

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Respiratory Viral Panel I

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

VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-RPA106L
VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-RPA106H
VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-RPA112L
VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-RPA112H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for simultaneous detection of Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial (RSV) viruses and subtyping of Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory viral infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Flu A, Flu B and/or RSV in combination with clinical and epidemiological risk factors and evaluation of infections with Influenza A subtypes: (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Flu A (as well as, (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 subtypes), Flu B and RSV.

2. Summary and Explanation

Influenza virus is an enveloped, single stranded RNA virus that belongs to the *Orthomyxoviridae* family and causes the majority of viral lower respiratory tract infections. Influenza A and B are a significant cause of morbidity and mortality worldwide, considering that elderly and compromised individuals are especially at risk of developing severe illness and complications such as pneumonia. People feel some or all of these symptoms: fever or feeling feverish/chills, cough, sore throat, nasal stuffiness and discharge, myalgia, headaches, and anorexia. The influenza viruses can be spread from person to person in two different ways: through the air (large droplets and aerosols from sneezing and coughing), and by direct or indirect contact.

Influenza A viruses has been classified into subtypes based on the combinations of the envelope proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Currently, influenza A(H1N1) and A(H3N2) are the circulating seasonal influenza A virus subtypes. This seasonal A(H1N1) virus is the same virus that caused the 2009 influenza pandemic. Influenza A(H3N2v) viruses were first detected in people in 2011, being its infections associated with prolonged exposure to pigs at agricultural fairs. Besides, humans can also be infected with avian influenza virus subtypes A(H5N1) and A(H7N9) since their emergence in China in 2003 and 2013, respectively. Influenza A(H5N1) virus has spread from Asia to Europe and Africa, and has become entrenched in poultry populations in some countries. Outbreaks have resulted in millions of poultry infections and several hundred human cases, who often display severe pneumonia and greater than 50% mortality. Avian Influenza A(H7N9) virus spreads faster than H5N1 and commonly resulted in severe respiratory illness, although its mortality rate (20%) is lower than that attributed to H5N1 virus. Whereas, Influenza B is only divided into 2 antigenically and genetically distinct lineages, Victoria and Yamagata.

Human respiratory syncytial viruses (RSV) belong to the *Paramyxoviridae* family and are the most important viral agents of acute respiratory infections. RSV is an enveloped, nonsegmented, negative, single stranded linear RNA genome virus. Respiratory syncytial virus is a common contributor of respiratory infections causing bronchitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages. People often feel some or all of these symptoms: rhinorrhea, low-grade fever, cough, sore throat, headache, and wheezing. RSV is transmitted

via large nasopharyngeal secretion droplets from infected individuals, close contact, or self-inoculation after touching contaminated surfaces.

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 Influenza A, Influenza B and RSV viruses, as well as, of Influenza A subtyping.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of Influenza A, Influenza B, and RSV viruses and subtyping of Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and/or H7N9 in clinical samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of the *M1* gene for Flu A and Flu B and the *N* gene for RSV (Flu A, Flu B & RSV, strip 1), as well as, the *hemagglutinin* gene for subtyping of Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and/or H7N9) (Flu Typing II, strip 2), using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* 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 target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* 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. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of Flu A, Flu B and RSV (VS-ABR1SL/V S-ABR1SH *Flu A, Flu B & RSV* 8-well strips). Influenza A RNA targets are amplified and detected in channel FAM, Influenza B RNA in channel ROX, and RSV RNA in channel Cy5. The second strip contains the multiplex reaction mix for the subtyping of Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and/or H7N9) (VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH *Flu Typing II* 8-well strips). (H1N1)pdm09 RNA targets are amplified and detected in channel FAM, H5N1 RNA in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment), H3N2 RNA in channel ROX, and H7N9 RNA in channel Cy5. The first strip (VS-ABR1SL/V S-ABR1SH *Flu A, Flu B & RSV* 8-well strips) contains an internal control (IC) which is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-ABR1SL/ VS-ABR1SH	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH	<i>Flu Typing II</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-RP01C	Respiratory Viral Panel 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 *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-RPA106L, VS-RPA106H, VS-RPA112L and VS-RPA112H.

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 *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- RNA 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.
- Make sure to use a well for the detection of Flu A, Flu B and RSV and another well for the subtyping assay. Be careful not to mix them throughout the process.

- 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 EXTRACTION

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- 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

Respiratory Viral Panel 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 *Respiratory Viral Panel* 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 for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

1) **Reconstitute the number of wells you need.**

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

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Respiratory Viral Panel* 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 2. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Influenza A and H1N1), HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC) and H5N1), ROX (Influenza B and H3N2), and Cy5 channels (RSV and H7N9). 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 *Respiratory Viral Panel* positive control well. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer’s instructions.

Interpretation of results for VS-ABR1SL/VS-ABR1SH Flu A, Flu B & RSV 8-well strips:

- A sample is considered positive for **Influenza A** if there is an amplification signal in FAM channel, 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 positive for **Influenza B** if there is an amplification signal in ROX channel, 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 positive for **RSV** if there is an amplification signal in CY5 channel, 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 (HEX channel). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control 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.

Interpretation of results for VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH Flu Typing II 8-well strips:

- A sample is considered positive for **(H1N1)pdm09** if there is an amplification signal in FAM channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for **H5N1** if there is an amplification signal in HEX/VIC/JOE channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for **H3N2** if there is an amplification signal in ROX channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for **H7N9** if there is an amplification signal in Cy5 channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Flu A, Flu B & RSV).

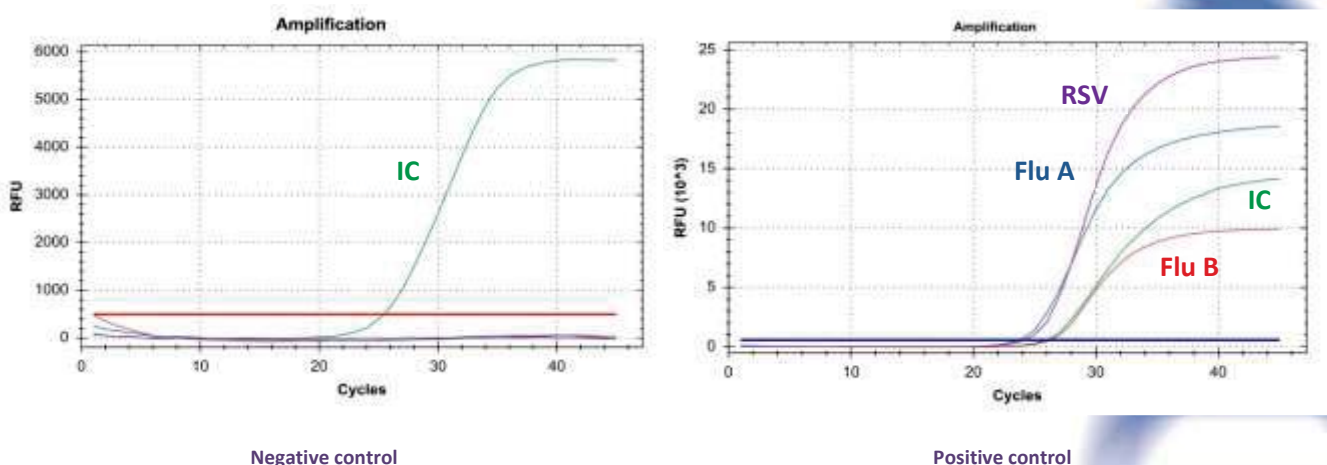
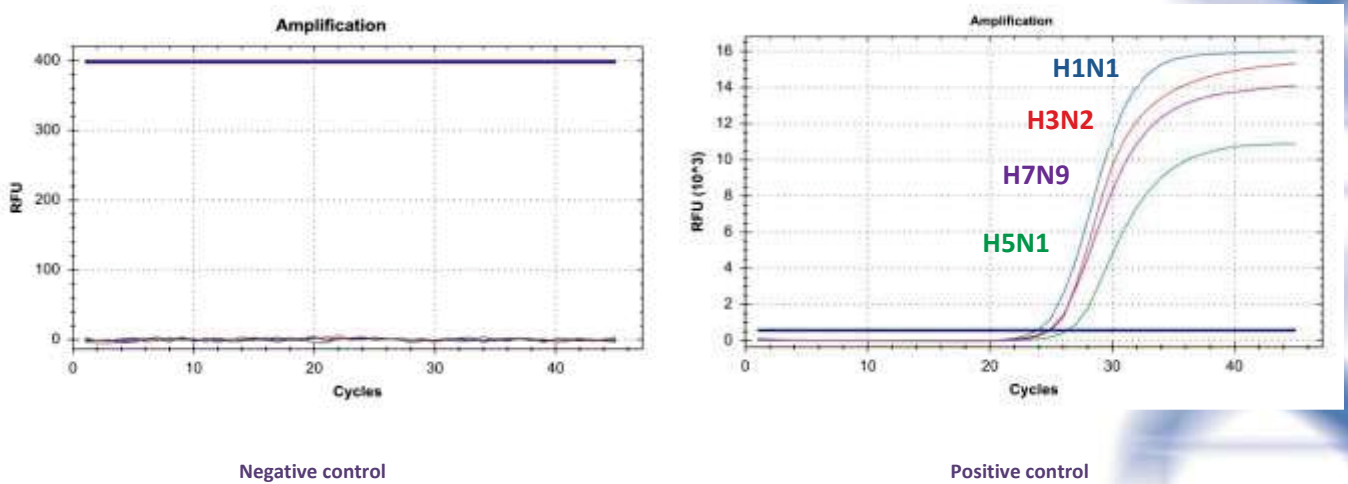


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Flu Typing II).



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 samples dissolved in transport medium.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Respiratory Viral Panel*, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* 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 included in the strip 1 (VS-ABR1SL/Vs-ABR1SH Flu A, Flu B & RSV 8-well strip) confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The clinical performance of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit was tested using 256 or 100 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by molecular detection method (CLART® PneumoVir DNA array” assay (Genomica)).

The results were as follows:

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	105	0	105
	-	2*	149	151
	Total	107	149	256

Table 3. Comparative results for Flu A.

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

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	1*	204	205
	Total	52	204	256

Table 4. Comparative results for Flu B.

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

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	41	0	41
	-	0	215	215
	Total	41	215	256

Table 5. Comparative results for RSV.

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	54	1*	55
	-	5*	40	45
	Total	59	41	100

Table 6. Comparative results for (H1N1)pdm09.

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

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	38	0	38
	-	3*	59	62
	Total	41	59	100

Table 7. Comparative results for H3N2.

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

The results show a high sensitivity and specificity to detect Flu A, Flu B and RSV, as well as, Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2) subtypes using VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 50 RNA copies per reaction for H5N1 (Figure 7) and ≥ 10 RNA copies per reaction for Flu A, Flu B, RSV, (H1N1)pdm09, H3N2 and H7N9 (Figure 3, 4, 5, 6, 8 and 9)

Figure 3. Dilution series of Influenza A (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix Flu A, Flu B & RSV, channel FAM).

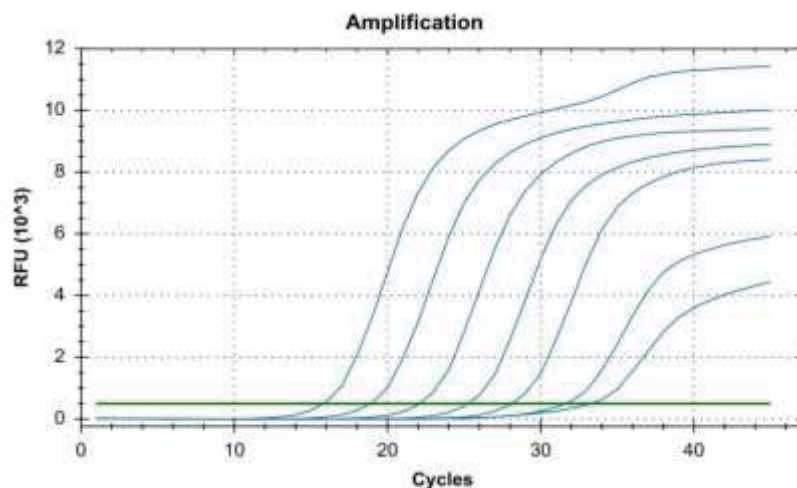


Figure 4. Dilution series of Influenza B (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, channel ROX).

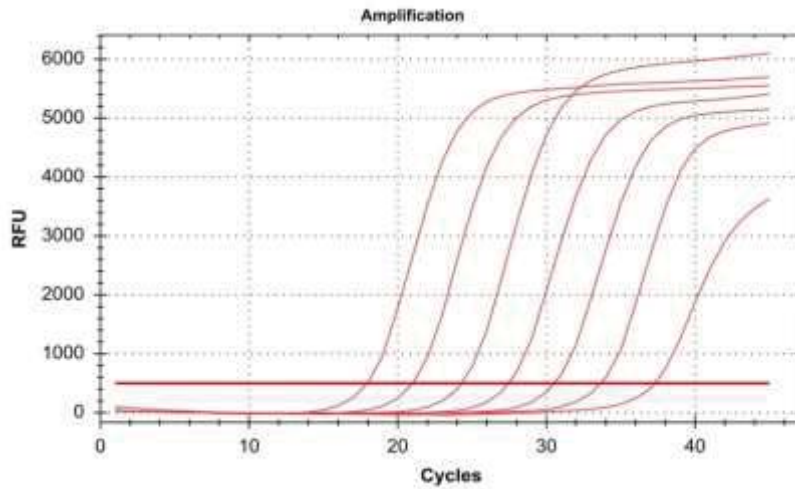


Figure 5. Dilution series of RSV (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, channel Cy5).

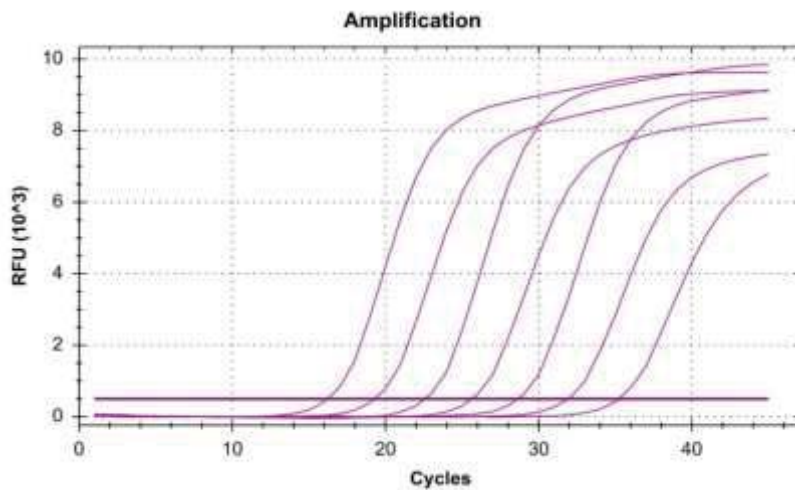


Figure 6. Dilution series of Influenza A(H1N1)pdm09 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel FAM).

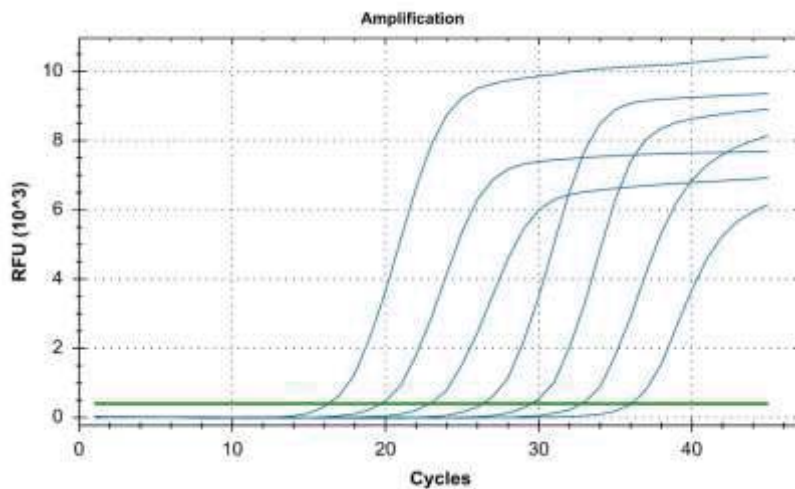


Figure 7. Dilution series of Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel HEX).

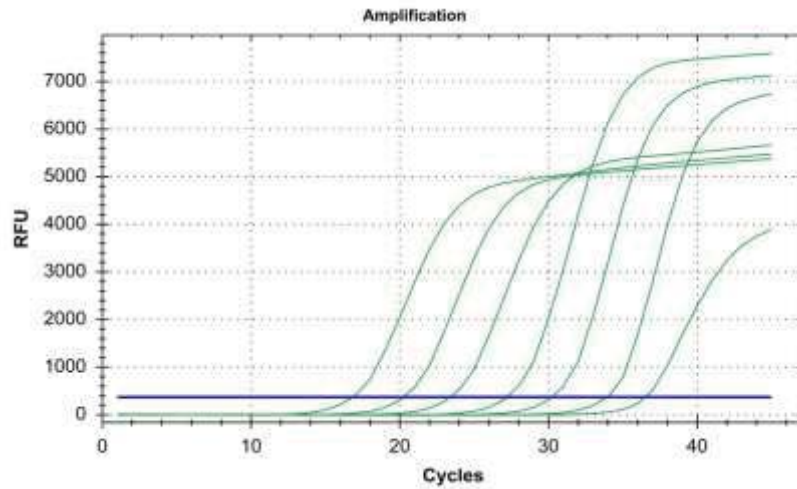


Figure 8. Dilution series of Influenza A(H3N2) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel ROX).

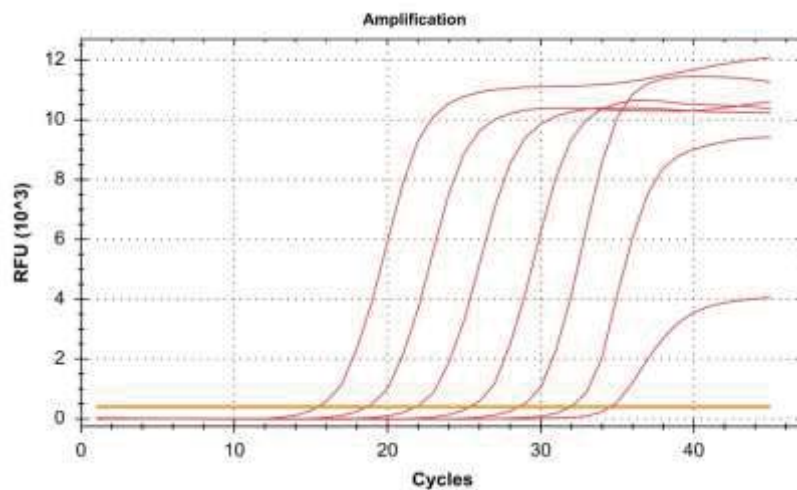
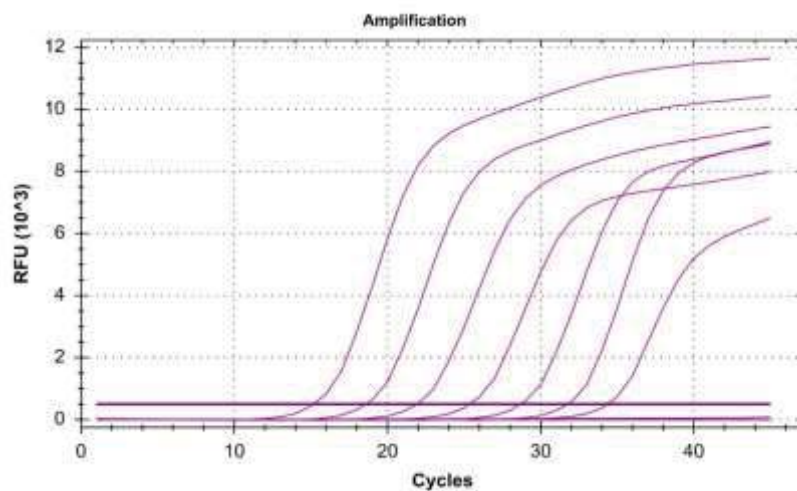


Figure 9. Dilution series of Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel Cy5).



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the Respiratory Viral Panel I assay was confirmed by testing a panel consisting of 27 microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:

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

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit for Flu A was evaluated against strains: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Switzerland/9715293/2013 and A/Turkey/Germany R2485+86/2014 showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit for Flu B was evaluated against strains: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 and B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit for RSV was evaluated against strains: Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) A and B, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H1N1)pdm09 was evaluated against strains: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H3N2) was evaluated against strains: A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus and A/Switzerland/9715293/2013 virus, 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 Cycler
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 Cycler
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 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) y subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 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 Influenza A, Influenza B, y/o RSV en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos y la evaluación de la infección producida por los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9. El RNA es extraído a partir de las muestras respiratorias, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar Influenza A (además de los subtipos (H1N1)pdm09, H5N1, H3N2 y H7N9), Influenza B y RSV.

2. Introducción y explicación

Los virus Influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y causan la mayor parte de las infecciones víricas del tracto respiratorio inferior. Influenza A y B son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, considerando que las personas de edad avanzada y comprometidas están especialmente en riesgo de desarrollar enfermedades graves y complicaciones como la neumonía. Las personas con influenza, sienten alguno o todos estos síntomas: fiebre o sensación febril/escalofríos, tos, dolor de garganta, congestión y secreción nasal, mialgia, dolor de cabeza, y anorexia. El virus influenza se puede transmitir de persona a persona de dos maneras diferentes: a través del aire (gotas y aerosoles que se producen al toser y estornudar), y por contacto directo o indirecto.

Los virus de la influenza A se dividen en subtipos de acuerdo con dos proteínas de la superficie del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Entre los muchos subtipos de Influenza A, en la actualidad están circulando en el ser humano los subtipos A(H1N1) y A(H3N2). El virus A(H1N1) circulante también se denomina A(H1N1)pdm09, dado que causó la pandemia de 2009 y posteriormente sustituyó al virus A(H1N1) estacional que había circulado hasta 2009. El subtipo Influenza A(H3N2) fue identificado en seres humanos por primera vez en el año 2011, relacionándose su infección con la exposición prolongada a cerdos infectados en instalaciones agrarias. En los años 2003 y 2013 se notificaron en China casos de infección en seres humanos con los virus de la gripe aviar Influenza A(H5N1) y A(H7N9). El virus de la gripe A(H5N1) se ha propagado de Asia a Europa y África, y se ha arraigado en las poblaciones de aves de corral en algunos países. Los brotes han producido millones de casos de infección de estos animales, varios cientos de casos en seres humanos, que a menudo muestran neumonía grave, con una tasa de mortalidad superior al 50%. El virus de la gripe aviar A(H7N9) se propaga más rápido que el H5N1 y con frecuencia también resulta en una enfermedad respiratoria grave, en cambio su tasa de mortalidad (20%) es inferior a la atribuida al virus H5N1. En cambio, la gripe B sólo se divide en 2 linajes antigénica y genéticamente distintos, Victoria y Yamagata.

El virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y son los agentes causales virales más importantes de las infecciones respiratorias agudas. RSV es un virus envuelto cuyo genoma consiste

en un RNA monocatenario lineal de sentido negativo (ssRNA-) no segmentado. El virus Respiratorio Sincitial humano es el principal agente causante de infecciones respiratorias como bronquitis, neumonía y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, pudiendo afectar a toda la población en un amplio rango de edad. Los pacientes afectados a menudo sienten algunos o todos estos síntomas: rinorrea, fiebre de bajo grado, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, y sibilancias. RSV se puede transmitir a través de gotitas de secreciones nasales que se expulsan al toser o estornudar. Esas gotas entran en contacto directo o mediante auto-inoculación tras tocar superficies contaminadas con las membranas mucosas de ojos, nariz y boca.

El diagnóstico clínico de estas afecciones puede ser problemático, ya que un gran número de agentes patógenos causan infecciones respiratorias agudas que dan lugar a cuadros clínicos similares. La PCR a Tiempo Real es el método de diagnóstico y subtipaje de Influenza A, Influenza B y RSV preferentemente utilizado al ser una de las herramientas diagnósticas más sensibles y específica.

3. Procedimiento

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de Influenza A, Influenza B y/o RSV y el subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and/or H7N9 en muestras respiratorias. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso 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. Posteriormente la identificación de estos virus se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *M1* para Influenza A y B, y del gen *N* para RSV (*Flu A, Flu B & RSV*, tira 1), además de emplear el gen *hemagglutinin* para el subtipaje de Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9) (*Flu Typing II*, tira 2).

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* 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 *Respiratory Viral Panel I* 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.

Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de Influenza A, Influenza B y/o RSV (VS-ABR1SL/VS-ABR1SH *Flu A, Flu B & RSV* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación, Influenza A se detecta en el canal FAM, Influenza B se detecta en el canal ROX, y RSV se detecta en el canal Cy5. La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para el subtipaje de Influenza A((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9) (VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH *Flu Typing II* 8-well strips). Tras la reacción de amplificación (H1N1)pdm09 se detecta en el canal FAM, H5N1 se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo

utilizado, ver Anexo 2), H3N2 se detecta en el canal ROX y H7N9 se detectan en el canal Cy5. La primera tira (VS-ABR1SL/VS-ABR1SH *Flu A, Flu B & RSV* 8-well strips) contiene el control interno (CI) que se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-ABR1SL/ VS-ABR1SH	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH	<i>Flu Typing II</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-RP01C	Respiratory Viral Panel 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 *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-RPA106L, VS-RPA106H, VS-RPA112L y VS-RPA112H.

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 *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de RNA.
- 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.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para ensayo de detección de Influenza A, B y/o RSV y otro para el ensayo de subtipaje. Tener cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.
- 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

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- 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 *Respiratory Viral Panel* 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 *Respiratory Viral Panel* 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 para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

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

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Respiratory Viral Panel* 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	Etapas	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 2. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Influenza A y H1N1), HEX, JOE o VIC (Control Interno y H5N1), ROX (Influenza B y H3N2), y Cy5 (RSV y H7N9). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

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 del panel de virus respiratorios. 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.

Interpretación de los resultados para VS-ABR1SL/VS-ABR1SH Flu A, Flu B & RSV 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para **Influenza A** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal 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 positiva para **Influenza B** si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal 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 positiva para **RSV** si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal 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.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el 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.

Interpretación de los resultados para VS-HXN1SL/ VS-HXN1SH Flu Typing II 8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para **(H1N1)pdm09** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para **H5N1** si muestra señal de amplificación en el canal HEX/VIC/JOE y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para **H3N2** si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para **H7N9** si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- 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.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

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 (Flu A, Flu B & RSV).

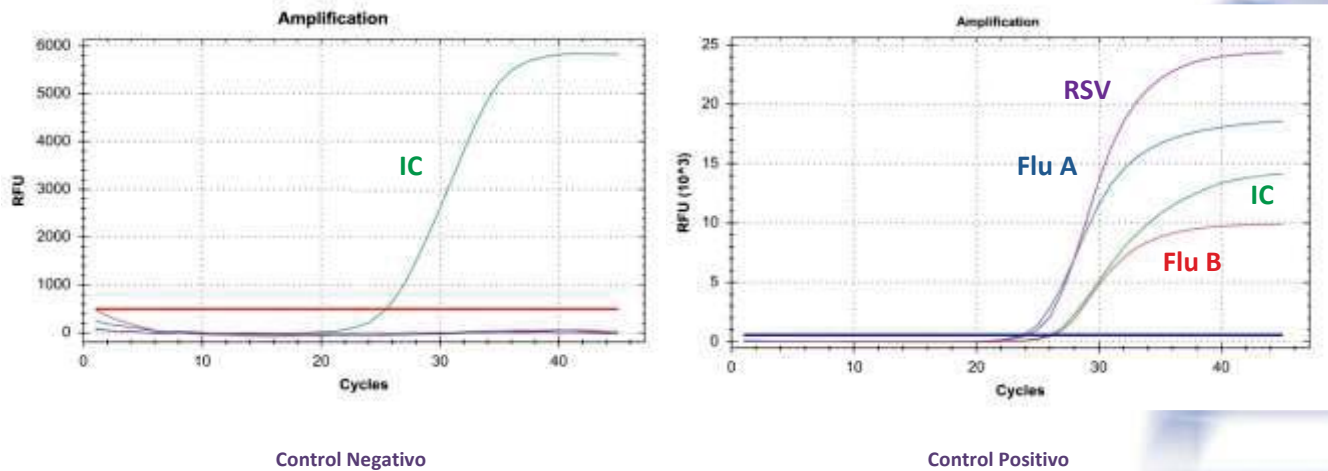
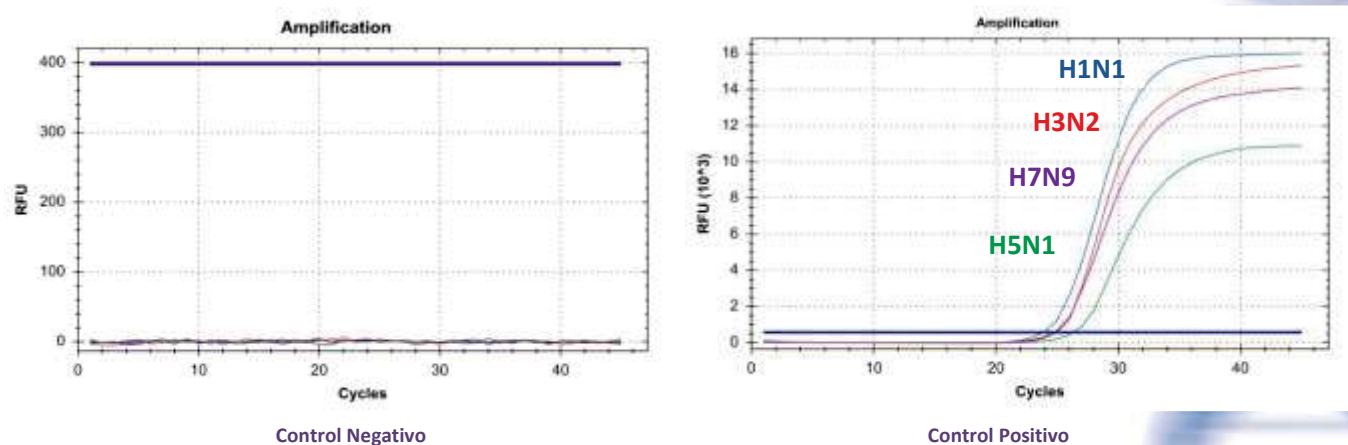


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Flu Typing II).



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 disueltas en medio de transporte.
- 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. 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 virus Influenza A, B y RSV, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* 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 incluido en la tira 1 (VS-ABR1SL/VS-ABR1SH Flu A, Flu B & RSV 8-well strips) confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

Se evaluaron 256 ó 100 muestras respiratorias (frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (CLART®PneumoVir DNA array” (Genómica).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit	CLART®PneumoVir DNA array” (Genómica)			Total
		+	-	
+	105	0	105	
-	2*	149	151	
Total	107	149	256	

Tabla 3. Comparativa de resultados para Influenza A.

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

VIASURE <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit	CLART®PneumoVir DNA array” (Genómica)			Total
		+	-	
+	51	0	51	
-	1*	204	205	
Total	52	204	256	

Tabla 4. Comparativa de resultados para Influenza B.

* La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART®PneumoVir DNA array” (Genomica)			
		+	-	Total
	+	41	0	41
	-	0	215	215
Total	41	215	256	

Tabla 5 Comparativa de resultados para RSV.

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	54	1*	55
	-	5*	40	45
Total	59	41	100	

Tabla 6. . Comparativa de resultados para (H1N1)pdm09.

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

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	38	0	38
	-	3*	59	62
Total	41	59	100	

Tabla 7. . Comparativa de resultados para H3N2.

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

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Influenza A, Influenza B y RSV , al igual que los subtipos de Influenza A(H1N1)pdm09 y A(H3N2); utilizando VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de RNA para H5N1 (Figura 7) y ≥ 10 copias de RNA por reacción para Influenza A y B, (H1N1)pdm09, H3N2 and H7N9 y RSV (Figura 3, 4, 5, 6, 8 and 9).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, canal FAM).

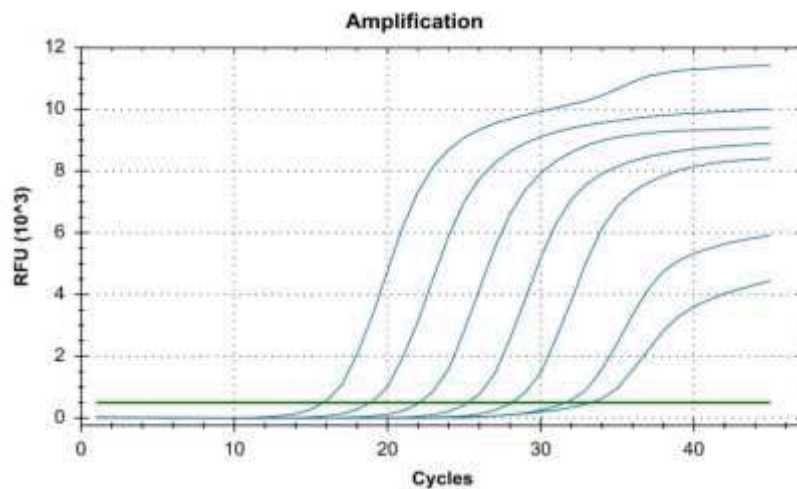


Figure 4. Diluciones seriadas de un estándar Influenza B (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, canal ROX).

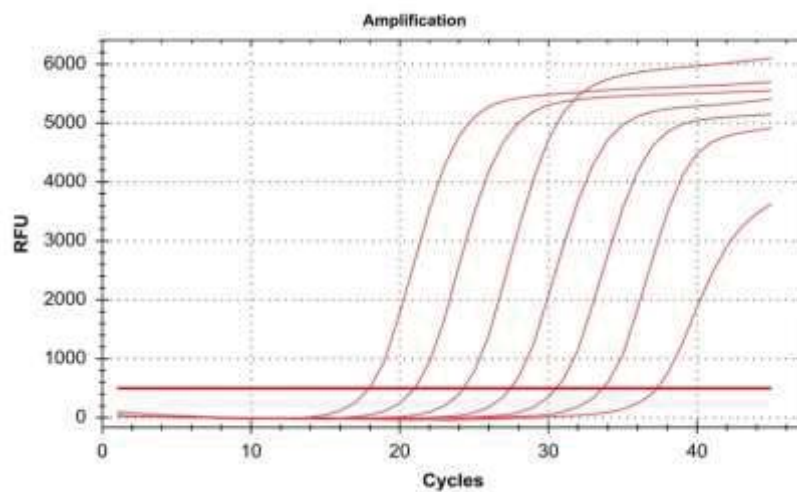


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar RSV (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, canal Cy5).

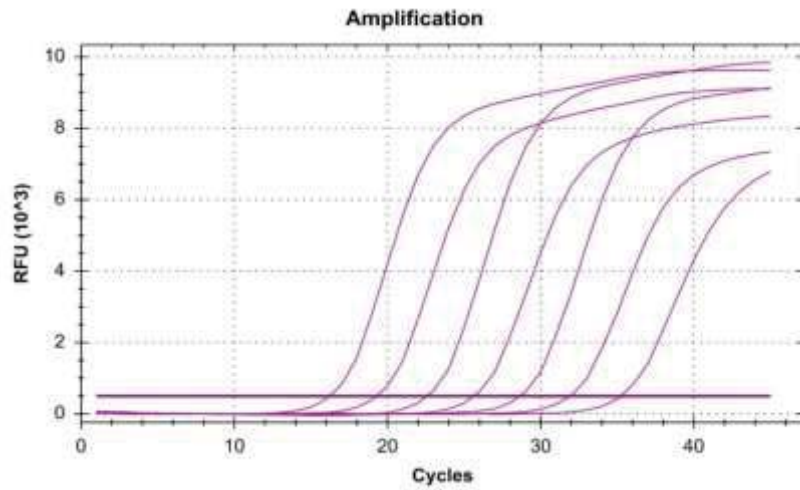


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H1N1)pdm09 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal FAM).

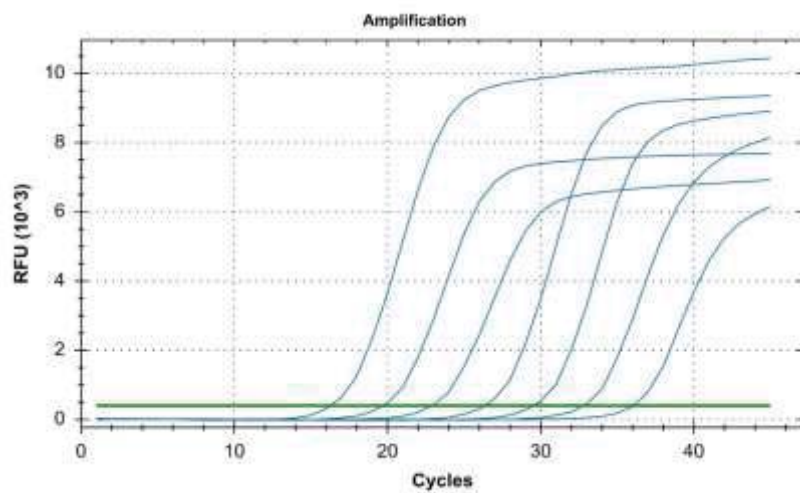


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal HEX).

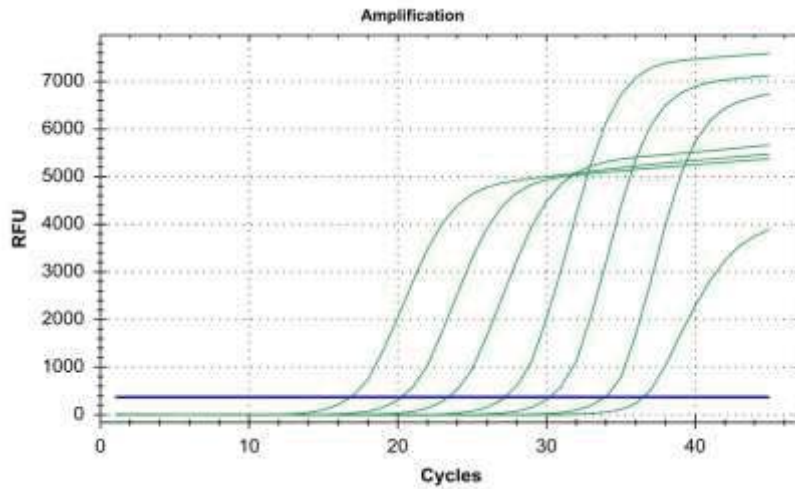


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H3N2) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal ROX).

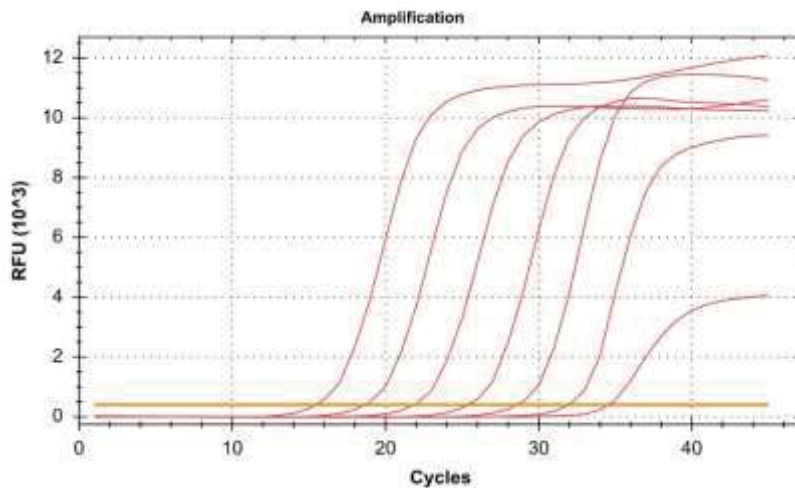
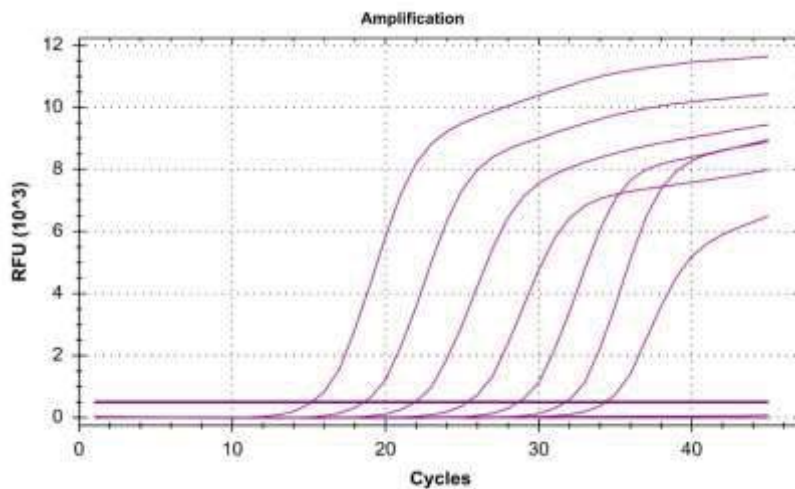


Figura 9. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal Cy5).



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de Respiratory Viral Panel I fue confirmada probando un panel compuesto por 28 microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

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

Table 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A se evaluó frente a la cepa derivada de A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, cepa similar a A/Perth/16/2009(H3N2) derivado de A/Victoria/210/2009, cepa A/New Caledonia/20/99(H1N1), cepa A/Switzerland/9715293/2013 y cepa A/Turkey/Germany R2485+86/2014, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza B se evaluó frente a las cepas B/Brisbane/60/2008 (linaje B/Victoria), B/Florida/04/06 y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata) mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para RSV se evaluó frente a virus respiratorio sincitial humano (RSV) A y B, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H1N1)pdm09 se evaluó frente a A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H3N2) se evaluó frente a A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus y A/Switzerland/9715293/2013 virus, mostrando un resultado positivo.

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 MÁS COMUNES

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










TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

13. Bibliography/Bibliografía

1. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. W.P. Glezen *et al.* The burden of Influenza B: A structured literature review. *American Journal of Public Health* 2013; 103(3): 43-51.
3. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
4. R.L. Kuo *et al.* Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
5. K. Liderot *et al.* Secondary bacterial infections in patients with seasonal influenza A and pandemic H1N1. *BioMed Research International* 2013; 2013:376219.
6. Fan *et al.* Detection of a novel avian influenza A (H7N9) virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14: 541.
7. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Accessed 2015 Dec 30.
8. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
9. C. E. French *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016;10(4): 268-290.
10. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189- 192.
11. A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.

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	
 i	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

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 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 *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 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™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.



CERTEST BIOTEC S.L.

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

www.certest.es

