VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest BIOTEC

Flu Typing I

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

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	**VS-H13106L**
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	**VS-H13106H**
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	**VS-H13112L**
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	**VS-H13112H**
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	**VS-H13113L**
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	**VS-H13113H**

For information purposes only

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes.

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 Influenza 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.

Diagnosis can be problematic, as a wide range of clinical presentation of influenza. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of the two subtypes of Influenza A (H1N1 and H3N2) that are currently in general circulation among people.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes in clinical samples. The detection is done in a one-step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of the specific targeted 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 *hemagglutinin* gene for subtyping of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2, using specific primers and a fluorescent–labelled probes.

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

For information purposes only

which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Flu Typing 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 and retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Influenza A (H1N1)pdm09 RNA targets are amplified and detected in the FAM channel, H3N2 RNA targets are amplified and detected in the ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-H131SL/ VS-H131SH	*Flu Typing 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-H131C	*Flu Typing 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	RNAse/DNAse free water	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 *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-H13106L, VS-H13106H, VS-H13112L and VS-H13112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-H131PL/ VS-H131PH	*Flu Typing 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-H131C	*Flu Typing 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	RNAse/DNAse free water	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 in VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-H13113L and VS-H13113H.

For information purposes only

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Flu Typing 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 disposable gloves

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different kits and/or lots.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

For information purposes only

8.1. RNA extraction

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

For RNA extraction from respiratory samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer´s instructions. 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).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Lyophilized positive control

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

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

8.3. PCR protocol

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

1) Reconstitute the number of wells you need.

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

2) Adding samples and controls.

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

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

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

For information purposes only

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Influenza A H1N1), ROX (H3N2) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for 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 the negative control well and the presence of signal for *Flu Typing I* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer´s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

(H1N1)pdm09 (FAM)	H3N2 (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 Positive**
-	-	+	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 Negative**
+	-	+/-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 Positive, H3N2 Negative**
-	+	-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 Negative, H3N2 Positive**
-	-	-	-	-	**Experiment fail**
+	+	+	+	+	**Experiment fail**

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

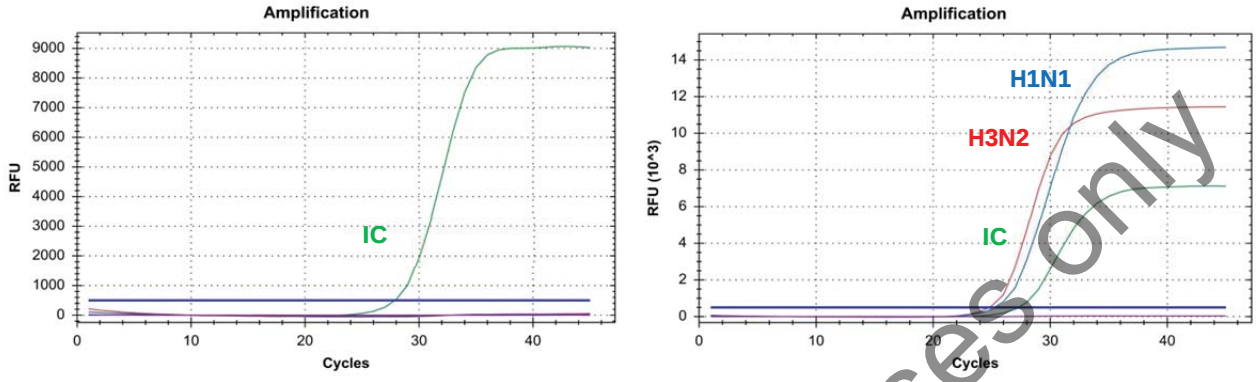
-: No amplification curve

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.

For information purposes only

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™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control **Positive control**

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with throat samples dissolved in transport medium.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2, either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Flu Typing 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 confirms the correct performance of the technique.

For information purposes only

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit was tested using 92 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method ("CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)).

The results were as follows:

	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)		
	+	-	Total
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit +	55	1*	56
-	5*	31	36
Total	60	32	92

Table 5. Comparative results for (H1N1)pdm09.

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

	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)		
	+	-	Total
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit +	29	0	29
-	1*	62	63
Total	30	62	92

Table 6. Comparative results for H3N2.

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

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes using VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥10 RNA copies per reaction for Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 (Figure 2 and 3).

For information purposes only

Figure 2. Dilution series of Influenza A (H1N1)pdm09 (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

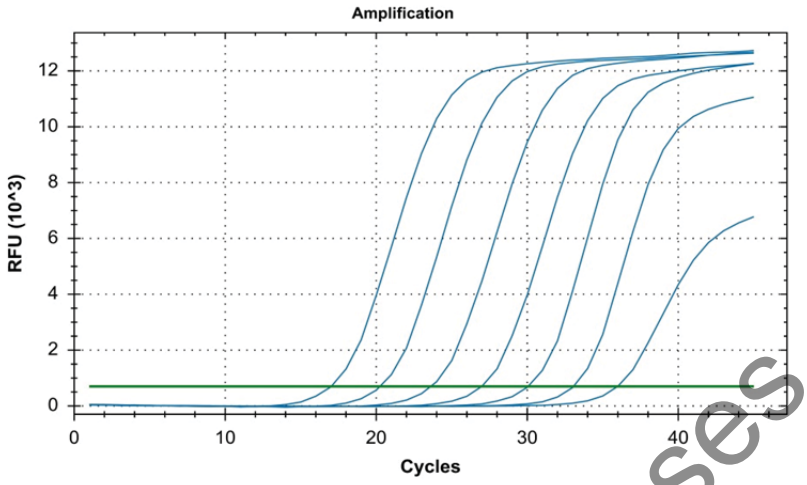
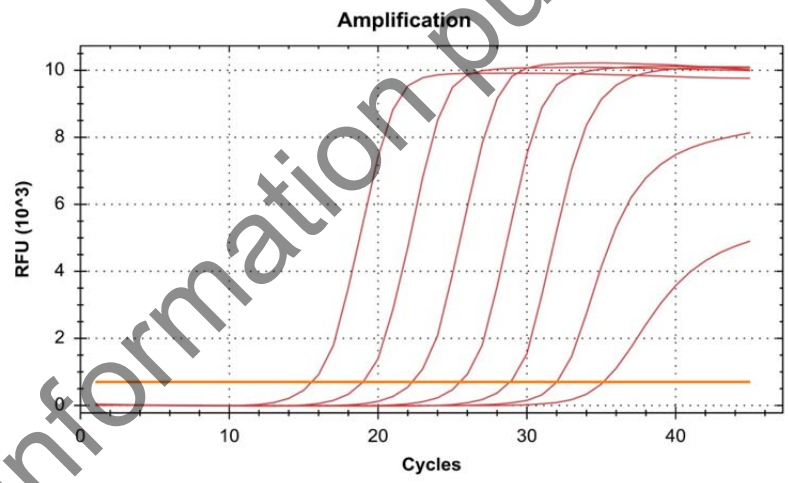


Figure 3. Dilution series of Influenza A (H3N2) (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).



For information purposes only

12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Flu Typing I* assay was confirmed by testing a panel consisting of 34 microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

Cross-reactivity testing					
Bordetella pertussis	-	*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*	-	*Haemophilus influenzae*	-
Bordetella parapertussis	-	*Moraxella catarrhalis*	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-
Bordetella holmesii	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	+/-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
Legionella bozemanii	-	Influenza A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	+/-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Legionella micdadei	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-/+	Human metapneumovirus A and B	-
Legionella dumoffii	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Human coronavirus 229E	-
Legionella longbeachae	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	MERS Coronavirus	-
Legionella pneumophila	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-	Human rhinovirus	-
Mycoplasma pneumoniae	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus	-	Human Adenovirus	-
Streptococcus pneumoniae	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Respiratory Syncytial virus RSV	-
Staphylococcus aureus subsp. aureus	-				

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H1N1)pdm09 was evaluated against strains: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus and A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H3N2) was evaluated against strains: A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Switzerland/9715293/2013 virus and A/Thüringen/5/17 virus, showing positive results.

For information purposes only

ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

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	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System#
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System#
Roche	Cobas z480 Analyzer#
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
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™ 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 *realplex*
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 the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.*

 # Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

For information purposes only

ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

For information purposes only

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 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 los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras respiratorias, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2.

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 gripe, 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 el ser humano están circulando en la actualidad los subtipos A(H1N1) y A(H3N2). El subtipo 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.

El diagnóstico clínico de estas afecciones puede ser problemático, debido al amplio rango de cuadros clínicos de la gripe. La PCR a Tiempo Real es el método de subtipaje de Influenza A preferentemente utilizado al ser una de las herramientas diagnósticas más sensibles y específica para la detección de los dos subtipos de Inlfuenza A (H1N1 y H3N2) que actualmente están en circulación.

3. Procedimiento

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico y el subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 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

For information purposes only

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 ***hemagglutinin*** para el subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2.

VIASURE *Flu Typing 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 *Flu Typing 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) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad de la polimerasa. Tras la reacción de amplificación (H1N1)pdm09 se detecta en el canal FAM, H3N2 se detecta en el canal ROX y el control interno(CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-H131SL/ VS-H131SH	*Flu Typing 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-H131C	*Flu Typing 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 *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-H13106L, VS-H13106H, VS-H13112L y VS-H13112H.

For information purposes only

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-H131PL/ VS-H131PH	*Flu Typing 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-H131C	*Flu Typing 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	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-H13113L y VS-H13113H.

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 *Flu Typing 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 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- 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.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.

For information purposes only

- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- 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).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Flu Typing I* 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 *Flu Typing I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y

For information purposes only

mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20ºC 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 *Flu Typing I* 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	45ºC
1	Desnaturalización inicial	2 min	95ºC
45	Desnaturalización	10 seg	95ºC
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60ºC

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (H1N1), ROX (H3N2) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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 de *Flu Typing I*. 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:

For information purposes only

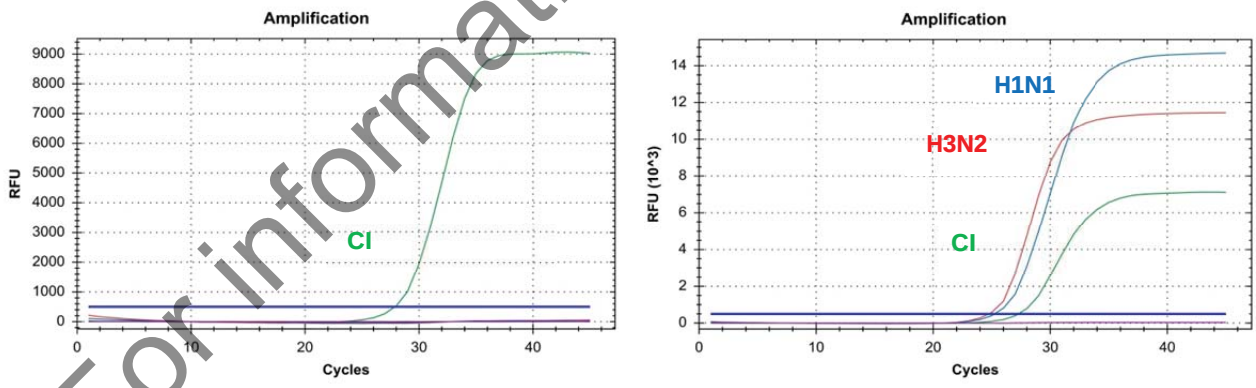
(H1N1)pdm09 (FAM)	H3N2 (ROX)	Control interno (HEX)	Control negativo	Control positvo	Interpretaciónn
+	+	+/-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 Positivos**
-	-	+	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 Negativos**
+	-	+/-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 Positivo, H3N2 Negativo**
-	+	-	-	+	**Influenza A (H1N1)pdm09 Negativo, H3N2 Positivo**
-	-	-	-	-	**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™Real-Time PCR Detection System.



Control Negativo **Control Positivo**

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

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

For information purposes only

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 ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con subtipos de virus Influenza A(H1N1)pdm09 y H3N2 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 *Flu Typing 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 confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 92 muestras respiratorias (frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular ("CLART®PneumoVir DNA array" (Genomica).

Los resultados fueron los siguientes:

	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)		
	+	-	Total
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit			
+	55	1*	56
-	5*	31	36
Total	60	32	92

Tabla 5. 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.*

For information purposes only

	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit	+	29	0	29
	-	1*	62	63
	Total	30	62	92

Tabla 6. Comparativa de resultados para H3N2.

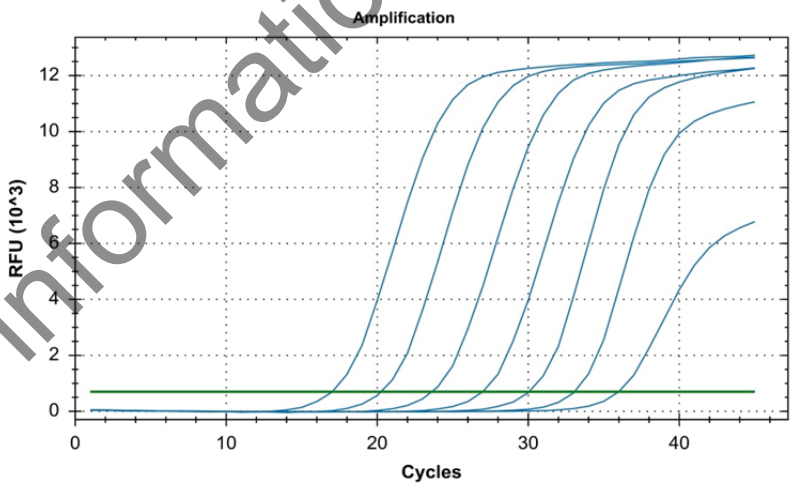
** La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado.*

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los subtipos de Influenza A(H1N1)pdm09 y A(H3N2); utilizando VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analitica

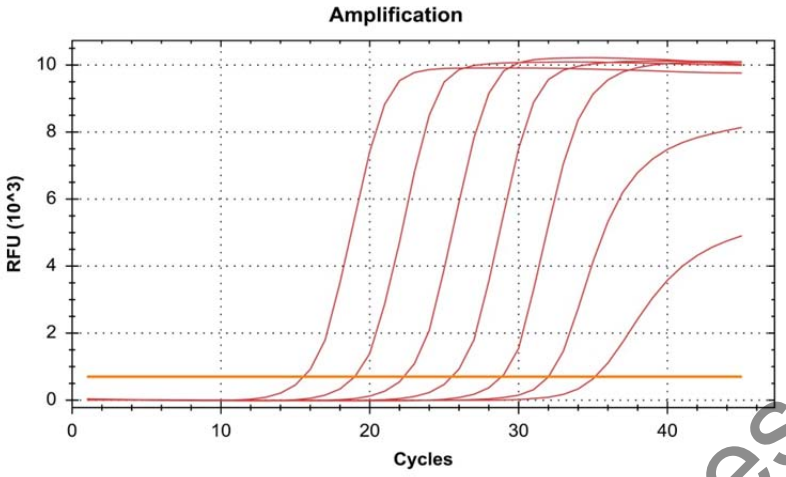
VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de≥10 copias de RNA por reacción para Influenza A (H1N1) pdm09 y H3N2. (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A (H1N1)pdm09 (10^7-10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



For information purposes only

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A (H3N2) (10^7-10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Flu Typing I* fue confirmada probando un panel compuesto por 34 microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

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

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

For information purposes only

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H1N1)pdm09 se evaluó frente a las cepas A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus y A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Flu Typing I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H3N2) se evaluó frente a las cepas A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) y A/Thüringen/5/17 (H3N2), mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. G. Neumann *et al*. Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. 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.
3. K. Liderot *et al.* Secondary bacterial infections in patients with seasonal influenza A and pandemic H1N1. *BioMed Research International* 2013; 2013:376219.
4. 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.

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

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

For information purposes only

ANEXO 1

Compatibilidad de los equipos a tiempo real más comunes

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

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL

Fabricante	Modelo
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	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System#
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System#
Roche	Cobas z480 Analyzer#
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
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™ 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 *realplex*
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®*

 # Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

For information purposes only

ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	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.

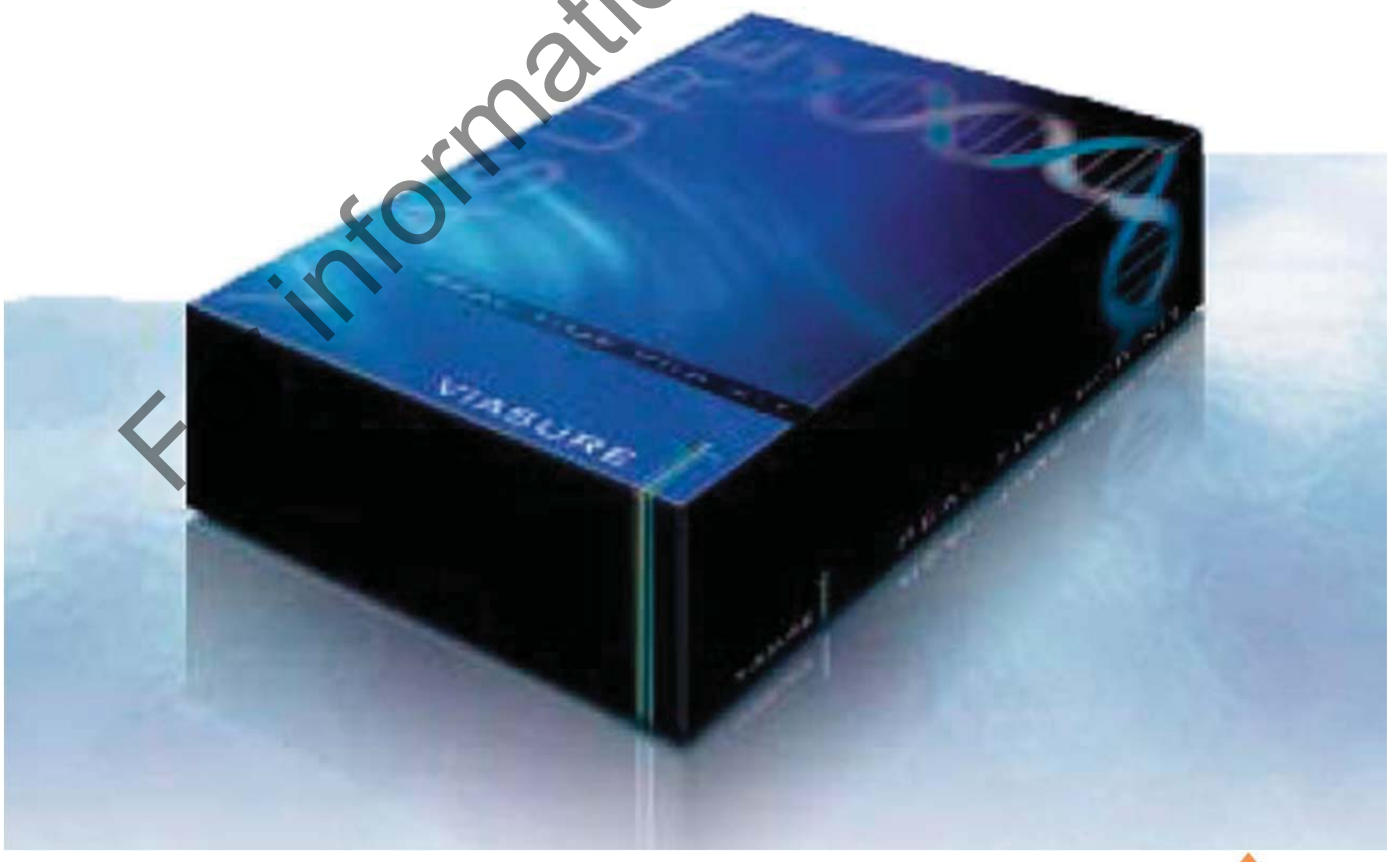
For information purposes only

VIASURE *Flu Typing 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™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid) and Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. 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 *Flu Typing 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™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid) y Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. 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).

For information purposes only

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



For information purposes only

For information purposes only

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

VIASURE online

For information purposes only

F-362 rev00

VIASURE

CE IVD CSQ MED ISO 13485

Real Time PCR Detection Kits

CerTest BIOTEC