



RIDA® GENE Pediatric Viral Panel

REF PG4725



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 uso diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, realizado en el equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 II, es una prueba de RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de rinovirus/enterovirus/parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos no tratados de personas con signos y síntomas de infección respiratoria.

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel está destinado a utilizarse en el diagnóstico diferencial de infecciones por rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus y adenovirus en pacientes con síntomas de infección respiratoria en combinación con otros hallazgos clínicos y resultados de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus o adenovirus y no deben utilizarse como único fundamento del diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las infecciones víricas de las vías respiratorias son una de las principales causas de hospitalización y consulta médica en niños y ancianos.⁽¹⁻⁶⁾ Además de los virus respiratorios conocidos, como el virus de la gripe y el SARS-CoV-2, también los adenovirus, bocavirus, enterovirus, parecovirus y rinovirus pueden provocar infecciones de las vías respiratorias.

Los adenovirus humanos (HAdV) pertenecen a la familia Adenoviridae y al género *Mastadenovirus*. Son virus de ADN bicatenario icosaédricos y sin envoltura, con un diámetro de 65 nm a 110 nm. Se dividen en siete especies (A-G), que comprenden alrededor de 67 serotipos.^(7,8)

Los bocavirus humanos (HBoV) son parvovirus icosaédricos, pequeños y sin envoltura.⁽⁹⁻¹¹⁾ Tienen aproximadamente un diámetro de 18 nm a 26 nm y contienen ADN monocatenario, con un genoma de 4 kb a 6 kb de tamaño (más secuencias terminales de 32 a 52 nucleótidos). El papel de los HBoV como agentes inocuos sigue siendo controvertido, ya que con frecuencia se aíslan en combinación con otros patógenos. Los HBoV constan de cuatro subtipos: HBoV1, HBoV2, HBoV3 y HBoV4.^(9,10)

Los enterovirus y los rinovirus son virus de ARN monocatenario icosaédricos y sin envoltura, con un genoma de aproximadamente 7,2 kb de tamaño.⁽¹²⁻¹⁵⁾ Antes de la introducción de herramientas moleculares para la clasificación de los patógenos, los rinovirus y los enterovirus se consideraban dos patógenos muy diferentes.⁽¹⁵⁾ En cambio, hoy sabemos que están genéticamente relacionados entre sí. Ambos pertenecen al género *Enterovirus*, de la familia Picornaviridae.⁽¹³⁻¹⁷⁾ Los enterovirus humanos (HEV) comprenden cuatro especies (HEV-A, HEV-B, HEV-C y HEV-D),

con más de 200 serotipos diferentes. Los rinovirus se dividen en tres especies (rinovirus A, rinovirus B y rinovirus C), que abarcan alrededor de 150 tipos diferentes.⁽¹²⁻¹⁸⁾ Al igual que los enterovirus y los rinovirus, los parecovirus humanos (HPeV) pertenecen a la familia Picornaviridae, pero se clasifican en el género *Parechovirus*.^(16, 17, 19-22) Los HPeV son virus de ARN monocatenario sin envoltura. Los HPeV comprenden 19 genotipos (de HPeV1 a HPeV19), aunque el HPeV1 y el HPeV3 son los más frecuentes.^(19, 20)

Las infecciones por HAdV que afectan a las vías respiratorias no se notifican habitualmente con síntomas parecidos a los del resfriado común, como fiebre, dolor de garganta, vómitos y diarrea, y en los casos de infección grave no suelen comunicarse conjuntivitis e inflamación pulmonar.^(3, 7, 8) En las infecciones por HBoV, son síntomas frecuentes las sibilancias y la tos. Ambos virus están distribuidos por todo el mundo y no tienen un comportamiento estacional, mientras que los HBoV alcanzan un máximo en los meses de invierno y primavera.^(8, 9)

Los síntomas de infección de las vías respiratorias por HEV que se notifican habitualmente son tos, disnea, sibilancias y fiebre.⁽¹⁴⁾ Las infecciones por HEV son más frecuentes en verano y otoño en climas templados y se producen durante todo el año en las regiones tropicales.⁽¹³⁾ Los rinovirus están distribuidos por todo el mundo y presentan una mayor prevalencia en primavera y otoño.^(12, 15) Suelen afectar a pacientes con neumonía, bronquiolitis o infección del oído medio y pueden estar o no acompañados de copatógenos. Los rinovirus provocan síntomas como rinorrea, dolor de garganta, tos, cefalea, congestión nasal y malestar general.⁽¹⁵⁾ Los síntomas frecuentes de una infección por HPeV son síntomas propios del resfriado común, como congestión nasal y fiebre y también tos.^(20, 21, 23)

Generalmente, las infecciones respiratorias víricas causadas por estos virus son autolimitadas o asintomáticas, pero especialmente en niños, ancianos y pacientes con inmunodeficiencia pueden no revestir carácter de gravedad.^(7-9, 14-16, 19, 22)

3. Principio del ensayo

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel es una prueba de RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de rinovirus/enterovirus/parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos.

Después del aislamiento del ADN (si está presente), se amplifican los fragmentos génicos específicos de rinovirus/enterovirus/parecovirus (UTR 5'), bocavirus (NTR 5') y adenovirus (hexona). 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 el 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 Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control DNA** (ICD) que permite someter a control la preparación de las muestras y/o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones.

Tabla 1: Reactivos suministrados

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

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación indicadas en la tabla 2 y guarde el kit inmediatamente después de utilizarlo, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. 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 deja de ser válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a una temperatura de 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que las propiedades del ensayo se vean afectadas (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 - 8 °C).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-20 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-20 °C	20 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Reactivos

Ninguno.

6.2 Equipo de laboratorio

Para realizar el ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se requieren los siguientes equipos:

Equipos
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 PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, película de sellado)
Centrífuga con rotor para placas
Vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

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

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo debe llevarlo a cabo únicamente personal de laboratorio cualificado.

Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al realizar este ensayo.

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 la obtención de resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microorganismos y nucleasas (ADNasa/ARNasa).

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 mezcle 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 son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados.

Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Puede obtener más información en la ficha de datos de seguridad (SDS) de cada artículo en: <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: Deben notificarse todos los efectos adversos graves relacionados con el producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ADN/ARN a partir de frotis nasofaríngeos

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

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel 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 utilizarse 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 (véase la tabla 4).

Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza 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 Internal Control RNA al cartucho de la muestra antes de añadir esta, si es posible. Se recomienda pipetear 1 µL del **Internal Control RNA** por reacción a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Procedimiento del ensayo

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesarias 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 (véanse las tablas 3 y 4). Antes de utilizarlos, descongele la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA**, agítelos en un vórtex (excepto la mezcla de enzimas) y centrifúgelos brevemente. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante los pasos del procedimiento (2 - 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 un 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 centrifúguela brevemente.

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 un 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 centrifúguela brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

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

Control negativo: Añada 5 µL del **No Template Control** a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

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 de PCR del control negativo.

Muestras Añada 5 µL de eluido a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

Control positivo: Añada 5 µL de **Positive Control** a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

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 de PCR del control positivo.

Selle las placas, centrifúguelas brevemente a baja velocidad y colóquelas en el equipo de PCR en tiempo real. Inicie la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (véanse las tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal de PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®GENE, el ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se ha verificado en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí.

Tabla 5: Perfil universal de PCR en tiempo real para el 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	Máximo

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

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 6: Selección de canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentarios
Roche LightCycler® 480 II	Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

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

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

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

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

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de los genes diana
Control positivo	Positivo	N/A *1	Véase el certificado de análisis
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 No se requiere un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.

Si el control positivo no se sitúa en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, deben volverse a procesar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, deben volverse a procesar 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
- Correcta realización del procedimiento de ensayo

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Interpretación de los resultados

Tabla 8: Interpretación de los resultados*

Detección de			ICR	Resultado
Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus		
+	-	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus detectables
-	+	-	+/-	Bocavirus detectable
-	-	+	+/-	Adenovirus detectable
+	+	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus y bocavirus detectables
+	-	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus y adenovirus detectables
-	+	+	+/-	Bocavirus y adenovirus detectables
+	+	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus, bocavirus y adenovirus detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

* + = positivo
- = negativo

Una muestra es positiva si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** presentan 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 observa 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 unas concentraciones elevadas de amplicón pueden generar una señal débil o no generar señal para el **Internal Control RNA**.

Una muestra es negativa si el ARN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede descartar por la detección del **Internal Control RNA**.

Una muestra no es válida si el ARN de la muestra y el Internal Control RNA no presentan señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se ha producido un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. El ensayo RIDA[®]GENE Pediatric Viral Panel detecta ARN de rinovirus/ enterovirus/ parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos no tratados. Este ensayo no permite deducir ninguna relación entre el valor de Ct determinado y la presencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con todos los síntomas clínicos.
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. Este ensayo está validado únicamente para frotis nasofaríngeos.
4. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica del ensayo pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
5. La presencia de inhibidores de la PCR puede producir resultados falsos negativos o no válidos.
6. Al igual que con todos los ensayos diagnósticos *in vitro* mediante PCR, pueden detectarse concentraciones extremadamente bajas de las secuencias diana, inferiores al límite de detección (LoD del 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
7. Las mutaciones o polimorfismos en el cebador o en los sitios de unión de la sonda pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas y dar lugar a resultados falsos negativos al usar el RIDA[®]GENE Pediatric Viral Panel.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que están presentes los genes diana (rinovirus/enterovirus/parecovirus [UTR 5'], bocavirus [NTR 5'] y adenovirus [hexona]).
9. El dipropionato de beclometasona y la dihidrocodeína son dos sustancias que pueden tener propiedades interferentes incluso en cantidades bajas. A partir de una concentración del 5 % (v/v), ratioAllerg[®] 50 µg (dipropionato de beclometasona) interfiere en la detección de adenovirus. Paracodina[®] N gotas (dihidrocodeína) interfiere en la detección de enterovirus/rinovirus/parecovirus y del IC a partir de un 3,0 % (v/v), la concentración más baja estudiada.
10. Este ensayo debe realizarse siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (BPL). Los usuarios deben seguir estrictamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento analítico

13.1.1 Límite de detección del equipo

Para determinar el límite de detección del equipo, se analizaron 20 réplicas de una muestra de control (50 copias/reacción; rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus, adenovirus) en el LightCycler® 480 II. Todas las réplicas fueron positivas.

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

13.1.3 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de la PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Así pues, se han estudiado los efectos de diferentes sustancias que podían estar presentes debido a su uso generalizado en las infecciones respiratorias o a su amplia presencia en las correspondientes muestras (frotis nasofaríngeos).

Las sustancias que podían influir significativamente en los resultados del ensayo se examinaron inicialmente a altas concentraciones (con el triple de la dosis diaria o una simulación del peor caso) mediante un cribado de interferencias. En caso de encontrar alguna sustancia potencialmente interferente durante el cribado de interferencias, se establecía una relación dosis-efecto entre la concentración de la sustancia en cuestión y la interferencia.

No se registraron interferencias con las sustancias indicadas en la tabla 10.

Tabla 10: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancias potencialmente interferentes	Concentración
Amoxicilina ratiopharm® 1000 mg comprimidos recubiertos con película (amoxicilina)	1 mg/mL
Azitromicina ratiopharm® 500 mg comprimidos recubiertos con película (azitromicina)	84 mg/mL
Sangre humana	2% [v/v]
Mucinas	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® (xilometazolina, solución para pulverización nasal)	10 % [v/v]
Cloruro de sodio	10 % [v/v]
Neo-angin® (solución para pulverización) (clorhidrato de bencidamina)	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® 500 mg Tabletten (paracetamol, comprimidos)	10 mg/mL

Se observaron efectos inhibidores con las sustancias ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) (5 % [v/v]) y Paracodina® N gotas (dihidrocodeína) (3,0 % [v/v]) (véase el apartado «Limitaciones del método»).

Reactividad cruzada

Se estudiaron varios microorganismos (bacterias, virus, hongos) que suelen encontrarse en la matriz de los frotis nasofaríngeos. Los microorganismos estudiados para este ensayo se han elegido porque están presentes de forma natural en la matriz o bien porque causan los síntomas correspondientes como patógenos respiratorios. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10⁶ y 10⁹ CFU*/mL), cultivos fúngicos o víricos, sobrenadantes de cultivos bacterianos, fúngicos o víricos, y estándares LGC o NIBSC de los microorganismos en cuestión.

El ensayo de RT-PCR múltiple en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel es específico para rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus y adenovirus. No se hallaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (véase la tabla 11):

Tabla 11: Organismos con posible reactividad cruzada

Organismo	Resultado del ensayo*		
	Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> , cepa 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> , cepa 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Virus de Epstein-Barr, cepa B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	-	-
Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	-	-
Coronavirus humano 229E	-	-	-
Coronavirus humano OC43	-	-	-
Coronavirus humano SARS-CoV-2 (aislado: Italy-INMI1)	-	-	-
Cepa del MERS-CoV: Florida/USA-2 Saudi Arabia 2014	-	-	-
Citomegalovirus humano	-	-	-
Metaneumovirus humano	-	-	-
Virus paragripal humano 1, cepa C35	-	-	-
Virus paragripal humano 2, cepa Greer	-	-	-
Virus paragripal, serotipo 3	-	-	-
Virus paragripal humano 4a, cepa M-25	-	-	-
Virus respiratorio sincitial humano, cepa Long	-	-	-
Virus respiratorio sincitial humano, cepa 9320	-	-	-
Gripe A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Gripe A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Gripe B/Washington/02/2019	-	-	-

Gripe B/Phuket/3073/2013 (linaje Yamagata)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

13.1.4 Precisión

Se ha determinado la precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para los siguientes ññ casos.

Precisión *intraensayo* Determinación de 5 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 durante 10 días de trabajo (2 ensayos por día), realizados por dos técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

Los ensayos de precisión *intraensayo* e *interensayo* se llevaron a cabo utilizando 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 coeficiente máximo de variación de las mediciones realizadas con el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel en el LightCycler® 480 II fue del 3,16 %.

Tabla 12: Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para rinovirus/ enterovirus/ parecovirus.

Media del Ct y CV	<i>Intraensayo</i>			<i>Interensayo</i>			<i>Interlote</i>
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6
	CV (%)	1,11%	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0
	CV (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7
	CV (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0
	CV (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %

Tabla 13: Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para bocavirus.

Media del Ct y CV		<i>Intraensayo</i>			<i>Interensayo</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8	30,9
	CV (%)	0,91 %	0,67 %	0,70 %	1,25 %	1,03 %	1,16 %	1,16 %
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2	32,2
	CV (%)	0,91 %	0,77 %	1,15 %	1,24 %	1,43 %	1,83 %	1,52 %
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4	23,4
	CV (%)	1,03 %	0,76 %	0,53 %	1,26 %	1,66 %	1,56 %	1,50 %
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6	26,5
	CV (%)	0,69 %	0,49 %	0,74 %	1,17 %	1,15 %	0,96 %	1,10 %

Tabla 14: Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para adenovirus.

Media del Ct y CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8	31,7
	CV (%)	1,15 %	1,08 %	1,38 %	1,50 %	1,51 %	1,09 %	1,38 %
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0	33,0
	CV (%)	0,87 %	0,80 %	1,11%	2,05 %	1,39 %	1,66 %	1,72 %
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,05 %	0,77 %	0,65 %	1,98 %	1,46 %	1,69 %	1,72 %
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5	27,4
	CV (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %	1,62 %

13.1.5 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA® GENE Pediatric Viral Panel se examinó en un panel definido de cepas/subtipos de virus (véase la tabla 15).

Tabla 15: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Concentración	Resultado*		
		Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, humano cepa Adenoid 71 (subgrupo C)	1 x 10 ⁻⁵ µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan (subgrupo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, humano, cepa Tak (subgrupo F)	1,17 x 10 ¹ TCID ₅₀ /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (subgrupo C)	8,51 x 10 ³ TCID ₅₀ /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (subgrupo B)	1 x 10 ^{3,23} U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (subgrupo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (subgrupo B)	1 x 10 ^{0,29} U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (subgrupo A)	1 x 10 ^{0,15} U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (subgrupo D)	1 x 10 ^{-1,98} U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 5, cepa madre N/D (subgrupo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (subgrupo B)	1 x 10 ^{3,06} U/ml	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 ⁶	-	+	-
Enterovirus A, virus de Coxsackie A2 cepa Fleetwood	1,51 x 10 ² U/mL	+	-	-
Enterovirus A, enterovirus tipo 71, cepa del aislado 2003	4,57 TCID ₅₀ /mL	+	-	-
Enterovirus B, virus de Coxsackie B4	1 x 10 ^{2,5} U/mL	+	-	-
Enterovirus B, ecovirus 11	5,89 x 10 ¹ U/mL	+	-	-

Enterovirus C, virus de Coxsackie A21, cepa Kuykendall	$1 \times 10^{3,29}$ U/mL	+	-	-
Enterovirus C, virus de Coxsackie A24, cepa DN-19	1:10 ⁴	+	-	-
Enterovirus D, enterovirus tipo 68, cepa del aislado 2007	$1,26 \times 10^2$ TCID ₅₀ /mL	+	-	-
Enterovirus D, enterovirus tipo 70, cepa J670/71	1:10 ⁵	+	-	-
Parecovirus tipo 1, cepa Harris	$3,39 \times 10^4$ U/mL	+	-	-
Parecovirus tipo 3	$4,07 \times 10^3$ TCID ₅₀ /mL	+	-	-
Rinovirus tipo 1A	$4,17 \times 10^1$ U/mL	+	-	-
Rinovirus A16	$1,26 \times 10^2$ U/mL	+	-	-
Rinovirus A80	$1,17 \times 10^1$ U/mL	+	-	-
Rinovirus B14	$1,05 \times 10^1$ TCID ₅₀ /mL	+	-	-
Rinovirus B42	$2,45 \times 10^2$ U/mL	+	-	-
Rinovirus B70	$1,70 \times 10^2$ U/mL	+	-	-

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










- = negativo

14. Historial de versiones






Número de versión	Sección y designación
2022-03-03	Versión publicada

15. Significado de los símbolos

Símbolos generales

	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Seguir el manual de instrucciones
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Control de extracción/inhibición
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. PloS One. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. Rev Med Virol. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. Indian J Med Res. Februar 2017;145(2):189-93.

5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr.* Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl.* 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr.* August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol.* 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health.* Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol.* Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med.* August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol.* Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr.* Juni 2016;4(3).
15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol.* August 2020;92(8):1065-74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol.* September 2013;85(9):1678-84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev.* September 2014;15(3):268-74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses.* 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* Januar 2018;98:28-32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol.* April 2012;84(4):686-90.

22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September