-8 tipo B2: Peru6-2003, ZeptoMetrix, #0810159CF

Para la detección del ARN del VSR y MPVh con la ayuda del ensayo RIDA®GENE RSV & hMPV, el equipo MagNA Pure 96 y el LightCycler® 480 II, se determinaron los límites de detección (LoD) que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados de los límites de detección de la prueba RIDA®GENE RSV & hMPV para los parámetros VSR y MPVh.

	VSR A	VSR B	MPVh A1	MPVh B2
LoD LBA	190,11 TCID ₅₀ */ml	4,15 TCID ₅₀ */ml	1,01 TCID ₅₀ */ml	0,63 TCID ₅₀ */ml
LoD Hisopo nasofaríngeo	193,20 TCID ₅₀ */ml	6,89 TCID ₅₀ */ml	5,70 TCID ₅₀ */ml	5,22 TCID ₅₀ */ml

*TCID: dosis infecciosa de cultivo de tejidos

El LoD para el parámetro VSR A en LBA se determinó en 190,11 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro VSR A en el hisopo nasofaríngeo se determinó en 193,20 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro VSR B en LBA se determinó en 4,15 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro VSR B en el hisopo nasofaríngeo se determinó en 6,89 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro MPVh A1 en LBA se determinó en 1,01 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro MPVh A1 en el hisopo nasofaríngeo se determinó en 5,70 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro MPVh B2 en LBA se determinó en 0,63 TCID₅₀*/ml.

El LoD para el parámetro MPVh A1 en el hisopo nasofaríngeo se determinó en 5,22 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
Mucosolvan (clorhidrato de ambroxol)*	10 % [v/v]
Amoxicilina	1 mg/ml
Sangre humana	2 % [v/v]
Mucinas	60 µg/ml
Nasivin 0,05 % (oximetazolina)**	10 % [v/v]
Cloruro de sodio	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (dipropionato de beclometasona)**	10 % [v/v]
Tobramicina	4 µg/ml

*Sustancia solo analizada para la matriz LBA

**Sustancias solo analizadas para el hisopo nasofaríngeo de la matriz

Se observaron efectos inhibitorios con las sustancias paracodina (3 %) y azitromicina-ratiopharm (25,2 mg/ml) (véanse las limitaciones del método).

Reactividad cruzada

Se investigaron varios microorganismos (bacterias, virus, hongos) que suelen encontrarse en la matriz del LBA o en los hisopos nasofaríngeos. Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en ambas matrices, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos respiratorios. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10^6 y 10^9 UFC*/ml), fúngicos o víricos; sobrenadantes de cultivos celulares infecciosos de virus, bacterias u hongos; aislados; o estándares LGC o NIBSC del microorganismo en cuestión.

El ensayo de RT-PCR múltiple en tiempo real RIDA®GENE RSV & hMPV es específico para VSR y MPVh. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (Tabla 11):

Tabla 11: Organismos con posible reactividad cruzada

Microorganismo	Resultados del ensayo	
	VSR	MPVh
<i>Acinetobacter baumannii</i> , cepa 5377	negativo	negativo
Adenovirus 1, humano, cepa adenoide 71	negativo	negativo
Adenovirus 4	negativo	negativo
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	negativo	negativo
Adenovirus 31	negativo	negativo
Adenovirus 34	negativo	negativo
Adenovirus 37	negativo	negativo
<i>Aspergillus terreus</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> , cepa 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydia psittaci</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	negativo	negativo
Ecovirus tipo 11	negativo	negativo
Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O6)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
Enterovirus tipo 71, cepa aislada 2003	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	negativo	negativo
Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	negativo	negativo
Virus del herpes simple 2, cepa MS	negativo	negativo
Coronavirus humano 229E	negativo	negativo
Coronavirus humano OC43	negativo	negativo
Virus de Coxsackie humano A2, cepa Fleetwood	negativo	negativo
Virus de Coxsackie humano B4	negativo	negativo
Citomegalovirus humano	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 1, cepa C35	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 2, cepa Greer	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana, serotipo 3	negativo	negativo
Virus de la parainfluenza humana 4a, cepa M-25	negativo	negativo

Rinovirus humano, genogrupo A	negativo	negativo
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	negativo	negativo
Influenza A H3N2 Texas/50/12	negativo	negativo
Influenza B/Washington/02/2019	negativo	negativo
Influenza B/Colorado/6/2017	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	negativo	negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	negativo	negativo
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
<i>Serratia marcescens</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	negativo	negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus salivarius</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo

*UFC: Unidades formadoras de colonias

13.1.4 Precisión

La precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE RSV & hMPV 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 dos técnicos diferentes 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.

El máximo coeficiente de variación obtenido de las mediciones con el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE RSV & hMPV en el LightCycler® 480 II fue del 1,93 %.

Tabla 12: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®GENE RSV & hMPV para el VSR.

Valor medio de Ct/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	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	
2	Ct	34,3	34,6	34,6	33,6	33,6	33,7	
	CV (%)	1,72 %	1,31 %	1,27 %	1,47 %	1,63 %	1,88 %	1,66 %
3	Ct	32,1	32,6	32,6	31,2	31,1	31,6	31,3
	CV (%)	0,94 %	1,06 %	0,93 %	1,72 %	1,62 %	1,86 %	1,85 %
4	Ct	25,9	25,9	26,1	24,6	24,5	25,0	24,7
	CV (%)	0,87 %	0,67 %	0,68 %	1,35 %	1,50 %	1,84 %	1,93 %
5	Ct	22,4	22,7	22,8	21,3	21,3	21,7	21,4
	CV (%)	0,84 %	0,73 %	0,66 %	1,25 %	1,84 %	1,62 %	1,85 %

Tabla 13: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®GENE RSV & hMPV para el MPVh.

Valor medio de Ct/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	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	33,6	33,5	33,7	32,9	33,0	32,8
	CV (%)	0,80 %	1,17 %	0,83 %	1,44 %	1,43 %	1,64 %
3	Ct	31,6	31,8	31,7	30,6	30,6	30,8
	CV (%)	0,80 %	0,50 %	0,80 %	1,40 %	1,11 %	1,27 %
4	Ct	25,1	25,4	25,4	24,1	24,1	24,4
	CV (%)	0,97 %	0,72 %	0,69 %	1,92 %	1,80 %	1,80 %
5	Ct	21,8	21,9	21,8	20,9	20,8	20,9
	CV (%)	0,83 %	0,94 %	0,79 %	1,27 %	1,65 %	1,63 %

13.1.5 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE RSV & hMPV se investigó utilizando cepas de VSR y subtipos de MPVh (Tabla 14). Las cepas de VSR y los subtipos de MPVh analizados se detectaron mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE RSV & hMPV.

Tabla 14: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Concentración	Resultado*	
		VSR	MPVh
MPVh 5 tipo B1	10 ^{-1,70} U/ml	-	+
MPVh 8 tipo B2	10 ^{2,10} U/ml	-	+
MPVh 16 tipo A1	10 ^{0,82} U/ml	-	+
MPVh 20 tipo A2	10 ^{0,34} U/ml	-	+
VSR A (Aislado: aislado 2006)	10 ^{2,53} U/ml	+	-
Cepa VSR A Long	3,74 x 10 ¹ UFP/ml	+	-
VSR B (cepa:CH93(18)-18)	10 ^{0,82} U/ml	+	-
VSR B cepa 9320	8,9 x 10 ⁰ TCID ₅₀ /ml	+	-

*+ = positivo (al menos 2 de 3 réplicas positivas)

- = negativo










**Unidades formadoras de placas

14. Historial de versiones






Número de versión	Sección y designación
2015-11-16	Versión de lanzamiento
2021-08-24	Revisión general: <ol style="list-style-type: none"> 1. Uso previsto 2. Resumen y descripción del ensayo 3. Principio del ensayo 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos necesarios no suministrados 7. Advertencias y precauciones para los usuarios 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 11. Interpretación de los resultados 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento

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. Harun A, Beyza E. Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital: Japanese Journal of Infectious Diseases. 2019; 72(5): 318–322.
2. Luo H-J, Huang X-B, Zhong H-L, Ye C-X, Tan X, Zhou K, Yuan L, Zhang S-F, Zhu X, Lin C-J, Wang W-J, Xu L, Cao K-Y. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011-2016 in southern China. International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases. 2020; 90: 5–17.
3. Park E, Park PH, Huh JW, Yun HJ, Lee HK, Yoon M., Lee S, Ko G. Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014. Epidemiology and Infection, 2017; 145(15): 3226–3242.
4. Fillatre A, François C, Segard C, Duverlie G, Hecquet D, Pannier C, Roussel C, Zawadzki P, Brochot E, Castelain S. Epidemiology and seasonality of acute

- respiratory infections in hospitalized children over four consecutive years (2012-2016). *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018; 102: 27–31.
5. Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16: 301.
 6. Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *BioMed Research International*. 2017; 3459785.
 7. Nguyen VH, Dubot-Pérès A, Russell FM, Dance DAB, Vilivong K, Phommachan S, Syladeth C, Lai J, Lim R, Morpeth M, Mayxay M, Newton PN, Richet H, De Lamballerie X. Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR - the importance of Respiratory Syncytial Virus. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 9318.
 8. Soudani N, Caniza MA, Assaf-Casals A, Shaker R, Lteif M, Su Y, Tang L, Akel I, Muwakkat S, Chmairie A, Homsy M, Dbaibo G, Zaraket H. Prevalence and characteristics of acute respiratory virus infections in pediatric cancer patients. *Journal of Medical Virology*. 2019; 91(7): 1191–1201.
 9. Rodriguez PE, Frutos MC, Adamo MP, Cuffini C, Cámara JA, Paglini MG, Moreno L, Cámara A. Human Metapneumovirus: Epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PloS One*. 2020; 15(12): e0244093.
 10. Evelyn O, Jaime FS, David M, Lorena A, Jenifer A, Oscar G. Prevalence, clinical outcomes and rainfall association of acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in Bogotá, Colombia. *BMC Pediatrics*. 2019; 19(1): 345.
 11. Halaji M, Hashempour T, Moayedi J, Pouladfar GR, Khansarinejad B, Khashei R, Moattari A, Musavi Z, Ghassabi F, Pirbonyeh N. Viral etiology of acute respiratory infections in children in Southern Iran. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019; 52: e20180249.
 12. Al-Romaihi HE, Smatti MK, Ganesan N, Nadeem S, Farag E, Coyle PV, Nader, JD, Al-Khatib HA, Elmagboul EB, Al Dhahry S, Al-Marri SA, Al Thani AA, Al Khal A, Al Maslamani MA, Yassine HM. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PloS One*. 2019; 14(6): e0218097.