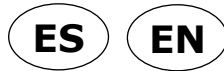


Vitassay qPCR

Entero + Parecho + Parotitis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa, identificación y diferenciación del ARN de Parotiditis, Enterovirus y/o Parechovirus en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of RNA of Mumps virus, Enterovirus and/or Parechovirus species in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis permite la detección cualitativa e identificación de ARN del Paramixovirus (virus causante de la parotiditis o paperas), Enterovirus y/o Parechovirus mediante RT-PCR en tiempo real en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección viral por el virus causante de la parotiditis, Enterovirus y/o Parechovirus por su profesional de la salud. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las infecciones por el virus de la parotiditis, enterovirus y/o parechovirus, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológicos y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis

4x8-well strip, low profile

7041075

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis

4x8-well strip, high profile

7042075

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S075/ 7042S075	Entero+Parecho+Parotitis strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C075	Entero+Parecho+Parotitis Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 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

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- 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

Paramixovirus (virus causante de las paperas)

El Paramixovirus es el virus causante de las paperas. Es un virus lineal, no segmentado, de ARN monocatenario.

Los únicos huéspedes conocidos de este virus son los humanos y puede ser transmitido a través de la saliva desde 3 días antes del inicio de la parotiditis hasta 9 días después. El contacto directo con las secreciones respiratorias, la saliva o los fómites puede ocasionar la propagación de las paperas. Esto provoca que los brotes suelen producirse entre personas que están en contacto estrecho, como en residencias universitarias o equipos deportivos. Suele afectar a los adultos jóvenes, lo que probablemente esté relacionado con una eficacia baja de la vacunación.

Los síntomas que suelen aparecer en las personas con parotiditis son fiebre, mialgias, anorexia, malestar general, cefalea y síntomas inespecíficos de las vías respiratorias superiores. Sin embargo, la presentación más característica es la inflamación unilateral o bilateral de las glándulas parótidas.

La vacuna contra el sarampión, las paperas y la rubéola (triple vírica, SPR) se introdujo en 1967, causa directa de la disminución de los casos de paperas registrados. Hoy en día, se recomienda que los niños reciban la primera dosis a los 12-15 meses y la segunda a los 4-6 años. Sin embargo, en la última década, se ha visto un aumento de brotes en Nueva York, Reino Unido y California, entre otros lugares.

La detección de anticuerpos contra las paperas por sí sola no es suficiente para confirmar la enfermedad, el uso de la RT-PCR revela más detalles sobre las cepas virales ya que es una herramienta extremadamente sensible.

Parechovirus y Enterovirus

Los Parechovirus y Enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae, que es una de las mayores familias de virus de ARN, cuyos miembros infectan tanto a seres humanos como animales. Sus miembros son pequeños virus sin envoltura que contienen un ácido ribonucleico (ARN) monocatenario. El género Enterovirus se divide en 12 especies (EV A-J y Rhinovirus A-C). Los EV A, B, C y D se encuentran en humanos, y el resto en animales. El EV-A consta de 25 tipos, el EV-B de 63 tipos, el EV-C de 23 tipos y el EV-D de 5 tipos. El género Parechovirus se divide en 2 especies (Parechovirus A y B). La especie Parechovirus A consta de 16 tipos que infectan a humanos, como el HPeV-1, mientras que Parechovirus B consta de 4 tipos que infectan a roedores.

La transmisión de los Enterovirus se produce por vía fecal-oral, transplacentaria y por gotas respiratorias. Los niños, especialmente neonatos y bebés, tienen un alto riesgo de desarrollar meningitis aséptica debido a los Enterovirus y Parechovirus. Mientras que las infecciones por Enterovirus afectan comúnmente a niños mayores y adultos, las infecciones por Parechovirus son poco comunes en estas poblaciones.

Las infecciones por Enterovirus pueden causar una gran variedad de síntomas, desde afecciones respiratorias y gastrointestinales menos graves como la herpangina, y la enfermedad de manos, pies y boca, hasta otras más graves como pleurodinia, hepatitis, parálisis, entre otras.

En el caso del Parechovirus, el HPeV-1 es el tipo más prevalente, causando principalmente enfermedades gastrointestinales y respiratorias leves, aunque ocasionalmente se pueden observar enfermedades más graves en niños pequeños. Los Parechovirus son la segunda causa más importante de enfermedades virales similares a la sepsis y meningitis en los lactantes, ambas causadas principalmente por el HPeV-3, que es el tipo de Parechovirus más patogénico.

Hoy en día, el estándar de oro para su diagnóstico es la RT-qPCR, que ha demostrado ser más precisa y sensible que el cultivo viral en la detección del ARN tanto del Enterovirus como del Parechovirus.

Principio del test

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen F (proteína de Fusión) del Paramixovirus (virus de la parotiditis o paperas), del gen 5'UTR de Enterovirus, y del gen 5'UTR de Parechovirus. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada

durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los *primers*, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Tras la reacción de amplificación, el virus de la parotiditis se detecta en el canal FAM, Parechovirus se detecta en el canal ROX, Enterovirus se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado) y el Control Interno se detecta en el canal Cy5.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional

sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis ha sido testado en muestras de hisopos (vesículas, piel cutánea, boca, saliva, lesiones/úlceras en mucosas (para el virus de la parotiditis y enterovirus)), muestras de hisopos nasofaríngeos y de plasma (para el virus de la parotiditis), y en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) (para enterovirus). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras deben transportarse a la temperatura recomendada de -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse entre 2°C y 8°C hasta 5 días o pueden congelarse a -20°C o menos (-80°C idealmente) para un tiempo prolongado. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

- García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras de Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Canton Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

Extracción de RNA

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

NucliSENS® eMAG® (Biomérieux)

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Entero+Parecho+Parotitis Positive Control (tubo rojo) con 100 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 para cada uno de los ensayos).
- 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) o 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
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Virus de la Parotiditis ROX (Parechovirus), Cy5 (Control Interno) y HEX, JOE o VIC (Enterovirus). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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 (Ct \leq 40) en el canal FAM, HEX y ROX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct $>$ 40 o no señal) en el canal FAM, HEX y ROX.

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

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

Entero + Parecho + Parotitis				Interpretación
Virus de la Parotiditis (FAM)	Enterovirus (HEX)	Parechovirus (ROX)	Control Interno (Cy5)	
+	-	-	+/- 1	RNA del Virus de la Parotiditis detectado
-	+	-	+/- 1	RNA de Enterovirus detectado
-	-	+	+/- 1	RNA de Parechovirus detectado
+	+	-	+/- 1	RNA del Virus de la Parotiditis y de Enterovirus detectado
+	-	+	+/- 1	RNA del Virus de la Parotiditis y de Parechovirus detectado
-	+	+	+/- 1	RNA de Enterovirus y Parechovirus detectado
+	+	+	+/- 1	RNA de todas las dianas detectado
-	-	-	+ ²	RNA molde diana no Detectado ²
-	-	-	- ²	Test fallido ²

¹En 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

²En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35 del control interno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa

de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de RNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

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 evaluar la sensibilidad y especificidad clínica se llevaron a cabo dos estudios. En un primer estudio (1) se analizaron 48 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y en un segundo estudio (2) se analizaron 111 muestras de hisopos (vesículas, piel cutánea, boca lesiones/úlceras de mucosas, boca-saliva).

En ambos estudios la extracción se realizó con el kit MagDEA Dx SV y magLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) y se analizaron con el kit de Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis con DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) en el primer estudio y con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) en el segundo.

Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis fueron comparados con los resultados obtenidos con los métodos moleculares rutinarios del hospital de tercer nivel donde fueron recolectadas, en el primer estudio y Eurofins Biomnis y Cerba Xpert en el segundo; se muestran en la siguiente tabla:

	Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
1	Enterovirus	3	45	0	0	1 (0.29 – 1)	1 (0.92 – 1)	1 (0.29 – 1)	1 (0.92 – 1)
2	Virus de la Parotiditi	4	107	0	0	1 (0.39 – 1)	1 (0.96 – 1)	1 (0.39 – 1)	1 (0.96 – 1)
	Enterovirus	13	98	0	0	1 (0.75 – 1)	1 (0.96 – 1)	1 (0.75 – 1)	1 (0.96 – 1)

TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo.

En conclusión, los resultados muestran una alta concordancia para detectar estos patógenos utilizando Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de cDNA por reacción para el Virus de la Parotiditis Enterovirus y Parechovirus (tasa positividad $\geq 95\%$).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los diferentes patógenos, asociados a enfermedades en pacientes inmunodeprimidos, fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies, excepto con los patógenos Diana que detecta cada ensayo.

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Epstein-Barr virus	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
Adenovirus tipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> q885652	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
BK Virus tipos Ib-2 y IV	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) cepa MacIntyre	-	Virus de la Encefalitis San Luis	-
<i>Candida albicans</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) MS	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Chikungunya S27 Petersfield	-	Herpesvirus humano 6 (HHV6) cepa Z29	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	-
Cytomegalovirus AD-169	-	Herpesvirus humano 6 (HHV6) Tipo A	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	-	Herpesvirus humano 6 (HHV6) Tipo B	-	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas cepa Neudorfl	-
Dengue serotipo 1 Hawaii A	-	JC Virus Tipo 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> tipo II	-
Dengue serotipo 2 Nueva Guinea C	-	JC Virus Tipo 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Dengue serotipo 3 H87	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Virus Varicella-Zoster OKA	-
Dengue serotype 4 H241	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	Virus Varicella-Zoster 9/84	-
Virus de la Encefalitis Japonesa	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>Ivanovii</i> serovar 5	-	Virus Varicella-Zoster Ellen	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	Virus del Nilo Occidental Heja	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 1/2b	-	Virus del Nilo Occidental NY99	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	Virus del Sarampión	-	Virus del Nilo Occidental Ug37	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	Parvovirus B19	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis para el Virus de las Paperas se evaluó utilizando RNA extraído del Virus de la Parotiditis cepa Enders (como modelo), mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis para Enterovirus se evaluó utilizando RNA extraído de las siguientes cepas (como modelo), mostrando resultados positivos:

Enterovirus Echovirus tipos 6, 7, 11, 18, 25, 30, Echovirus humano 4 cepa Pesascek

Enterovirus tipos 68, D68, D68 B3, 71 y A71

Enterovirus Coxsackievirus tipos A4, A9, A16, A21, A24, B3 y B4

Coxsackievirus humano B1 cepa Conn-5

Enterovirus D68 cepa US/MO/14-18949

La reactividad de Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis para Parechovirus se evaluó utilizando RNA extraído de las siguientes cepas (como modelos) mostrando resultados positivos:

Parechovirus tipos 1, 2, 3, 4 y 6

Parechovirus humano 1, cepa Harris

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen).
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

¹: 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 validado con RNA extraído de muestras de hisopos (vesículas, piel cutánea, boca, saliva, lesiones/úlceras de mucosas (para paperas y enterovirus)), de hisopos nasofaríngeos y muestras de plasma (para

paperas), y de LCR (para enterovirus). El uso de otras muestras no se ha establecido y han de ser validadas por el usuario.

- 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- 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 resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el Entero+Parecho+Parotitis positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de RNA); c) Degradación del RNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana del Virus de la Parotiditis, Enterovirus y/o Parechovirus identificadas por este test que pueden provocar que el RNA sea indetectable; e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del RNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que sean el agente causante de los síntomas clínicos.
- Resultados negativos no impiden la infección por el Virus de la Parotiditis, Enterovirus y/o Parechovirus y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar las bacterias.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con el Virus de la Parotiditis, Enterovirus y/o Parechovirus, y se han descartado otras infecciones bacterianas y/o infecciones multirresistentes o colonizaciones, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

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
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler @96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ABI PRISM 7000 ⁽⁴⁾
ABI PRISM 7700 ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Analytik Jena
qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96 ⁽¹⁾

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler® or Rotor-Gene® Q.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. 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 siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". 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	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTiite 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

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis allows the qualitative detection and identification of RNA from Mumps virus (Parotitis), Enterovirus and/or Parechovirus by Real-Time RT-PCR in clinical samples from patients with suspect of Mumps, Enterovirus and/or Parechovirus viral infection by their healthcare professional. This product is intended to aid in the Mumps virus, Enterovirus and/or Parechovirus infections diagnosis, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis

4x8-well strip, low profile

7041075

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis

4x8-well strip, high profile

7042075

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S075/ 7042S075	Entero+Parecho+Parotitis strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C075	Entero+Parecho+Parotitis Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. 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

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Paramyxovirus (Mumps virus)

Mumps is a viral infection caused by a Paramyxovirus, which is a single-stranded RNA, linear non-segmented virus.

Humans are the only known hosts for the virus which causes mumps. The virus can be transmitted in saliva from 3 days before parotitis starts to 9 days after. Direct contact with respiratory secretions, saliva or fomites can spread mumps. That is why outbreaks usually occur among people in close contact, such as college dorms or sports teams. It usually affects young adults, likely related to imperfect vaccination effectiveness.

Fever, myalgias, anorexia, malaise, headache, and nonspecific upper respiratory symptoms are the symptoms that people with parotitis often manifest. But the most characteristic presentation is unilateral or bilateral swelling of the parotid glands.

The measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine was introduced in 1967 and reported cases of mumps have decreased since then. Nowadays, it is recommended that children receive their first dose at age 12-15 months and the second at age 4-6 years. However, the number of outbreaks has increased over the last decade in New York, United Kingdom, and California, among other places.

The detection of mumps antibody alone is not enough to diagnose mumps, the use of RT-PCR can reveal more details about viral strains because it is an extremely sensitive tool.

Parechovirus and Enterovirus

Parechovirus and Enterovirus belong to the Picornaviridae family, which is one of the largest RNA virus families and contains an array of pathogens that infect both humans and animals. Their members are small, non-enveloped viruses containing a single-stranded ribonucleic acid (RNA). The genus Enterovirus (EV) is divided into 12 species (EV A-J and Rhinovirus A-C). EV A, B, C and D are found in human, and the rest of them

in animals. EV-A consist of 25 types, EV-B 63 of types, EV-C 23 of types and EV-D of 5 types. The genus Parechovirus is divided into 2 species (Parechovirus A and B). The species Parechovirus A consists of 16 types which infect humans, HPeV-1 to HPeV-16, whereas Parechovirus B consists of 4 types which infect rodents.

Transmission of Enterovirus occur through the fecal-oral, transplacental pathways, and respiratory droplets. Children, especially neonates and babies, are at high risk for developing aseptic meningitis due to Enterovirus and Parechovirus. While EV infections commonly affect older children and adults, HPeV infections in these populations are uncommon.

EVs can cause wide range of symptoms, from less serious respiratory and gastrointestinal conditions such as herpangina, and hand-foot-and-mouth disease, to more serious ones like pleurodynia, hepatitis, paralysis, among others.

For HPeV, HPeV-1 is the most prevalent type, and it mainly causes mild gastrointestinal and respiratory disease although more serious disease can occasionally be seen in young children. HPeV are the second most important cause of viral sepsis-like illness and meningitis in infants, both of which are mostly caused by HPeV-3 which is the most pathogenic HPeV type.

Nowadays, the gold standard for diagnosis of their infections is RT-qPCR, which has been demonstrated to be more accurate than viral culture in detection both EV and HPeV RNA.

Principle of the test

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis is based on the real-time amplification of a conserved region of *F* (Fusion Protein) gene of Mumps virus, *5'UTR* gene of Enterovirus, and *5'UTR* gene of Parechovirus. After RNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. After the amplification reaction, Mumps virus is detected in FAM channel, Parechovirus is detected in ROX channel, Internal Control is detected in Cy5 channel, and the Enterovirus is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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 is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis has been tested swabs specimens (vesicles, cutaneous skin, mouth, saliva, mucosal ulcer lesions (for mumps virus and enterovirus detection, in nasopharyngeal swabs and plasma samples (for mumps virus detection), and in cerebrospinal fluid (CSF) (for enterovirus detection). Swabs specimens were collected in M4RT (Viral Transport Media) or in Cobas® PCR Media Dual Swab Sample Kit. Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be processed immediately or transported at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for a long time. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras de Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Canton Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

RNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical samples, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)

NucliSENS® eMAG® (Biomérieux).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Entero+Parecho+Parotitis Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots 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 to 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 for each assay.
- 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 (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- 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
Polymerase activation	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 (Mumps virus), ROX (Parechovirus), Cy5 (Internal Control), and HEX, JOE, or VIC (Enterovirus). Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) in FAM, ROX, and HEX channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM, ROX, and HEX channels.

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

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

Entero + Parecho + Parotitis				Interpretation
Mumps virus (FAM)	Enterovirus (HEX)	Parechovirus(ROX)	Internal Control (Cy5)	
+	-	-	+/- ¹	Mumps virus RNA Detected
-	+	-	+/- ¹	Enterovirus RNA Detected
-	-	+	+/- ¹	Parechovirus RNA Detected
+	+	-	+/- ¹	Mumps virus and Enterovirus RNA Detected
+	-	+	+/- ¹	Mumps virus and Parechovirus RNA Detected
-	+	+	+/- ¹	Enterovirus and Parechovirus RNA Detected
+	+	+	+/- ¹	All targets' RNA Detected
-	-	-	+ ²	Targets not detected ²
-	-	-	- ²	Failed test

¹ Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

² In the case of negative pathogens target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is a signal' absence or Ct value >35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated RNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

To assess clinical sensitivity and specificity, two studies were conducted. In a first study (1), 48 cerebrospinal fluid (CSF) samples were analysed and in a second study (2) 111 swab samples (vesicles, cutaneous-skin, mouth, mucosal ulcer/lesions, mouth-saliva) were analysed.

In both studies the extraction was performed with the MagDEA Dx SV kit and magLEAD® 12 gC instrument (Precision System Science Co.) and analysed with the Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis kit with DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) in the first study and with CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) in the second study.

The Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis kit's results were compared with the results obtained with the routine molecular methods used in the third level hospital where samples collected in the first study and Eurofins Biomnis and Cerba Xpert in the second study; the obtained results are shown in the following tables.

	Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
1	Enterovirus	3	45	0	0	1 (0.29 – 1)	1 (0.92 – 1)	1 (0.29 – 1)	1 (0.92 – 1)
2	Mumps Virus	4	107	0	0	1 (0.39 – 1)	1 (0.96 – 1)	1 (0.39 – 1)	1 (0.96 – 1)
	Enterovirus	13	98	0	0	1 (0.75 – 1)	1 (0.96 – 1)	1 (0.75 – 1)	1 (0.96 – 1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

In conclusion, the results show a high concordance to detect those pathogens using Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10⁷ to 10¹ copies/reaction. This assay has a detection limit of 10 cDNA copies per reaction for Mumps virus, Enterovirus and Parechovirus (positive rate ≥ 95%).

Analytical specificity

The analytical specificity for the different pathogen detection associated to diseases in immunosuppressed patients, was tested within the panel of following microorganisms:

Cross-reactivity testing					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Epstein-Barr virus	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-
Adenovirus types 1, 2, 3, 4, 5, 8, 15,31,40 and 41	-	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Hepatitis A virus	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
BK Virus types Ib-2 and IV	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) strain MacIntyre	-	St Louis Encephalitis Virus	-
<i>Candida albicans</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) MS	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Chikungunya S27 Petersfield	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Strain Z29	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	-
Cytomegalovirus AD-169	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type A	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type B	-	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorf1	-
Dengue serotype 1 Hawaii A	-	JC Virus Type 1A	-	<i>Toxoplasma gondii</i> type II	-
Dengue serotype 2 New guinea C	-	JC Virus Type 2B	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Dengue serotype 3 H87	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Varicella-Zoster Virus OKA	-
Dengue serotype 4 H241	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	Varicella-Zoster Virus 9/84	-
Japanese Encephalitis virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>Ivanovii</i> serovar 5	-	Varicella-Zoster Virus Ellen	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	West Nile virus Heja	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 1/2b	-	West Nile virus NY99	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	Measles virus	-	West Nile virus Ug37	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	-	Parvovirus B19	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis kit's reactivity for Mumps virus was evaluated against extracted RNA from Mumps virus strain Enders (as template), showing positive results.

The Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis kit's reactivity for Enterovirus was evaluated against extracted RNA from the following strains (as template), showing positive results:

Enterovirus Echovirus Types 6, 7, 11, 18, 25, 30, Human Echovirus 4 strain Pesascek

Enterovirus types 68, D68 B3, 71 and A71

Enterovirus Coxsackievirus types A4, A9, A16, A21, A24, B3 and B4

Human Coxsackievirus B1 strain Conn-5

Enterovirus D68 strain US/MO/14-18949

The Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis kit's reactivity for Parechovirus was evaluated against extracted RNA from the following strains (as template), showing positive results:

Parechovirus types 1, 2, 3, 4, 6

Human Parechovirus 1 strain Harris

Compatible real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Entero + Parecho + Parotitis has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommended placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with RNA extracted from swabs specimens (vesicles, cutaneous skin, mouth, saliva, mucosal ulcer/lesions (for mumps and enterovirus)), from nasopharyngeal swabs and plasma samples (for mumps), and from CSF (for enterovirus). The use of other samples has not been established and must be validated by the user.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 either by Entero+Parecho+Parotitis Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including RNA isolation); c) RNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the Mumps virus, Enterovirus and/or Parechovirus, covered by this test which may result in RNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of RNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that these are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude Mumps virus, Enterovirus and/or Parechovirus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible Mumps virus, Enterovirus and/or Parechovirus infection, and other

bacterial infections and/or multi-resistant infection or colonization have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.

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 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽⁴⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) 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:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	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	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the 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	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTIite 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

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










Bibliography/Bibliografía

- de Crom, S. C., Rossen, J. W., van Furth, A. M., & Obihara, C. C. (2016). Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *European journal of pediatrics*, 175(8), 1023–1029.
- Bockelman, C., Frawley, T. C., Long, B., & Koyfman, A. (2018). Mumps: An Emergency Medicine-Focused Update. *The Journal of emergency medicine*, 54(2), 207–214.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

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

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro 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
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

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

www.vitassay.com