

Vitassay qPCR

Parainfluenza 1/3 + 2/4

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4 en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4 in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 permite la detección y diferenciación de Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4 mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4.

Referencias

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 4x8-well strip, low profile 7041025

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 4x8-well strip, high profile 7042025

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S025A/ 7042S025A	Parainfluenza 1+3 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S025B/ 7042S025B	Parainfluenza 2+4 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C025	Parainfluenza viruses Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL

- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los virus de Parainfluenza (PIV o HPIV en humanos) son de la familia de Paramyxoviridae y se dividen en 4 tipos, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4. Los virus de Parainfluenza son virus con envoltura de tamaño mediano cuyos genomas consisten en un RNA monocatenario de sentido negativo, el cual codifica 6 proteínas estructurales. En la envoltura vírica estos virus presentan dos glicoproteínas: la proteína de fusión (F) y la proteína de fijación viral Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), que también causa hemadsorción y hemoaglutinación.

El HPIV se suele transmitir a través del aire debido a tos y estornudos, contacto personal y/o tocando objetos/superficies contaminadas con el virus para posterior tocarse la nariz boca u ojos. Tras la infección se incuba el virus durante 2-7 días hasta desarrollar los síntomas.

El tipo 1 y tipo 2 da lugar a enfermedades respiratorias en el tracto superior e inferior (resfriado y gripe) siendo el tipo 1 más frecuente en niños. El tipo 3 se asocia a enfermedades del tracto inferior como bronquiolitis, bronquitis y neumonía, y el tipo 4 es menos frecuente y se asocia con enfermedades respiratorias tanto leves como graves.

El método tradicional para el diagnóstico de este virus es con inmunofluorescencia, pero tiene el inconveniente que es un método muy lento. Eso con el añadido que los métodos de antígenos son menos sensibles y específicos que otras herramientas como la PCR de tiempo real por lo que este último se considera uno de los mejores métodos de elección.

Principio del test

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *hemagglutinin-neuraminidasa* para el subtipaje de HPIV 1, 2, 3 y 4. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido, de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de los virus se realiza mediante un aumento de

la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de HPIV 1 y HPIV3. Tras la reacción de amplificación, HPIV 1 se detecta en el canal Cy5 y HPIV 3 se detecta en el canal FAM. La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para el subtipaje de HPIV 2 y HPIV 4. Tras la reacción de amplificación, HPIV 2 se detecta en el canal Cy5 y HPIV 4 se detecta en el canal FAM. Ambas tiras de reacción contienen un control interno (CI) el cual se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (ROCHE).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del *Parainfluenza* Positive Control (tubo rojo) con 200 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4), HEX, JOE o VIC (Control Interno), y Cy5 (Parainfluenza 1 y Parainfluenza 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3029P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales del panel de virus respiratorios.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal en FAM, Cy5 y HEX, JOE o VIC.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Interpretación de los resultados:

Primera mezcla de reacción para la detección de Parainfluenza 1 y/o Parainfluenza 3					
Parainfluenza 1 (Cy5)	Parainfluenza 3 (FAM)	Control Interno	Control negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Parainfluenza 1 y 3 Positivos
-	-	+	-	+	Parainfluenza 1 y 3 Negativos
+	-	+/-	-	+	Parainfluenza 1 Positivo y Parainfluenza 3 Negativo
-	+	+/-	-	+	Parainfluenza 3 Positivo y Parainfluenza 1 Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido
Segunda mezcla de reacción para la detección de Parainfluenza 2 y Parainfluenza 4					
Parainfluenza 2 (Cy5)	Parainfluenza 4 (FAM)	Control Interno	Control negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Parainfluenza 2 y 4 Positivos
-	-	+	-	+	Parainfluenza 2 y 4 Negativos
+	-	+/-	-	+	Parainfluenza 2 Positivo y Parainfluenza 4 Negativo
-	+	+/-	-	+	Parainfluenza 4 Positivo y Parainfluenza 2 Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Para analizar la sensibilidad y la especificidad clínica se realizaron 2 ensayos clínicos. En uno se emplearon 97 muestras de frotis faríngeos para la detección de HPIV-1 y HPIV-3 y en el segundo ensayo se emplearon 114 muestras de frotis faríngeos para la detección de HPIV-2 y HPIV-4. Se llevó a cabo con los test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular CLART® PneumoVir (Genómica)

HPIV-1 fue detectada en 3 muestras positivas mediante ambos kits. Además, Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 detectó una muestra positiva más (La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado).

HPIV-4 fue detectada en 44 muestras positivas mediante ambos kits. Además, Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 detectó una muestra positiva más (La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado).

HPIV-2 fue detectada en 2 muestras positivas mediante ambos kits.

HPIV-4 fue detectada en 13 muestras positivas mediante ambos kits. A parte de esto, CLART® PneumoVir (Genómica) detectó 4 muestras positivas más. Se evaluaron estas 4 muestras con un kit comercial (*RIDA@GENE Parainfluenza (R-Biopharm)*), confirmando nuestros resultados.

Los resultados dan una alta especificidad y sensibilidad para detectar Parainfluenza utilizando Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de los diferentes virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Parainfluenza fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes virus, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Metapneumovirus A y B humano
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Coronavirus 229E humano
<i>Legionella longbeachae</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	MERS Coronavirus
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Rinovirus humano
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 A(H3N2)	Adenovirus humano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Virus respiratorio sincitial (RSV)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	Bocavirus humano
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8)	

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 ha sido evaluado frente a Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Parainfluenza 4, obteniendo un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de frotis faríngeo disueltas en medio de transporte. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. 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 del RNA 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 los diferentes virus, 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.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	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	Al configurar los canales, 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 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 allows the detection and differentiation Parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4 by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4 in combination with clinical and epidemiological risk factors and evaluation of infections with Parainfluenza subtype infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 4x8 -well strip, low profile 7041025

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 4x8-well strip, high profile 7042025

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S025A/ 7042S025A	Parainfluenza 1+3 strips low/high profile	-	4x8-well strip
7041S025B/ 7042S025B	Parainfluenza 2+4 strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C025	Parainfluenza viruses Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	yelow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Parainfluenza viruses (PIV or HPIV in humans) are from the Paramyxoviridae family and are divided into 4 types, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4. Parainfluenza viruses are medium-sized enveloped viruses whose genomes consist of a single-stranded RNA of negative sense, which encodes 6 structural proteins. In the viral envelope these viruses have two glycoproteins: the fusion protein (F) and the viral binding protein Hemagglutinin-Neuraminidase (HN), which also causes hemadsorption and haemagglutination.

HPIV is usually transmitted through the air due to coughing and sneezing, personal contact and / or touching objects / surfaces contaminated with the virus to later touch the nose, mouth or eyes. After infection, the virus is incubated for 2-7 days until the symptoms develop.

Type 1 and type 2 lead to respiratory diseases in the upper and lower tracts (cold and flu) being the most frequent type 1 in children. Type 3 is associated with diseases of the lower tract such as bronchiolitis, bronchitis and pneumonia, and type 4 is less frequent and is associated with mild and severe respiratory diseases.

The traditional method for the diagnosis of this virus is with immunofluorescence, but it has the disadvantage that it is a very slow method. That with the addition that antigenic methods are less sensitive and specific than other tools such as real-time PCR, so the latter is considered one of the best methods of choice.

Principle of the test

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *hemagglutinin-neuraminidase* gene for HPIV 1, 2, 3 and 4. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by

reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The presence of the virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4, it is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in stabilized format to carry out the PCR in real time. Each kit includes two types of strips and each of them corresponds to a different test. The first strip contains the multiplex reaction mixture for the detection of HPIV 1 and HPIV 3. After the amplification reaction, HPIV 1 is detected in the Cy5 channel and HPIV 3 is detected in the FAM channel. The second strip contains the multiplex reaction mixture for subtyping HPIV 2 and HPIV 4. After the amplification reaction, HPIV 2 is detected in the Cy5 channel and HPIV 4 is detected in the FAM channel. Both reaction strips contain an internal control (IC) which is detected in the HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (ROCHE).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Parainfluenza 1/3 + 2/4 Positive Control (red tube) in the 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4), Cy5 (Parainfluenza 1 and Parainfluenza 2) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4), Cy5 (Parainfluenza 1 and Parainfluenza 2) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, Cy5 and HEX, JOE or VIC channels which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized following:

Interpretation of results Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 strips:

First multiplex reaction mix for the detection of Parainfluenza 1 and/or Parainfluenza 3					
Parainfluenza 1 (Cy5)	Parainfluenza 3 (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Parainfluenza 1 and 3 Positive
-	-	+	-	+	Parainfluenza 1 and 3 Negative
+	-	+/-	-	+	Parainfluenza 1 Positive and Parainfluenza 3 Negative
-	+	+/-	-	+	Parainfluenza 3 Positive and Parainfluenza 1 Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail
Second multiplex reaction mix for the detection of Parainfluenza 2 and/or Parainfluenza 4					
Parainfluenza 2 (Cy5)	Parainfluenza 4 (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Parainfluenza 2 and 4 Positive
-	-	+	-	+	Parainfluenza 2 and 4 Negative
+	-	+/-	-	+	Parainfluenza 2 Positive and Parainfluenza 4 Negative
-	+	+/-	-	+	Parainfluenza 4 Positive and Parainfluenza 2 Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples don't show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

To analyze the sensitivity and clinical specificity, 2 clinical trials were performed. In one, 97 samples of pharyngeal smears were used for the detection of HPIV-1 and HPIV-3 and in the second test 114 samples of pharyngeal smears were used for the detection of HPIV-2 and HPIV-4. It was carried out with the Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 molecular diagnostic tests and the results obtained were compared with those obtained by a CLART® PneumoVir molecular detection method (Genomics)

HPIV-1 was detected in 3 positive samples by both kits. In addition, Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 detected one more positive sample (The low amount of template RNA detected in these samples is below the detection limit of the method used).

HPIV-4 was detected in 44 positive samples by both kits. In addition, Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 detected one more positive sample (The low amount of template RNA detected in these samples is below the detection limit of the method used).

HPIV-2 was detected in 2 positive samples by both kits.

HPIV-4 was detected in 13 positive samples by both kits. Apart from this, CLART® PneumoVir (Genomica) detected 4 more positive samples. These 4 samples were evaluated with a commercial kit (RIDA@GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirming our results.

The results give a high specificity and sensitivity to detect Parainfluenza using Vitassay and qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4 templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Parainfluenza 1/3 + 2/4 was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity testing		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Metapneumovirus A y B humano
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Coronavirus 229E humano
<i>Legionella longbeachae</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	MERS Coronavirus
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Rinovirus humano
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 A(H3N2)	Adenovirus humano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Virus respiratorio sincitial (RSV)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/ 2014 (H5N8)	Bocavirus humano
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	

Analytical reactivity

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 has been evaluated against Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 and Parainfluenza 4, with a positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Parainfluenza 1/3 + 2/4 has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with throat swab samples dissolved in transport medium. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler @480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler @96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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 Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografia

1. R. Pechini *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
2. L. Magnusson. Analysis of the Human Parainfluenza Virus Replication Promoter. *UW-L Journal of Undergraduate Research X* 2007.
3. R. Vainionpaa *et al.* Biology of Parainfluenza Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 1994, p. 265-275.
4. .J. Henrickson *et al.* Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(2): 242–264.
5. M. E. Terlizzi *et al.* Quantitative RT Real Time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3. *Journal of Virological Methods* 160 (2009) 172–177.
6. 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.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.


Mx3000P™ and Mx3005™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastecycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer Sample diluent		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com