VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest BIOTEC

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Parainfluenza 3

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	**VS-PIC106L**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	**VS-PIC106H**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	**VS-PIC112L**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	**VS-PIC112H**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	**VS-PIC113L**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	**VS-PIC113H**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	**VS-PIC136**
VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	**VS-PIC172**

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of Parainfluenza 3 in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Parainfluenza 3 in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Parainfluenza 3.

2. Summary and Explanation

Parainfluenza viruses (PIV or HPIV in humans) belong to the *Paramyxoviridae* family and are divided genetically and antigenically into 4 types. All of them can cause respiratory infections in infants, children, and adults; although the location of the infection and some symptoms depend on the type. HPIV-1 and HPIV-2 both cause upper and lower respiratory illness, such as cold and croup, with HPIV-1 most often identified in children. HPIV-3 is more often associated with lower illness (bronchiolitis, bronchitis, and pneumonia) and HPIV-4 is recognized less often but may cause mild to severe respiratory illnesses. Most often, they aren't severe enough to cause concern in healthy adults; however, they can be life-threatening in infants, the immunocompromised, the chronically ill, and the elderly.

HPIV usually spread from an infected person to others through the air by coughing and sneezing, close personal contact or touching objects or surfaces that have HIPV on them and then touching their mouth, nose, or eyes. After you get infected, it takes about 2 to 7 days before you develop symptoms.

Parainfluenza are medium size enveloped virus and their genomes are organized on a single negative-sense strand of RNA that encodes at least six common structural proteins. These viruses carry two envelope glycoproteins: HN containing both hemagglutinin and neuraminidase activity and F carrying fusion activity.

Viral culture in combination with immunofluorescence is the traditional method for diagnosis but it is time-consuming. Antigen detection test are widely used but they are less sensitive and specific than other diagnostics tools such as Real-time PCR assays, which currently are being considered one of the best method of choice.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Parainfluenza 3* in respiratory samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by amplification of a conserved region of the *hemagglutinin-neuraminidase* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit is based on 5´ exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on real time PCR platforms.

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Parainfluenza 3 RNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Parainfluenza 3 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PIC106L, VS-PIC106H, VS-PIC112L and VS-PIC112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
Parainfluenza 3 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-PIC113L and VS-PIC113H.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
Parainfluenza 3 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-PIC136 and VS-PIC172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40ºC until the expiration date which is stated on the label.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-PIC113L, VS-PIC113H, VS-PIC136 and VS-PIC172). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-PIC136 and VS-PIC172 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. RNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

For RNA extraction from respiratory samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer´s instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS®AmpliPrep Instrument (Roche).

8.2. Lyophilized positive control

Parainfluenza 3 Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Parainfluenza 3* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNAse/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Parainfluenza 3* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45ºC
1	Initial denaturation	2 min	95ºC
45	Denaturation	10 seg	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60ºC

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Parainfluenza 3) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for Parainfluenza 3 in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer´s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Parainfluenza 3 (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	**Parainfluenza 3 Positive**
-	+	-	+	**Parainfluenza 3 Negative**
-	-	-	+	**Experiment fail**
+	+	+	-	**Experiment fail**

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

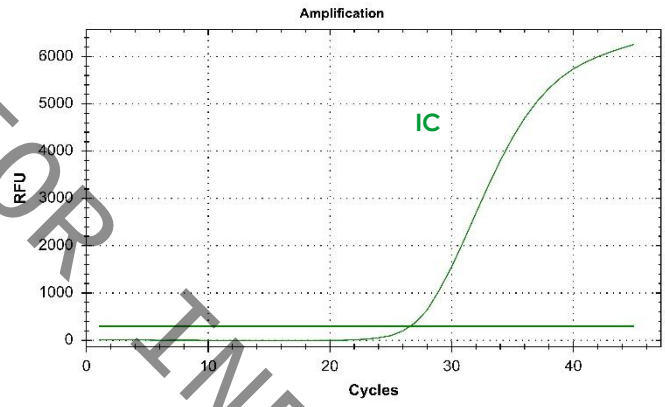
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids

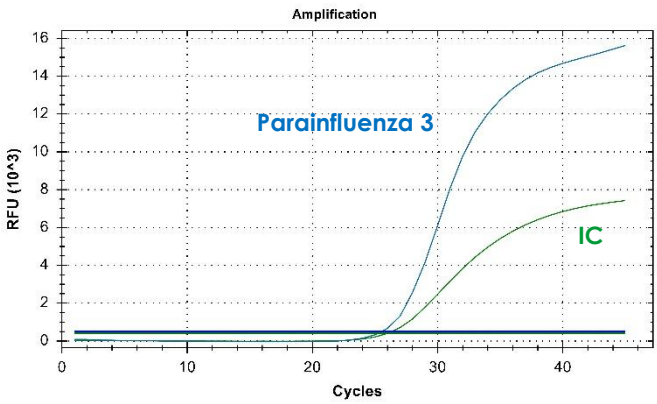
A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control



Positive control

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with RNA extracted from nasal, throat, tonsillar and pharyngotonsillar swabs, nasopharyngeal aspirates, sputum and bronchoalveolare lavage samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Parainfluenza 3 either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

11. Quality control

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit was tested using 86 respiratory samples (nasal, throat, tonsillar and pharyngotonsillar swabs, nasopharyngeal aspirates, sputum and bronchoalveolare lavage) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by molecular detection methods (CLART® PneumoVir (Genomica) + RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)).

The results were as follows:

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit	**CLART® PneumoVir (Genomica) + RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)**			
		+	**-**	**Total**
	+	34	0	34
	-	3*	49	52
	Total	37	49	86

Table 6. Comparative results

**The low amount of template RNA in these respiratory samples is below the detection limit of the method used.*

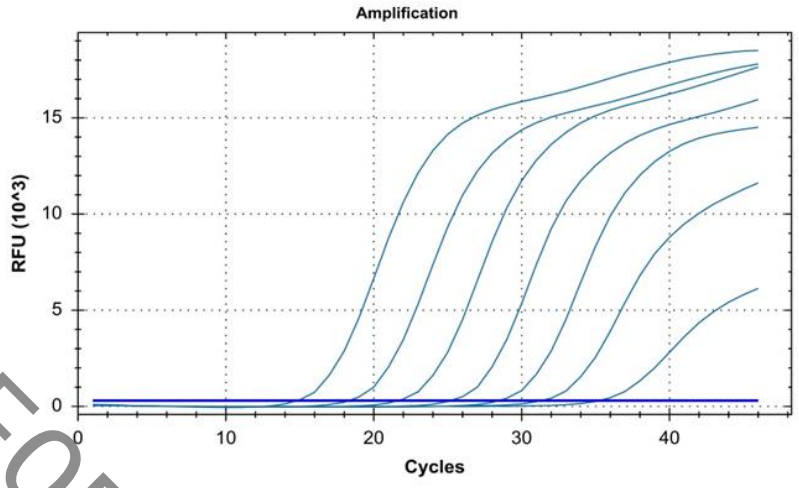
The results show a high sensitivity and specificity to detect Parainfluenza 3 using VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥10 RNA copies per reaction (Figure 2).

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Figure 2. Dilution series of Parainfluenza 3 (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Parainfluenza 3 assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
Bordetella pertussis	-	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
Legionella bozemanii	-	*Haemophilus influenzae*	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
Legionella micdadei	-	*Moraxella catarrhalis*	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
Legionella dumoffii	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
Legionella longbeachae	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-	Human coronavirus 229E	-
Legionella pneumophila	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human rhinovirus	-
Mycoplasma pneumoniae	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 virus	-	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	-
Streptococcus pneumoniae	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus	-	Human Adenovirus 5	-
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-		

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against Parainfluenza 3 showing positive results.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	**Model**
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System (1)
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System (1)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System (6)
Cepheid	SmartCycler® (3)
Qiagen	Rotor-Gene® Q(3)
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System (4)
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System (4)
Roche	Cobas z480 Analyzer (4)

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	**Model**
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 (6)
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System (6)
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System (6)
Cepheid	SmartCycler®(3)
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (2)
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System (2)
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Qiagen	Rotor-Gene® Q(3)
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System (2)
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System (2)

*(1)Select Ramp Speed "**Standard**".*
(2)See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
(3)The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
(4)Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
(5)No detection in Cy5 channel.
(6)Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquaring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 Fl for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.

ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de Parainfluenza 3 en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Parainfluenza 3 en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras respiratorias, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher)* para detectar Parainfluenza 3.

2. Introducción y explicación

Los virus Parainfluenza (PIV o HPIV en humanos) pertenecen a la familia de *Paramyxoviridae* y se dividen genética y antigénicamente en 4 tipos. Todos ellos pueden causar infecciones respiratorias en bebes, niños y adultos; aunque la localización de la infección y algunos de los síntomas dependen del tipo. La infección por HPIV-1 y HPIV-2 da lugar enfermedades respiratorias del tracto superior e inferior, como resfriado y gripe, siendo el virus HPIV-1 más frecuentemente identificado en niños. HPIV-3 se asocia principalmente con enfermedades respiratorias del tracto inferior (bronquiolitis, bronquitis y neumonía) y HPIV-4 se reconoce con menos frecuencia, pero pueden causar enfermedades respiratorias leves y graves. A menudo, las infecciones causadas por estos virus en adultos sanos no son tan graves como para considerarse preocupantes; sin embargo, pueden ser potencialmente mortales en los bebés, los pacientes inmunodeprimidos, enfermos crónicos y ancianos.

Normalmente, HPIV se suele propagar de una persona infectada a otras personas a través del aire debido la tos y los estornudos, contacto personal o tocando objetos o superficies contaminados con HIPV y posteriormente tocarse la boca, nariz u ojos. Una vez que se produce la infección, se tarda alrededor de 2 a 7 días antes de desarrollar los síntomas.

Parainfluenza son virus con envoltura de tamaño mediano y cuyos genomas consisten en un en RNA monocatenario de sentido negativo (ssRNA-), el cual codifica al menos seis proteínas estructurales comunes. Esos virus presentan en la envoltura vírica dos glicoproteínas: la proteína de fijación viral Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), que también causa hemadsorción y hemoaglutinación, y la proteína de fusión (F).

El cultivo viral en combinación con la inmunofluorescencia son el método tradicional para el diagnóstico de estos virus, pero consume mucho tiempo. Los test de detección de antígenos son ampliamente utilizados pero son menos sensibles y específicos que otras herramientas de diagnóstico como los ensayos de PCR a tiempo real. Por lo tanto, actualmente este último se considera uno de los mejores métodos de elección.

3. Procedimiento

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de Parainfluenza 3 en muestras respiratorias. La detección se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de Parainfluenza 3 se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *hemaglutinina-neuraminidasa*.

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5´ exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, Parainfluenza 3 se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Parainfluenza 3 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PIC106L, VS-PIC106H, VS-PIC112L y VS-PIC112H.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Parainfluenza 3 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PIC113L y VS-PIC113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Parainfluenza 3 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Parainfluenza 3 Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-PIC136 y VS-PIC172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-PIC113L, VS-PIC113H, VS-PIC136 y VS-PIC172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-PIC136 y VS-PIC172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas asi como para evitar la contaminación.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de RNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de RNA a partir muestras respiratorias, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando el Sistema de extracción automatizado COBAS®AmpliPrep Instrument (Roche).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Parainfluenza 3* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Parainfluenza 3* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Parainfluenza 3* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45ºC
1	Desnaturalización inicial	2 min	95ºC
45	Desnaturalización	10 seg	95ºC
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60ºC

Tabla 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Parainfluenza 3) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de Parainfluenza 3. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

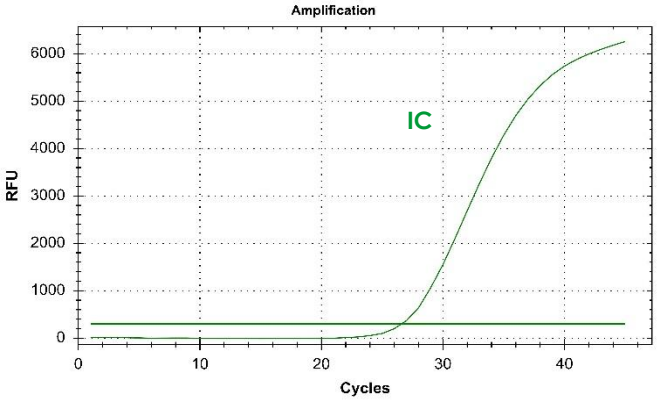
Parainfluenza 3 (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	**Parainfluenza 3 Positivo**
-	+	-	+	**Parainfluenza 3 Negativo**
-	-	-	+	**Inválido**
+	+	+	-	**Inválido**

Tabla 6. Interpretación
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

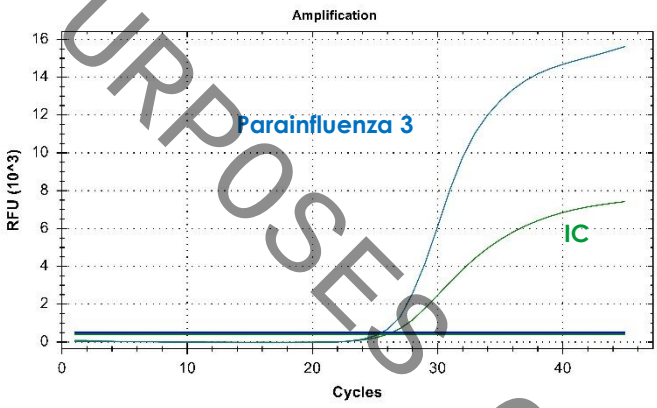
Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™Real-Time PCR Detection System.



Control Negativo



Control Positivo

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras de frotis nasal, faríngeo, amigdalar y faringoamigdalar, aspirado nasofaríngeo, esputo y lavado broncoalveolar.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Parainfluenza 3 ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clinica

Se evaluaron 86 muestras respiratorias (frotis nasales, faríngeos, amigdalares y faringoamigdalares, aspirados nasofaríngeos, esputos y lavados broncoalveolares) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por métodos de detección molecular (CLART® PneumoVir (Genomica) + RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir (Genomica) + RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	34	0	34
	-	3*	49	52
	Total	37	49	86

Tabla 7. Comparativa de resultados

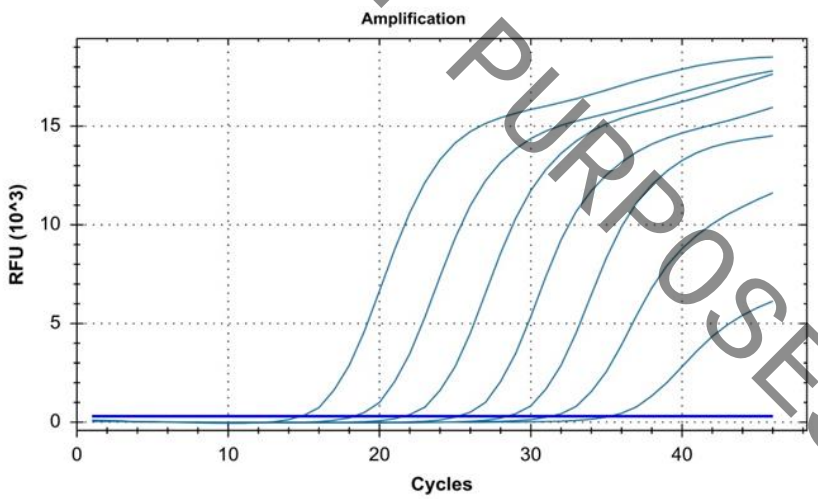
**La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios.*

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar la Parainfluenza 3 utilizando VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥10 copias de RNA por reacción. (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de Parainfluenza 3. (10^7-10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de Parainfluenza 3 fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

Prueba de reacción cruzada					
Bordetella pertussis	-	*Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
Legionella bozemanii	-	*Haemophilus influenzae*	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
Legionella micdadei	-	*Moraxella catarrhalis*	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
Legionella dumoffii	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-	Metapneumovirus A y B humano	-
Legionella longbeachae	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-	Coronavirus 229E humano	-
Legionella pneumophila	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Rinovirus humano	-
Mycoplasma pneumoniae	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Adenovirus humano 2 cepa Adenoide 6	-
Streptococcus pneumoniae	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Adenovirus humano 5	-
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-		

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Parainfluenza 3* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a Parainfluenza 3 mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. K.J. Henrickson *et al.* Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(2): 242–264.
2. R. Pechhini *et al.* Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2015; 19(4): 358-362
3. K.E. Templeton *et al.* Rapid and Sensitive Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(4): 1564–1569.
4. K. Loens *et al*. Performance of different mono- and multiplex nucleic acid amplification tests on a multipathogen external quality assessment panel. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50(3): 977-987.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

IVD	*In vitro* diagnostic device Producto para diagnóstico *in vitro*		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante
LOT	Batch code Número de lote		Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura	Σ	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test
DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia				

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	**Modelo**
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System (1)
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System (1)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System (6)
Cepheid	SmartCycler® (3)
Qiagen	Rotor-Gene® Q(3)
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System (4)
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System (4)
Roche	Cobas z480 Analyzer (4)

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	**Modelo**
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 (6)
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (5)
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System (6)
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System (6)
Cepheid	SmartCycler®(3)
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (2)
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System (2)
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Qiagen	Rotor-Gene® Q(3)
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System (2)
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System (2)

*(1)Seleccionar Ramp Speed "**Standard**".*
(2)Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
(3)El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
(4)Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
(5)No lectura en canal Cy5.
(6)Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 Fl para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

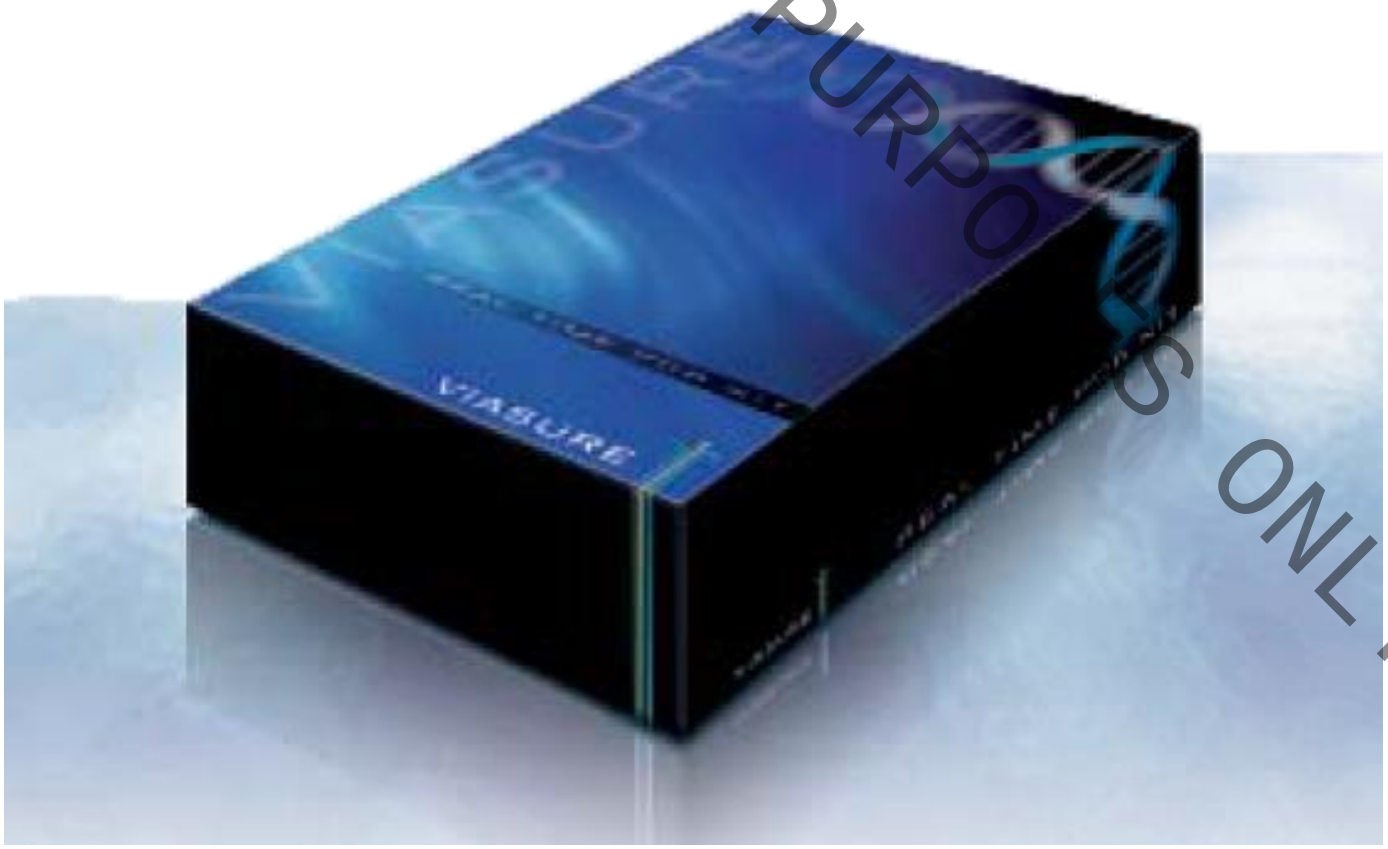
Revision: July 2019

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es

VIASURE online

VIASURE

CE IVD CSQ MED ISO 13485

Real Time PCR Detection Kits

CerTest BIOTEC