

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus

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

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-AMB106L
VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-AMB106H
VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-AMB112L
VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-AMB112H
VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-AMB113L
VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-AMB113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification and differentiation of human Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Adenovirus, Metapneumovirus and/or Bocavirus in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA/DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus.

2. Summary and Explanation

Adenoviruses belong to the *Adenoviridae* family of non-enveloped and double-stranded (dsDNA) viruses. There are more than 50 immunologically distinct human Adenovirus serotypes classified into 6 species (Adenovirus-A to Adenovirus-F) that can cause human infections ranging from respiratory disease (mainly species Adenovirus-B and C), and conjunctivitis (Adenovirus-B and D), to gastroenteritis (Adenovirus-F serotypes 40 and 41). Adenoviruses can be spread due to close personal contact or air transmission by coughing and sneezing. Manifestations of respiratory infections include common cold, fever, sore throat (pharyngitis), bronchitis and pneumonia.

Human Metapneumoviruses, belong to the *Paramyxoviridae* family and are an important cause of upper and lower respiratory infection. Metapneumovirus is an enveloped, single-stranded, negative-sense RNA virus. Clinical symptoms of Metapneumovirus include cough, fever, nasal congestion, and shortness of breath, and may progress to bronchiolitis or pneumonia. Metapneumovirus is mainly transmitted by infectious airborne droplets, and it has been reported as the second most frequently found virus in respiratory infections, with children younger than five years being the most susceptible to infection.

Human Bocaviruses belong to the *Parvoviridae* family and are believed to be important causative agents of upper and lower respiratory tract infections in young children. Bocaviruses are small non-enveloped single-stranded DNA viruses that contain a genome of about 5.3 kb. Bocaviruses are highly prevalent in co-infections with other pathogens. Clinical manifestations range from mild upper respiratory tract infections to bronchiolitis, and lower respiratory tract diseases, such as pneumonia. The common symptoms are fever, cough, acute otitis media, tonsillitis and conjunctivitis, sinusitis, and rhinorrhea.

Diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of Adenovirus, Metapneumovirus and/or Bocavirus in respiratory samples. After DNA isolation, the identification of Adenovirus and Bocavirus is performed by the amplification of a conserved region of the *hexon* gene

(Adenovirus) and the *NS1* gene (*Bocavirus*) using specific primers and a fluorescent-labelled probe. After RNA isolation, the detection of Metapneumovirus is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of *N* gene of Metapneumovirus.

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on real time PCR platforms.

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection* Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Adenovirus DNA targets are amplified and detected in channel FAM, Metapneumovirus RNA in channel ROX, Bocavirus DNA in channel Cy5 and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-AMB1SL/ VS-AMB1SH	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-AMB1C	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Water RNase/DNase free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit with Ref: VS-AMB106L, VS-AMB106H, VS-AMB112L and VS-AMB112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-AMB1PL/ VS-AMB1PH	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-AMB1C	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Water RNase/DNase free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-AMB113L and VS-AMB113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- RNA/DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.

- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. RNA/DNA EXTRACTION

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

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

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

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

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

8.3. PCR PROTOCOL

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

1) Reconstitute the number of wells you need.

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

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

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

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Adenovirus), ROX (Metapneumovirus), Cy5 (Bocavirus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

9. Result interpretation

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

Using the following table read and analyze the results:

Adenovirus (FAM)	Metapneumovirus (ROX)	Bocavirus (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus Positive
-	-	-	+	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus Negative
+	-	-	+/-	-	+	Adenovirus Positive, Metapneumovirus and Bocavirus Negative
+	+	-	+/-	-	+	Adenovirus and Metapneumovirus Positive, and Bocavirus Negative
+	-	+	+/-	-	+	Adenovirus and Bocavirus Positive, and Metapneumovirus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Metapneumovirus Positive, Adenovirus and Bocavirus Negative
-	+	+	+/-	-	+	Metapneumovirus and Bocavirus Positive, Adenovirus Negative
-	-	+	+/-	-	+	Bocavirus Positive, Adenovirus and Metapneumovirus Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

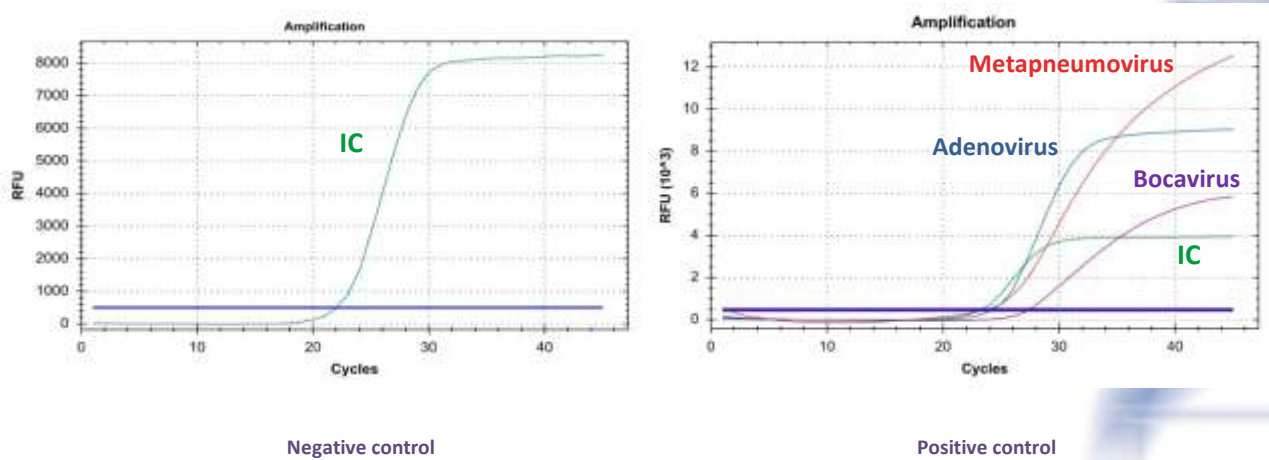
+: Amplification curve

-: No amplification curve

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

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

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



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

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

10. Limitations of the test

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The clinical performance of VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit was tested using 138 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by molecular detection method (FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)).

The results were as follows:

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	67	1*	68
	-	2*	72	74
Total	69	73	142	

Table 5. Comparative results for Adenovirus.

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

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	37	2*	39
	-	0	103	103
Total	37	105	142	

Table 6. Comparative results for Metapneumovirus.

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

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	34	0	34
	-	3*	105	108
Total	37	105	142	

Table 7. Comparative results for Bocavirus.

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

The results show a high sensitivity and specificity to detect Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus using VIASURE Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus (Figure 2, 3 and 4).

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

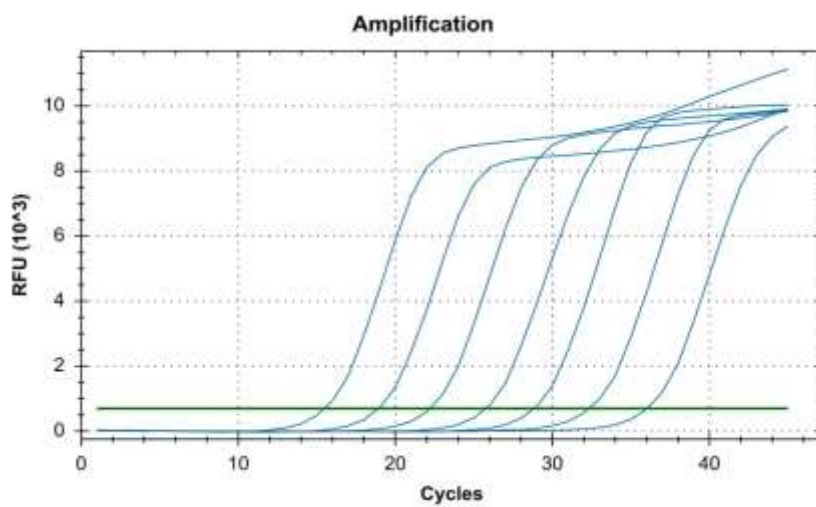


Figure 3. Dilution series of Metapneumovirus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

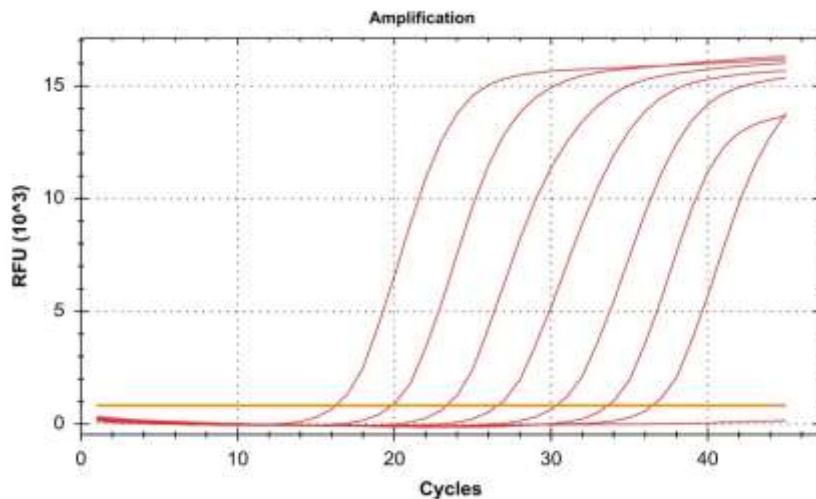
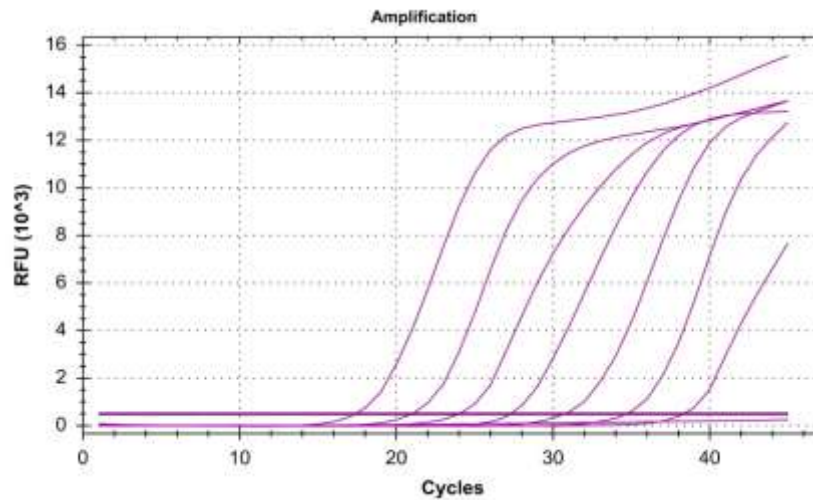


Figure 4. Dilution series of Bocavirus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus. assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens.

No cross-reactivity of Adenovirus was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human bocavirus	-

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of Metapneumovirus was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human adenovirus	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human bocavirus	-

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study

No cross-reactivity of Bocavirus was detected against any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human coronavirus 229E	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Human adenovirus	-

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit for Adenovirus was evaluated against Human Adenovirus showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit for Metapneumovirus was evaluated against Human Metapneumovirus genotype A and Human Metapneumovirus genotype B, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit for Bocavirus was evaluated against Human Bocavirus showing positive results.

ANNEX 1:

COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

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

* The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

ANNEX 2:

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 Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
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	
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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus humanos en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA/DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus.

2. Introducción y explicación

Los Adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* de virus no encapsulados de DNA bicatenario (dsDNA). Existen más de 50 serotipos inmunológicamente diferenciados de Adenovirus humanos agrupados en 6 especies (AdVH-A hasta AdVH-F) que pueden causar infecciones en seres humanos que van desde enfermedades respiratorias (principalmente AdVH-B y C), y conjuntivitis (AdVH-B y D), hasta gastroenteritis (serotipos AdVH-F 40 y 41). Los Adenovirus pueden transmitirse a través del contacto entre personas o por vía aérea debido a toses y estornudos. Los síntomas de las infecciones respiratorias incluyen síntomas catarrales, fiebre, dolor de garganta (faringitis), bronquitis y neumonía.

Los Metapneumovirus humanos pertenecen a la familia *Paramyxoviridae* y son una importante causa de infección respiratoria en tracto superior e inferior. El Metapneumovirus es un virus encapsulado de RNA monocatenario de sentido negativo. Los síntomas clínicos incluyen tos, fiebre, congestión nasal, dificultad para respirar, y pueden derivar a bronquiolitis o neumonía. El Metapneumovirus se transmite principalmente a través de gotas aéreas infecciosas, y se considera el segundo virus más frecuente en infecciones respiratorias, siendo los niños menores de 5 años los más susceptibles a la infección.

El Bocavirus humano pertenece a la familia *Parvoviridae* y se consideran un importante agente causal de infecciones del tracto respiratorio en niños pequeños. Los bocavirus son pequeños virus no encapsulados de DNA monocatenario que contienen un genoma de unas 5.3 kb. Los Bocavirus presentan alta prevalencia en coinfecciones con otros patógenos. Las manifestaciones clínicas varían desde infecciones leves del tracto respiratorio superior a bronquiolitis, y enfermedades de las vías respiratorias inferiores, como la neumonía. Los síntomas más comunes son fiebre, tos, otitis media, amigdalitis y conjuntivitis agudas, sinusitis y rinorrea.

El diagnóstico clínico puede ser problemático, ya que un gran número de agentes patógenos causales de infecciones respiratorias agudas dan lugar a cuadros clínicos similares. La PCR a Tiempo Real es el método de diagnóstico de Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus preferentemente utilizado al ser una de las herramientas diagnósticas más sensibles y específicas.

3. Procedimiento

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus en muestras respiratorias. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de Adenovirus y Bocavirus se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen *hexon* (Adenovirus) y del gen *NS1* (Bocavirus). Tras el aislamiento de RNA, la detección de Metapneumovirus se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa seguida de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen *N* de Metapneumovirus.

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

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, Adenovirus se detecta en el canal FAM, Metapneumovirus se detecta en el canal ROX, Bocavirus se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-AMB1SL/ VS-AMB1SH	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-AMB1C	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-AMB106L, VS-AMB106H, VS-AMB112L, VS-AMB112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-AMB1PL/ VS-AMB1PH	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-AMB1C	<i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-AMB113L y VS-AMB113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de RNA/DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL .
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).

- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

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

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

8. Procedimiento del test

8.1. EXTRACCIÓN DE RNA/DNA

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- RIDA® Xtract (r-Biopharm).

- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado COBAS® AmpliPrep (ROCHE).

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

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

8.3. PROTOCOLO PCR

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

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Adenovirus*, *Metapneumovirus* & *Bocavirus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

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

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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Adenovirus*), ROX (*Metapneumovirus*), Cy5 (*Bocavirus*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

Adenovirus (FAM)	Metapneumovirus (ROX)	Bocavirus (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus Positivos
-	-	-	+	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Adenovirus Positivo Metapneumovirus y Bocavirus Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Adenovirus y Metapneumovirus Positivos, y Bocavirus Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Adenovirus y Bocavirus Positivos, y Metapneumovirus Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Metapneumovirus Positivo, Adenovirus y Bocavirus Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Metapneumovirus y Bocavirus Positivos, Adenovirus Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Bocavirus Positivo, Adenovirus y Metapneumovirus Negativos
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

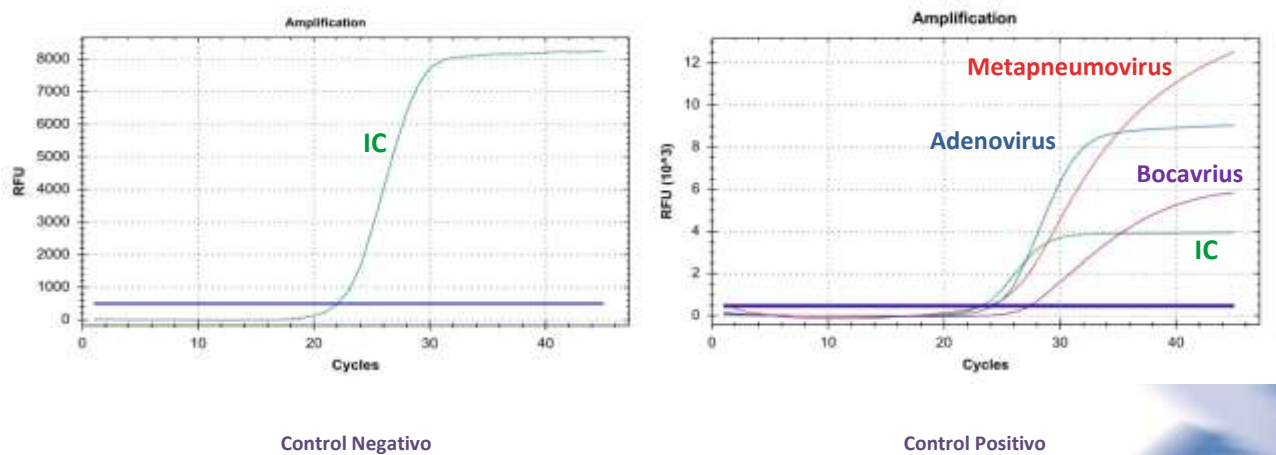
+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

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

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

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



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

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

10. Limitaciones del test

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

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

Se evaluaron 138 muestras respiratorias (frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (FTD *Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus* (Fast-Track)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus</i> (Fast-Track)			Total
		+	-	
	+	67	1*	68
	-	2*	72	74
Total	69	73	142	

Tabla 5. Comparativa de resultados para *Adenovirus*.

* La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus</i> (Fast-Track)			Total
		+	-	
	+	37	2*	39
	-	0	103	103
Total	37	105	142	

Tabla 6. Comparativa de resultados para *Metapneumovirus*.

* La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

VIASURE <i>Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus</i> (Fast-Track)			Total
		+	-	
	+	34	0	34
	-	3*	105	108
Total	37	105	142	

Tabla 5. Comparativa de resultados para *Bocavirus*.

* La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus utilizando VIASURE Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus (Figura 2, 3 y 4).

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

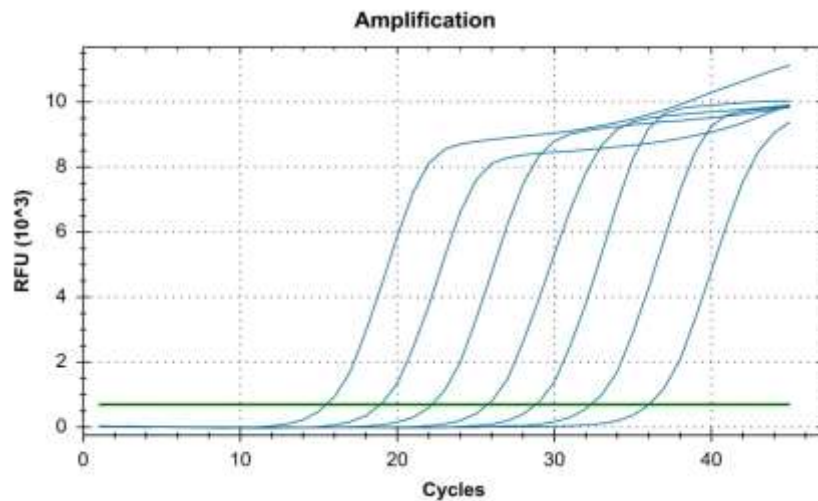


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de Metapneumovirus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

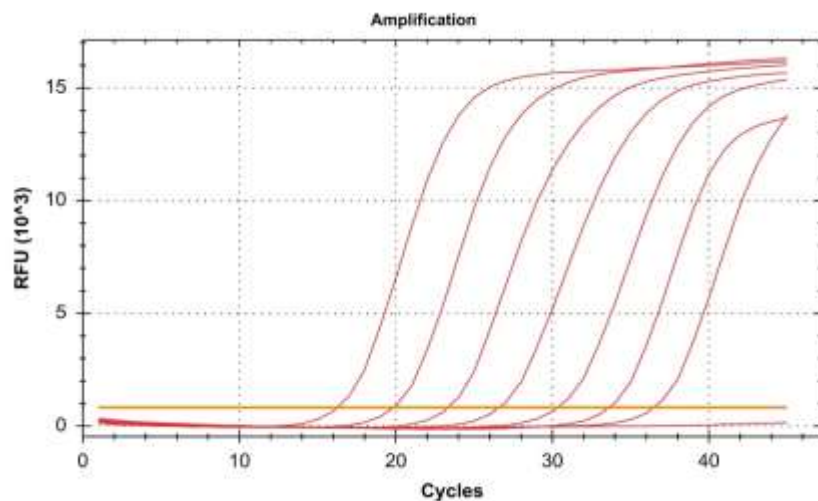
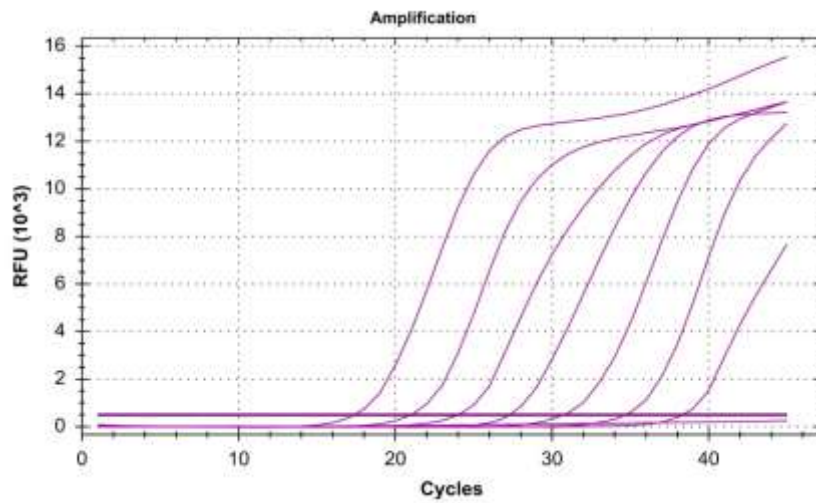


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de Bocavirus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes.

No se detectan reacciones cruzadas de Adenovirus con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Metapneumovirus A y B humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Bocavirus humano	-

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

No se detectan reacciones cruzadas de Metapneumovirus con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Adenovirus humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Bocavirus humano	-

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

No se detectan reacciones cruzadas de Bocavirus con ninguno de los siguientes microorganismos testados

Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	-	Rinovirus humano	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus 229E humano	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Metapneumovirus A y B humano	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	MERS Coronavirus	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	-	Adenovirus humano	-

Tabla 10. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit para Adenovirus se evaluó frente a Adenovirus humano mostrando un resultado positivo.










La reactividad de VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit para Metapneumovirus se evaluó frente a Metapneumovirus humano genotipo A y Metapneumovirus humano genotipo B, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus* Real Time PCR Detection Kit para Bocavirus se evaluó frente a Bocavirus humano, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. A Heim. *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003; 70: 228–239.
2. A Allard. *et al.* Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(2): 498-505.
3. V. Peltota *et al.* Human Bocavirus Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2013; 32 (2): 178-179.
4. V. Babkin *et al.* A study of the human bocavirus replicative genome structures. *Virus Research* 2015; 15: 196-202.
5. X. Deng *et al.* Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *Journal of Virological Methods* 2014; 195: 112–119.
6. W. Shen *et al.* Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1. *Journal of Virology* 2015; 89: 10097-10109.
7. S. Esposito *et al.* Identification of Human Adenovirus in Respiratory Samples with Luminex Respiratory Virus Panel Fast V2 Assay and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Molecular Science* 2016; 17(3):297.
8. J. Klemenc *et al.* Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Improved Detection of Human Metapneumovirus. *Journal of Clinical Virology* 2012; 54(4):371-5.
9. J.E Schuster *et al.* Human Metapneumovirus. *Pediatrics in review* 2013 ; 34(12) : 558-565.
10. S. Panda *et al.* Human Metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International Journal of Infectious Diseases* 2014; 25:45-52.
11. Centers for Disease Control and Prevention.
<https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/Metapneumovirus/clinical.html>

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

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



ANEXO 1:

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

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

* El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

ANEXO 2:

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MAS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500	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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit* has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Real Time PCR Detection Kit* ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene® Q (Qiagen) y SmartCycler® (Cepheid). Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

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



CERTEST BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

www.certest.es

