

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

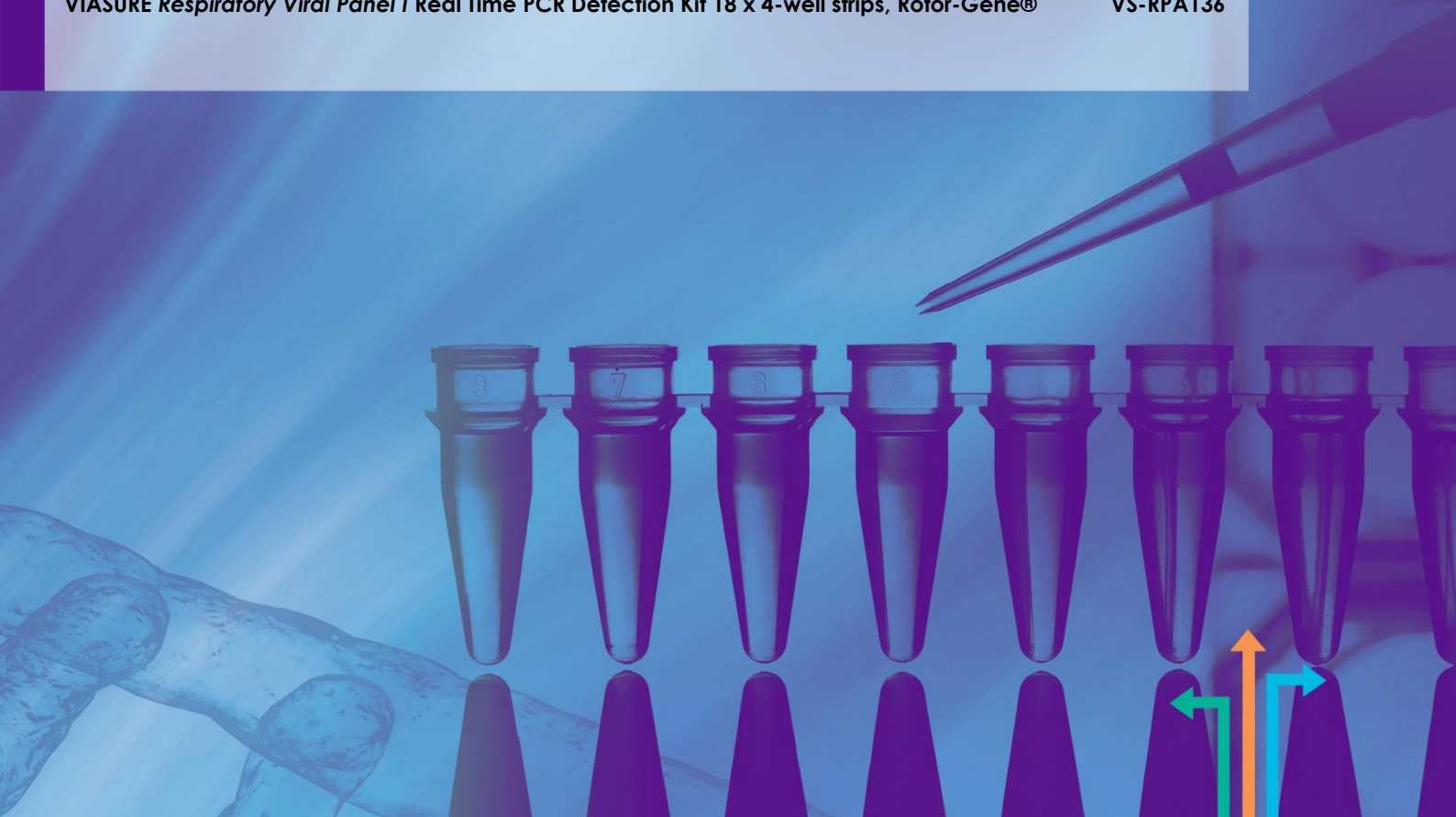
by CerTest
BIOTEC

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 <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-RPA136



ENGLISH

1. Intended 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.

National Influenza Centres (NICs) and other national influenza laboratories from 111 countries, areas or territories reported data to FluNet for the time period from 21 January 2019 to 03 February 2019. The WHO GISRS laboratories tested more than 213440 specimens during that time period. A total of 69007 were positive for influenza viruses, of which 67733 (98.2%) were typed as influenza A and 1274 (1.8%) as influenza B. Of the sub-typed influenza A viruses, 25052 (72%) were influenza A(H1N1)pdm09 and 9734 (28%) were influenza A(H3N2). The global cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO from 16 countries and from 2003 to 2019 has been 860. 2017 was the last year in which cases were reported (3 cases in Egypt and one case in Indonesia). The global cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H7N9) reported to WHO from 2013 to 2018 has been 1567. The latest case was reported on 2018.

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 fragment 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*), as well as, a fragment of a conserved region of the *hemagglutinin* gene for subtyping of Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and/or H7N9) (*Flu Typing II*) and a fragment of a conserved region of the *neuraminidase* gene for Influenza A (H5N1 and/or H7N9) (*H5N1 + H7N9 Confirmation*), 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 three kind of reaction mix and each one corresponds to one different assay (*Flu A, Flu B & RSV, Flu Typing II* and *H5N1 + H7N9 Confirmation*). The first reaction mix contains the multiplex reaction mix for the detection of Flu A, Flu B and RSV (*Flu A, Flu B & RSV*). Influenza A RNA targets are amplified and detected in channel FAM, Influenza B RNA targets in channel ROX, and RSV RNA targets in channel Cy5. The second reaction mix (*Flu Typing II* (HXN)) contains the multiplex reaction mix for the detection of subtypes H1N1 and H3N2 and the screening of H5N1 and H7N9. Influenza A (H1N1)pdm09 RNA targets are amplified and detected in channel FAM,



H5N1 RNA in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2), H3N2 RNA targets in channel ROX, and H7N9 RNA targets in channel Cy5. The third reaction mix contains the multiplex reaction mix for the confirmation of the H5N1 and H7N9 subtypes (*H5N1 + H7N9 Confirmation (H19)*). This reaction mix should be used when amplification for H5N1 and H7N9 in the second reaction mix is observed. H5N1 RNA targets are amplified and detected in channel FAM, and H7N9 RNA targets in channel ROX, the internal control (IC) is detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

As mentioned before in summary and explanation section, the predominant influenza activity is due to the H1N1 and H3N2 subtypes. Contrary, the subtypes H5N1 and H7N9 are decreasing over the years. Therefore, the number of times it will be necessary to perform the confirmatory PCR using the H19 mixture will be less than 10% of cases of the influenza viruses detected with this kit.

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<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
<i>Flu Typing II</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
<i>H5N1 + H7N9 Confirmation</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	1/2 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Viral Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Water RNase/DNase free	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	7/14 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.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Flu A, Flu B & RSV</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
<i>Flu Typing II</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
<i>H5N1 + H7N9 Confirmation</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent	2 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Viral Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	20 x 4-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-RPA136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

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

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

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, 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), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. 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).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.



6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- 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.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-RPA136). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For reference VS-RPA136 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Make sure to use a well for the detection of Flu A, Flu B and RSV. Make sure to use first the reaction mix for the subtyping assay (detection of subtypes H1N1 and H3N2 and screening of H5N1 and H7N9) and after result analysis, if necessary, the well for the confirmation of the H5N1 and H7N9 subtypes. Be careful not to mix them or alter the reaction mix order 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 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.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.



8. Test procedure

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).

8.2. Lyophilized positive control

Respiratory Viral Panel 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 *Respiratory Viral Panel I* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. 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.

Note 1. The third reaction mix (H5N1 + H7N9 Confirmation) contains the multiplex reaction mix for the confirmation of the H5N1 and H7N9 subtypes. This reaction mix should be used when amplification for H5N1 and H7N9 in the second reaction mix is observed. If you do not observed amplification for these subtypes you should not use this reaction mix. If, on the other hand, you observe amplification for H5N1 and H7N9 subtypes, proceed in the same way indicated below. In addition to this, do not repeat the analysis performed with the first reaction mix.

- 1) Reconstitute the number of wells you need (wells of the third strip (*H5N1 + H7N9 Confirmation*) only if necessary, as specified above).

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 I* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

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

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) in the first reaction mix through the FAM (Influenza A), HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)), ROX (Influenza B), and Cy5 channels (RSV); in the second reaction mix through the FAM (Influenza A H1N1), HEX, JOE or VIC (H5N1), ROX (H3N2), and Cy5 channels (H7N9) and in the third reaction mix through the FAM (H5N1), ROX (H7N9) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

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. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix (if it is available). The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer's instructions

Using the following tables read and analyze the results:



Interpretation of results for *Flu A*, *Flu B* & *RSV*:

Flu A (FAM)	Flu B (ROX)	RSV (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Flu A, Flu B and RSV Positive
-	-	-	+	-	+	Flu A, Flu B and RSV Negative
+	-	-	+/-	-	+	Flu A Positive, Flu B and RSV Negative
+	+	-	+/-	-	+	Flu A and Flu B Positive, and RSV Negative
+	-	+	+/-	-	+	Flu A and RSV Positive, and Flu B Negative
-	+	-	+/-	-	+	Flu B Positive, Flu A and RSV Negative
-	+	+	+/-	-	+	Flu B and RSV Positive, Flu A Negative
-	-	+	+/-	-	+	RSV Positive, Flu A and Flu B Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

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

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



Interpretation of results for Flu Typing II:

(H1N1)pdm09 (FAM)	H5N1 (HEX)	H3N2 (ROX)	H7N9 (Cy5)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes positives; H5N1 and H7N9 subtypes positive presumptive*
-	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 subtypes negatives
+	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive; H3N2, H5N1 and H7N9 negatives
+	+	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive and H5N1 positive presumptive; H3N2 and H7N9 negatives*
+	-	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives; H5N1 and H7N9 negatives
+	-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive and H7N9 positive presumptive; H3N2 and H5N1 negatives*
+	+	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives and H5N1 positive presumptive; H7N9 negative*
+	+	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive, H5N1 and H7N9 positive presumptive; H3N2 negative*
+	-	+	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives, H7N9 positive presumptive; H5N1 negative*
-	+	-	-	-	+	Influenza A H5N1 positive presumptive; Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2 and H7N9 negatives*
-	+	+	-	-	+	Influenza A H5N1 positive presumptive and H3N2 positive; Influenza (H1N1)pdm09 and H7N9 negatives*
-	+	-	+	-	+	Influenza A H5N1 and H7N9 positive presumptive; (H1N1)pdm09 and H3N2 negatives*
-	+	+	+	-	+	Influenza A H3N2 Positive, H5N1 and H7N9 positive presumptive; and A (H1N1)pdm09 negative*
-	-	+	-	-	+	Influenza A H3N2 positive; (H1N1)pdm09, H5N1, and H7N9 negatives
-	-	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positive and H7N9 positive presumptive; (H1N1)pdm09 and H5N1 negatives*
-	-	-	+	-	+	Influenza A H7N9 positive presumptive; (H1N1)pdm09, H3N2, and H5N1 negatives*
-	-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system.

*** Note that if you observe amplification in the HEX and/or Cy5 channels you should use the H5N1 + H7N9 Confirmation, to confirm the H5N1 and / or H7N9 subtypes.**



Interpretation of results for H5N1 + H7N9 Confirmation:

H5N1 (FAM)	H7N9 (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	H5N1 and H7N9 positives
-	-	+	-	+	H5N1 and H7N9 negatives
+	-	+/-	-	+	H5N1 positive and H7N9 negative
-	+	+/-	-	+	H7N9 positive and H5N1 negative
-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 6. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

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

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

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

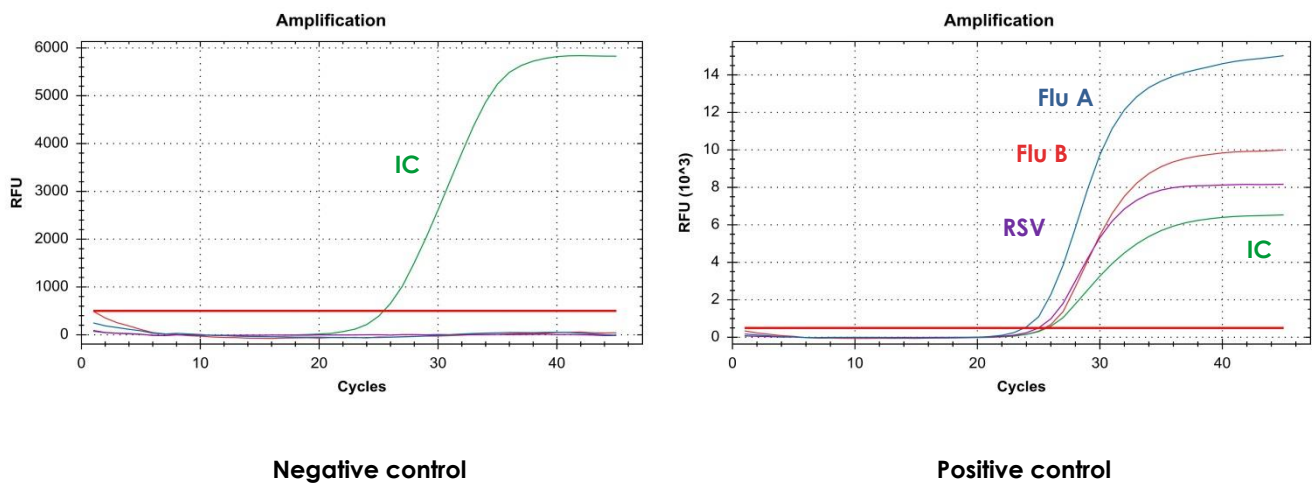


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Flu Typing II).

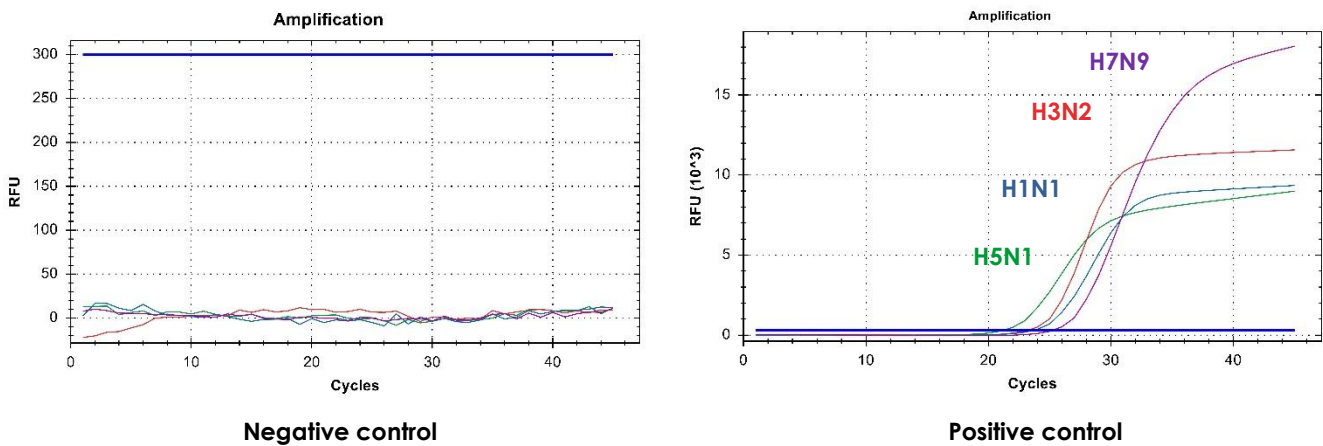
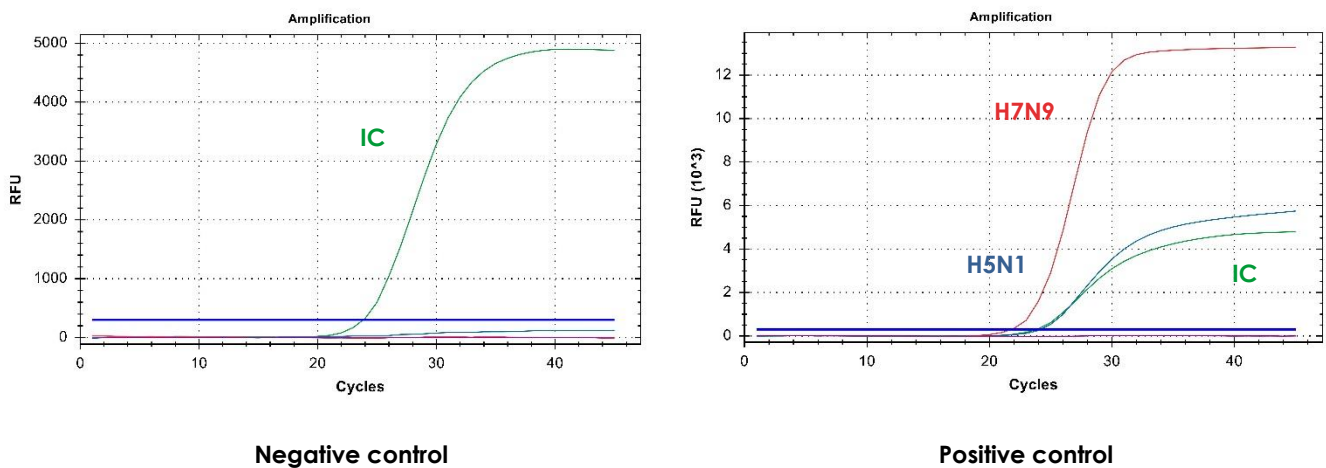


Figure 3. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (H5N1 + H7N9 Confirmation)



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.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. 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.

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 RNA extracted from throat swab 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 contamination by Flu A, Flu B and RSV, as well as, Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9 subtypes, 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 reaction mix 1 and 3 (*Flu A, Flu B & RSV* and *H5N1 + H7N9 Confirmation*) 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 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 <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit (Flu A, Flu B & RSV)	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	105	0	105
	-	2*	149	151
	Total	107	149	256

Table 7. 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 <i>Respiratory Viral Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit (Flu A, Flu B & RSV)	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)			
		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	1*	204	205
	Total	52	204	256

Table 8. 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 (Flu A, Flu B & RSV)	CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica)		
		+	-
	+	41	0
	-	0	215
	Total	41	215

Table 9. Comparative results for RSV.

The clinical performance of VIASURE *Flu Typing II* Real Time PCR Detection Kit was tested using 127 respiratory specimens (throat swabs and respiratory samples in transport medium) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by molecular detection methods (CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica) and Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

The results were as follows:

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit (Flu Typing II)	CLART® Pneumovir (GENOMICA) + Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
	+	82	1*
	-	3*	41
	Total	85	42

Table 10. 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 (Flu Typing II)	CLART® Pneumovir (GENOMICA) + Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
	+	33	0
	-	1*	93
	Total	34	93

Table 11. Comparative results for H3N2.

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

The clinical performance of VIASURE *Flu Typing II* Real Time PCR Detection Kit (H5N1 + H7N9 Confirmation) was tested using 59 samples from QCMD, UK NEQAS and INSTAND EQA programs. These samples included samples in transport medium. These results were compared with the final reports. All samples were detected correctly. 4/59 were H5N1 positive and 2/59 were H7N9 positive.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Flu A, Flu B and RSV, as well as, Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9 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 ≥ 10 RNA copies per reaction for Flu A, Flu B, RSV, (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9 (Figure 4-12).



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

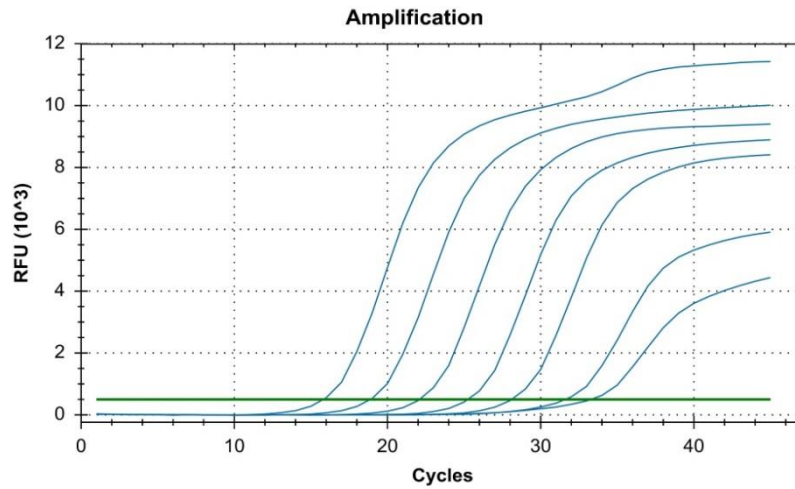


Figure 5. Dilution series of Influenza B (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu A*, *Flu B* & RSV, channel ROX).

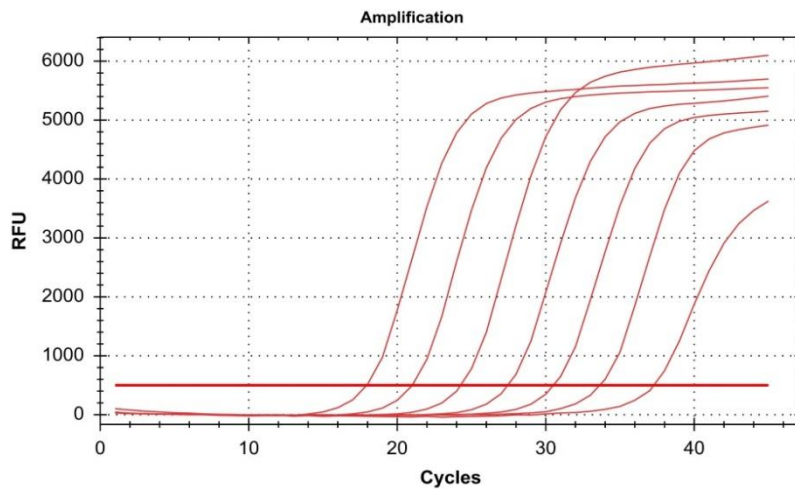


Figure 6. Dilution series of RSV (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu A*, *Flu B* & RSV, channel Cy5).

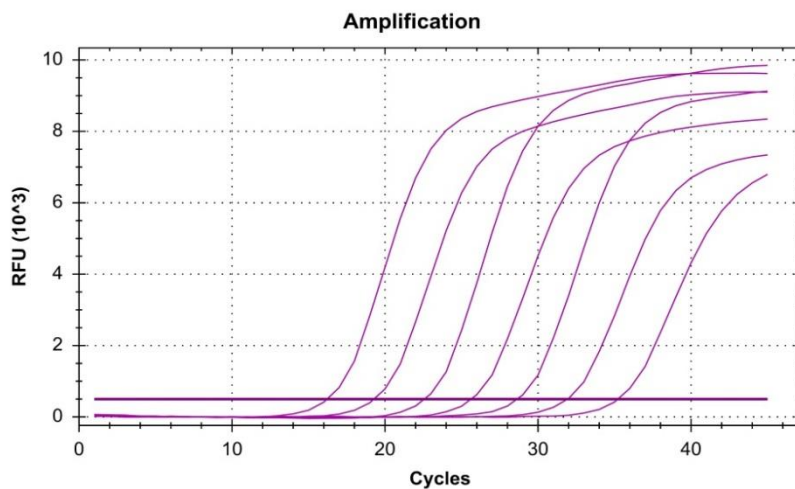


Figure 7. Dilution series of Influenza A(H1N1)pdm09 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel FAM).

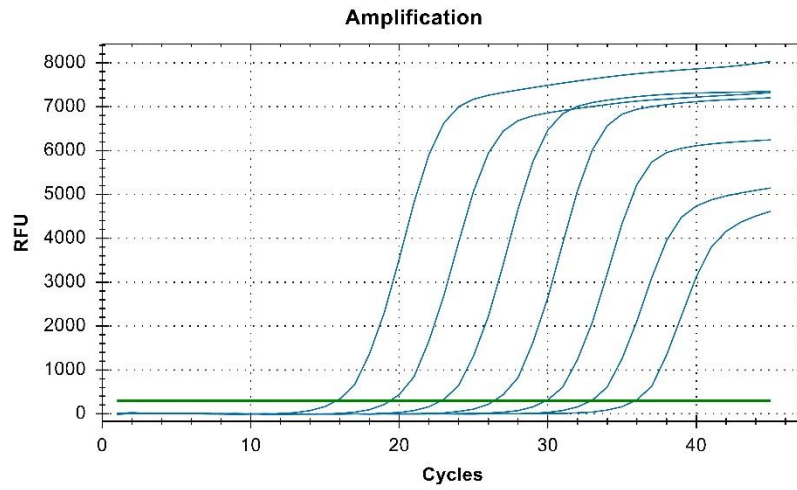


Figure 8. Dilution series of Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel HEX).

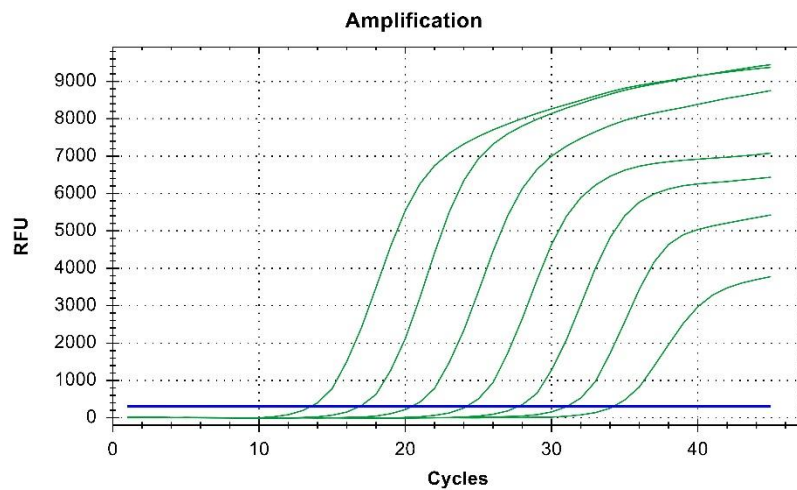


Figure 9. Dilution series of Influenza A(H3N2) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel ROX).

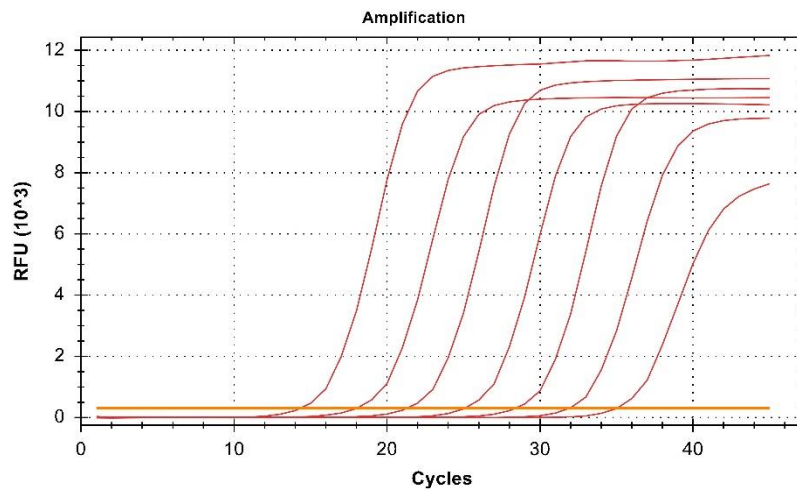


Figure 10. Dilution series of Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Flu Typing II*, channel Cy5).

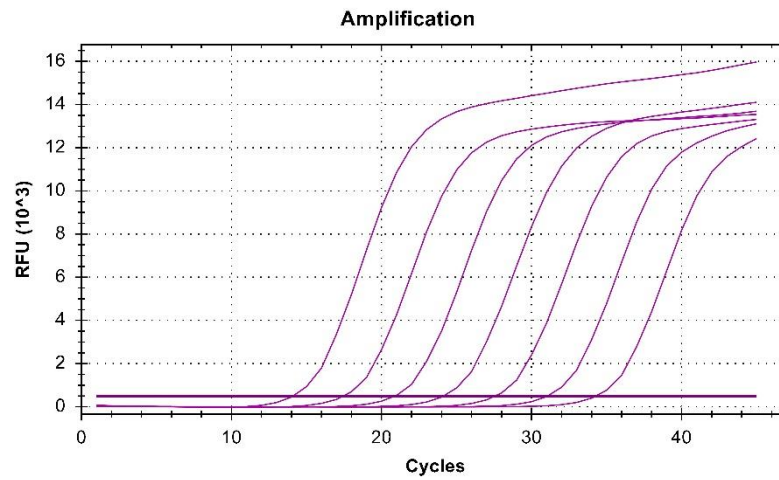


Figure 11. Dilution series of Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *H5N1 + H7N9 Confirmation*, channel FAM).

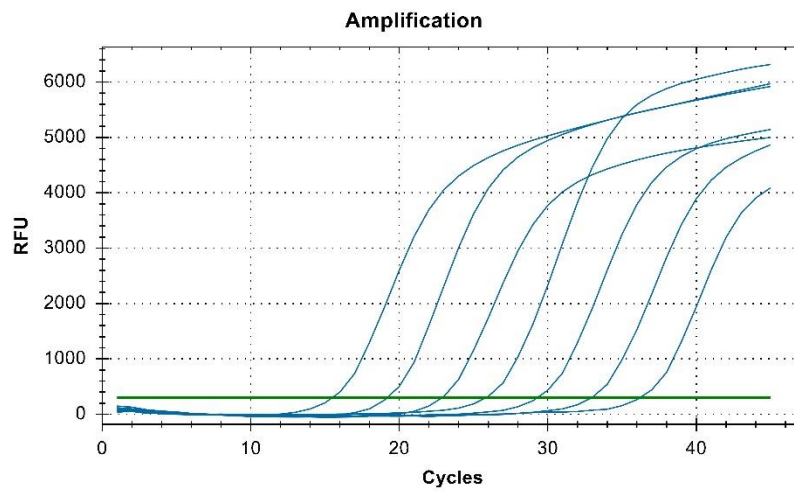
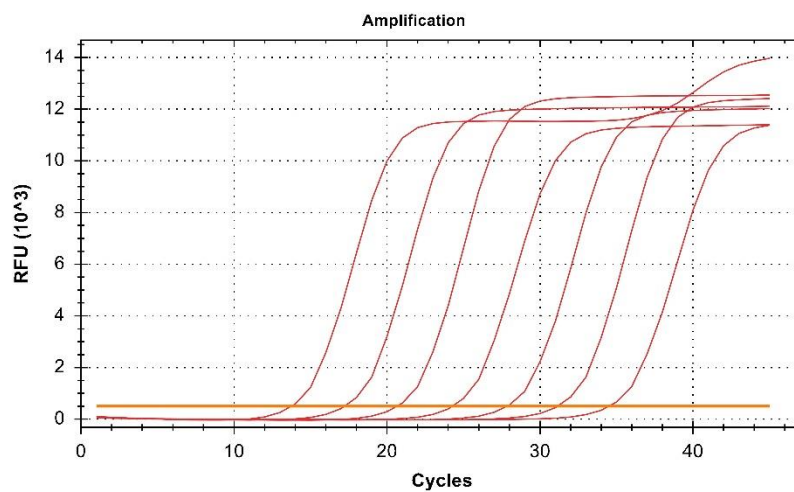


Figure 12. Dilution series of Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *H5N1 + H7N9 Confirmation*, channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Respiratory Viral Panel I assay was confirmed by testing a panel consisting of different 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					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	-	Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/2013 (H5N8) virus*	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Human rhinovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Bocavirus	-	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus*	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus types 1-5, 8, 31, 40 and 41	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1*	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Florida/04/06 virus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3)	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus*	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
Human metapneumovirus A and B	-				

Table 12. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



* The strains Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus and Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8); and the strains Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus and Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 showed negative result after being analysed by both assays (Flu Typing II and H5N1 + H7N9 Confirmation).

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/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus, A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C) 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/Florida/04/06 virus, B/Phuket/3073/2013 virus, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 and B/Maryland/15/2016, 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/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus and A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 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, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)), showing positive results.

The reactivity of VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H5N1) was evaluated against strain A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, showing positive result.

The reactivity of VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit for Influenza A(H7N9) was evaluated against strain: A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, showing positive result.



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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

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

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

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



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	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	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	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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



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 víricos 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.

Los Centros Nacionales de Influenza (NIC) y otros laboratorios nacionales de influenza de 111 países, áreas o territorios reportaron datos a FluNet para el período comprendido entre el 21 de enero de 2019 y el 3 de febrero de 2019. Los laboratorios GISRS de la OMS analizaron más de 213440 muestras durante ese período. Un total de 69007 fueron positivas para los virus de la influenza, de los cuales 67733 (98.2%) se tipificaron como influenza A y 1274 (1.8%) como influenza B. De los subtipos de influenza A, 25052 (72%) fueron influenza A (H1N1) pdm09 y 9734 (28%) fueron influenza A (H3N2). El número global acumulado de casos humanos confirmados de influenza aviar A (H5N1) informados a la OMS de 16 países y desde 2003 hasta 2019 fue de 860. 2017 fue el último año en el que se notificaron casos (3 casos en Egipto y un caso en Indonesia). El número global acumulado de casos humanos confirmados de influenza aviar A (H7N9) informados a la OMS desde 2013 hasta 2018 fue de 1567. El último caso se informó en 2018.

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 un fragmento de una región diana conservada del gen *M1* para Influenza A y B, y del gen *N* para RSV (*Flu A, Flu B & RSV*), además de emplear un fragmento de una región diana conservada del gen *hemagglutinin* para el subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 (*Flu Typing II*), y un fragmento de una región diana conservada del gen *neuroaminidase* para el subtipaje de Influenza A H5N1 y H7N9 (*H5N1 + H7N9 Confirmation*).

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 tres tipos de mezclas de reacción y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente (*Flu A, Flu B & RSV, Flu Typing II* y *H5N1 + H7N9 Confirmation*). La primera mezcla de reacción contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de Influenza A, Influenza B y/o RSV (*Flu A, Flu B & RSV*). 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 mezcla de reacción (*Flu Typing II (HXN)*) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de los subtipos H1N1 y H3N2 y el screening de H5N1 y H7N9. 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 tercera mezcla de reacción contiene la mezcla de reacción múltiplex para la confirmación de los subtipos H5N1 y H7N9 (*H5N1 + H7N9 Confirmación (H19)*). Esta mezcla de reacción se debe utilizar cuando se observa la amplificación de H5N1 y H7N9 en la segunda mezcla de reacción. Tras la reacción de amplificación H5N1 se detecta en el canal FAM, H7N9 se detecta en el canal ROX y el control interno (IC) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

Como se mencionó anteriormente en la sección de introducción y explicación, la actividad de la influenza predominante se debe a los subtipos H1N1 y H3N2. Por el contrario, los subtipos H5N1 y H7N9 están disminuyendo con los años. Por lo tanto, el número de veces que será necesario realizar la PCR de confirmación con la mezcla H19 será inferior al 10% de los casos de virus de influenza detectados con este kit.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<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
<i>Flu Typing II</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
<i>H5N1 + H7N9 Confirmation</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1/2 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
Respiratory Viral Panel Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	7/14 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.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Flu A, Flu B & RSV</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
<i>Flu Typing II</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
<i>H5N1 + H7N9 Confirmation</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	2 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Viral Panel I</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	20 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-RPA136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

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).
- Kit de extracción de RNA.



- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

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, 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), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. 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).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

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. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- 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.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-RPA136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.



- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-RPA136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para ensayo de detección de Influenza A, B y/o RSV. Asegurarse de utilizar primero la mezcla de reacción para el ensayo de subtipaje (detección de subtipos H1N1 y H3N2 y screening de H5N1 y H7N9) y después del análisis de resultados, si es necesario, utilizar la mezcla de reacción para la confirmación de los subtipos H5N1 y H7N9. 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.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

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 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 *Respiratory Viral Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 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.

Nota 1. La tercera mezcla de reacción (H5N1 + H7N9 Confirmation) contiene la mezcla de reacción múltiplex para la confirmación de los subtipos H5N1 y H7N9. Esta mezcla de reacción se debe utilizar cuando se observa la amplificación de H5N1 y H7N9 en la segunda mezcla de reacción. Si no observó la amplificación de estos subtipos, no debe usar esta mezcla de reacción. Si, por el contrario, observa la amplificación de los subtipos H5N1 y H7N9, proceda de la misma manera que se indica a continuación. Además de esto, no repita el análisis realizado con la primera mezcla de reacción.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios (pocillos de la tercera mezcla de reacción (H5N1 + H7N9 Confirmation) solo si es necesario, como se especificó anteriormente).

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Respiratory Viral Panel I* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

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



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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) en la primera mezcla de reacción a través de los canales FAM (Influenza A), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (Influenza B), y Cy5 (RSV), en la segunda mezcla de reacción a través de los canales FAM (H1N1), HEX, JOE o VIC (H5N1), ROX (H3N2), y Cy5 (H7N9) y en la tercera mezcla de reacción a través de los canales FAM (H5N1), ROX (H7N9) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

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. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación (si está disponible). 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 las siguientes tablas, leer y analizar los resultados:



Interpretación de los resultados para *Flu A*, *Flu B* & *RSV*:

Influenza A (FAM)	Influenza B (ROX)	RSV (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Influenza A, Influenza B y RSV Positivos
-	-	-	+	-	+	Influenza A, Influenza B y RSV Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Influenza A Positivo, Influenza B y RSV Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Influenza A y Influenza B Positivos, y RSV Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Influenza A y RSV Positivos, y Influenza B Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Influenza B Positivo, Influenza A y RSV Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Influenza B y RSV Positivos, Influenza A Negativo
-	-	+	+/-	-	+	RSV Positivo, Influenza A y Influenza B Negativos
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

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.



Interpretación de resultados para *Flu Typing II*:

(H1N1)pdm09 (FAM)	H5N1 (HEX)	H3N2 (ROX)	H7N9 (Cy5)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+	+	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 y H3N2 subtipos positivos; H5N1 y H7N9 subtipos presuntivos positivos*
-	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 subtipos negativos
+	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo; H3N2, H5N1 y H7N9 negativos
+	+	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo y H5N1 presuntivo positivo; H3N2 y H7N9 negativos*
+	-	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos; H5N1 y H7N9 negativos
+	-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo y H7N9 presuntivo positivo; H3N2 y H5N1 negativos*
+	+	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos y H5N1 presuntivo positivo; H7N9 negativo*
+	+	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo, H5N1 y H7N9 presuntivos positivos; H3N2 negativo*
+	-	+	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos, H7N9 presuntivo positivo; H5N1 negativo*
-	+	-	-	-	+	Influenza A H5N1 presuntivo positivo; Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2 y H7N9 negativos*
-	+	+	-	-	+	Influenza A H5N1 presuntivo positivo y H3N2 positivo; Influenza (H1N1)pdm09 y H7N9 negativos*
-	+	-	+	-	+	Influenza A H5N1 y H7N9 presuntivos positivos; (H1N1)pdm09 y H3N2 negativos*
-	+	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positivo, H5N1 y H7N9 presuntivos positivos; y A (H1N1)pdm09 negativo*
-	-	+	-	-	+	Influenza A H3N2 positivo; (H1N1)pdm09, H5N1, y H7N9 negativos
-	-	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positivo y H7N9 presuntivo positivo; (H1N1)pdm09 y H5N1 negativos*
-	-	-	+	-	+	Influenza A H7N9 presuntivo positivo; (H1N1)pdm09, H3N2, y H5N1 negativos*
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si 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.

*** Tenga en cuenta que si observa amplificación en los canales HEX y/o Cy5, debe usar H5N1 + H7N9 Confirmation para confirmar los subtipos H5N1 y / o H7N9.**



Interpretación de resultados para H5N1 + H7N9 Confirmation:

H5N1 (FAM)	H7N9 (ROX)	Control Interno (HEX)	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	H5N1 y H7N9 Positivos
-	-	+	-	+	H5N1 y H7N9 Negativo
+	-	+/-	-	+	H5N1 Positivo y H7N9 Negativo
-	+	+/-	-	+	H7N9 Positivo y H5N1 Negativo
-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 6. 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 (Flu A, Flu B & RSV).

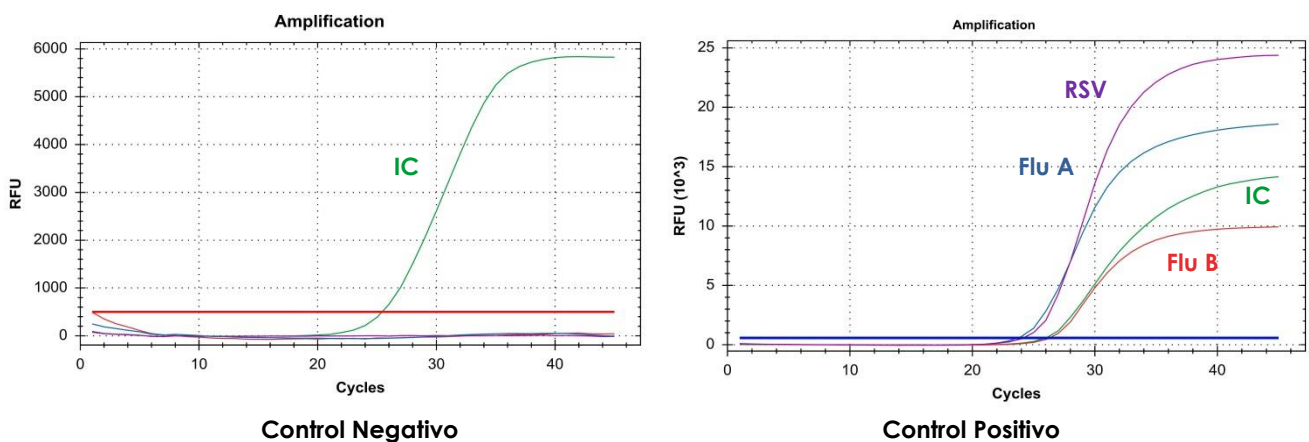


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Flu Typing II).

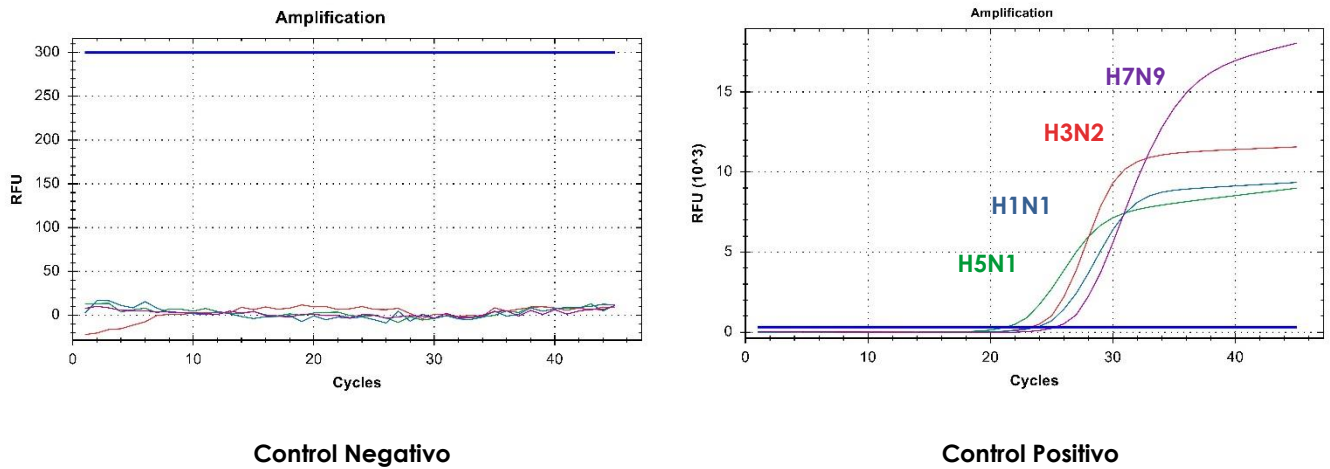
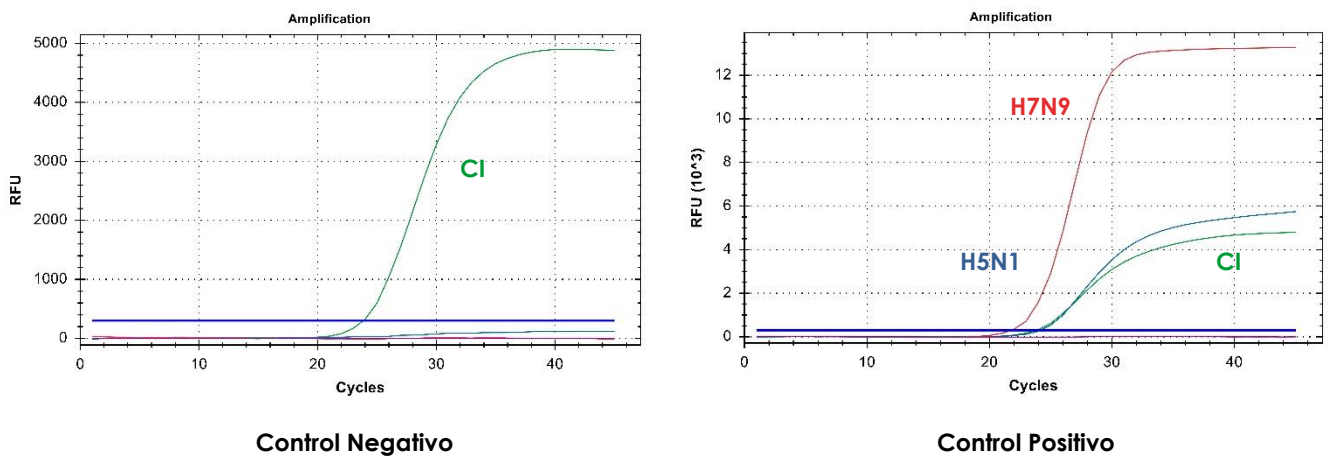


Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (H5N1 + H7N9 Confirmation)



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.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. 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.

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 RNA extraído de 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 debe 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 y los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 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 mezcla de reacción 1 y 3 (Flu A, Flu B & RSV y H5N1 + H7N9 Confirmation) confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 256 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 (Flu A, Flu B & RSV)	CLART®PneumoVir DNA array" (Genómica)		
		+	-
		Total	
	+	105	0
	-	2*	149
	Total	107	149
		Total	256

Tabla 7. 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 Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit (Flu A, Flu B & RSV)	CLART®PneumoVir DNA array" (Genomica)		
		+	-
	+	51	0
	-	1*	204
	Total	52	204

Tabla 8. 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 (Flu A, Flu B & RSV)	CLART®PneumoVir DNA array" (Genomica)		
		+	-
	+	41	0
	-	0	215
	Total	41	215

Tabla 9. Comparativa de resultados para RSV.

Se evaluaron 127 muestras respiratorias (frotis faríngeos y muestras respiratorias disueltas en medio de transporte) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por dos métodos de detección molecular (CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica) and Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE Flu Typing II Real Time PCR Detection Kit (Flu Typing II)	CLART® Pneumovir (GENOMICA) + Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
	+	82	1*
	-	3*	41
	Total	85	42

Tabla 10. 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 Flu Typing II Real Time PCR Detection Kit (Flu Typing II)	CLART® Pneumovir (GENOMICA) + Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
	+	33	0
	-	1*	93
	Total	34	93

Tabla 11. 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.

El test VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit (H5N1 + H7N9 Confirmation) fue evaluado utilizando 59 muestras de los programas EQA QCMD, UK NEQAS e INSTAND. Estas muestras incluyeron muestras disueltas en medio de transporte. Estos resultados se compararon con los informes finales. Todas las muestras fueron detectadas correctamente. 4/59 fueron H5N1 positivos y 2/59 fueron H7N9 positivas.



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, A(H3N2), H5N1 y H7N9; utilizando VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Respiratory Viral Panel I Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción para Influenza A y B, (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 y H7N9 y RSV (Figura 4-12).

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

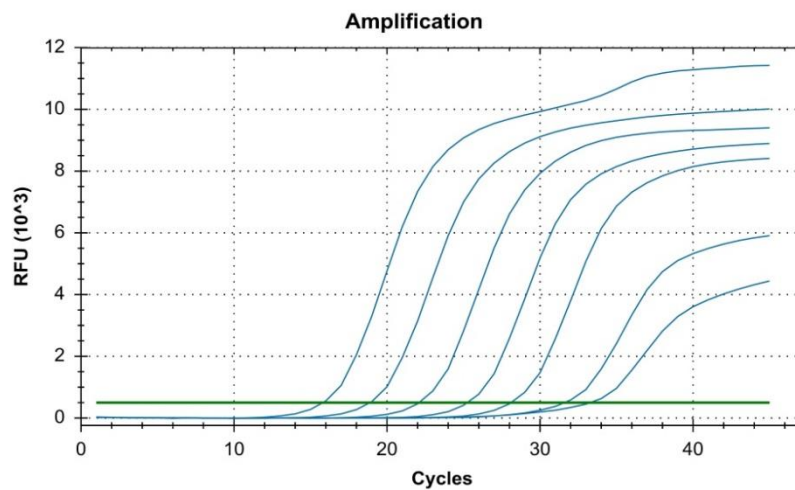


Figure 5. Diluciones seriadas de un estándar Influenza B (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción Flu A, Flu B & RSV, canal ROX).

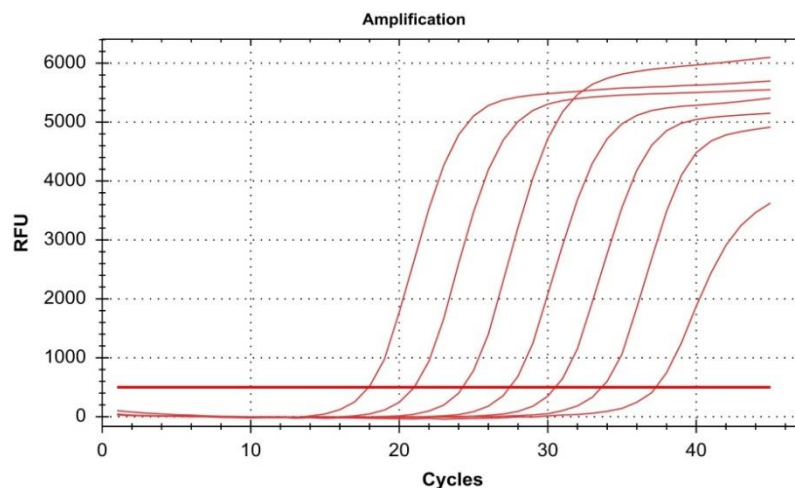


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar RSV (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción Flu A, Flu B & RSV, canal Cy5).

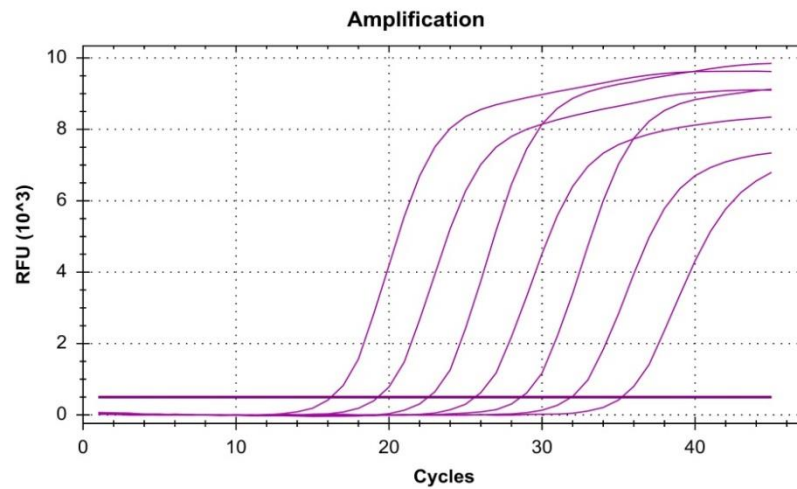


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H1N1)pdm09 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción Flu Typing II, canal FAM).

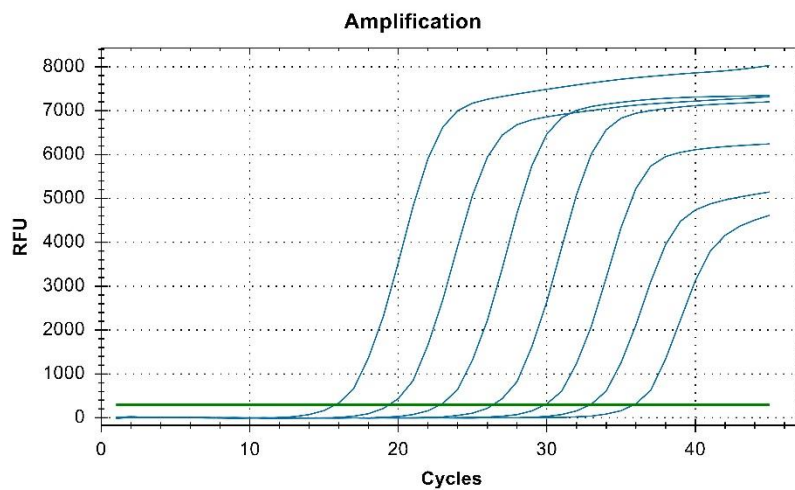


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción Flu Typing II, canal HEX).

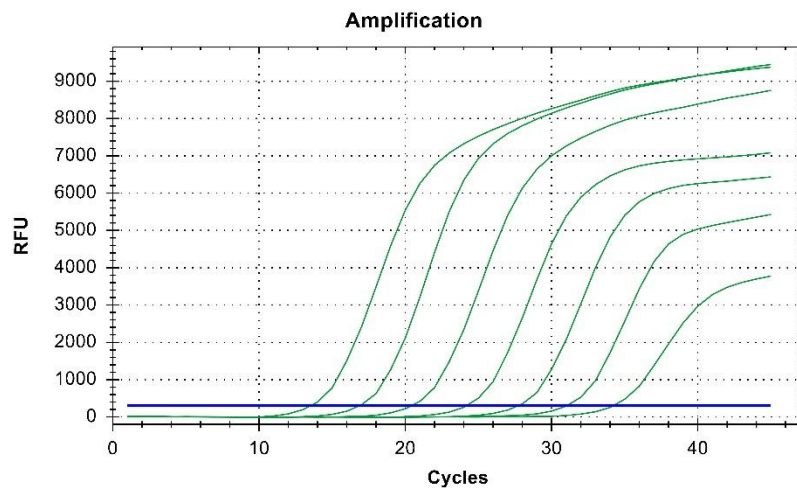


Figura 9. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H3N2) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal ROX).

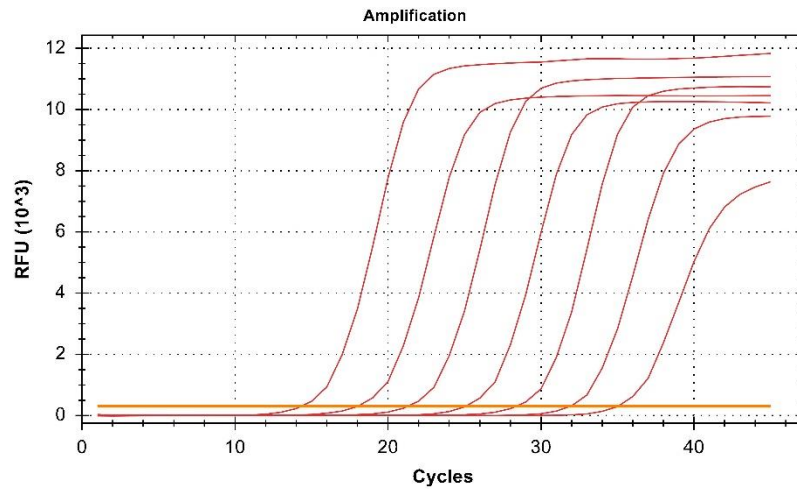


Figura 10. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *Flu Typing II*, canal Cy5).

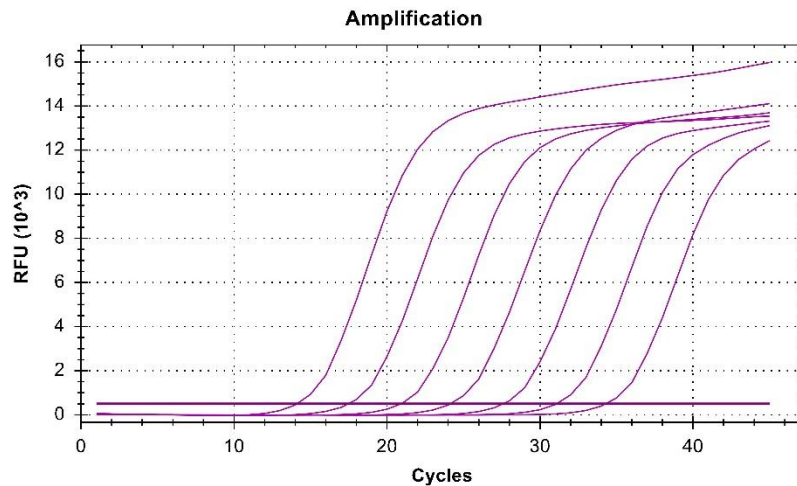


Figura 11. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H5N1) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción *H5N1 + H7N9 Confirmation*, canal FAM).

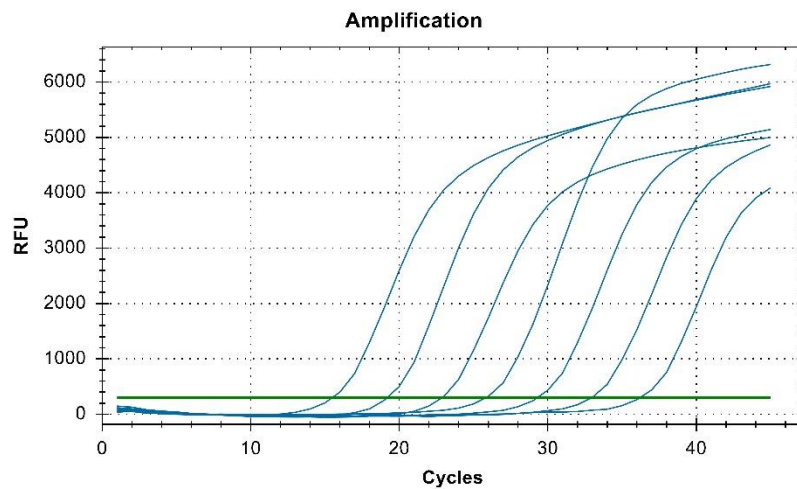
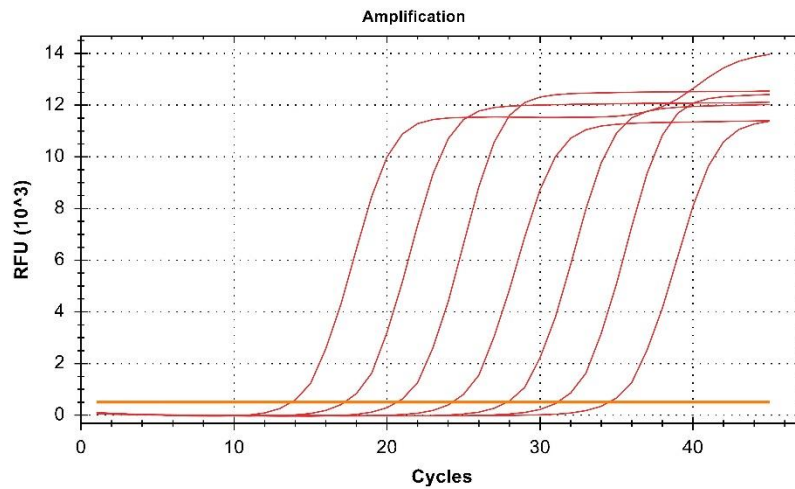


Figura 12. Diluciones seriadas de un estándar Influenza A(H7N9) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de Reacción H5N1 + H7N9 Confirmation, canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Respiratory Viral Panel I* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes 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 reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)*	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Rhinovirus humano	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Bocavirus	-	Virus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)*	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 31, 40 y 41	-	Virus Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	MERS Coronavirus	-	Virus Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Virus Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1*	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like	-/+	Virus Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Virus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-/+	Virus Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-/+	Virus Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like	-/+	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-/+	Virus Influenza B/Florida/04/06	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-/+	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-/+	Virus Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A)	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a)	-/+	Virus Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3)	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Virus Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a)	-/+	Virus Influenza B/Colorado/6/2017	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	-/+	Virus Influenza B/Maryland/15/2016	-
Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) *	-	Virus respiratorio sincitial (RSV)	-
Metapneumovirus humano A y B	-				

Tabla 12. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

* Las cepas Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/ 2014 (H5N8) e Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8); y las cepas Virus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) y Virus Influenza A /mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 mostraron un resultado negativo después de ser analizados por ambos ensayos (Flu Typing II y H5N1 + H7N9 Confirmation).



12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A se evaluó frente a las cepas: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09, A/Perth/16/2009(H3N2)-like, A/Thüringen/5/17 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8), A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8), A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 y A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C) 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-like, B/Florida/04/06, B/Phuket/3073/2013, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 y B/Maryland/15/2016 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 las cepas: A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 y A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09, 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 las cepas: A/Perth/16/2009(H3N2)-like, A/Thüringen/5/17 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) y A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H5N1) se evaluó frente a la cepa A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Viral Panel I* Real Time PCR Detection Kit para Influenza A(H7N9) se evaluó frente a la cepa A/Anhui/1/2013 (H7N9), mostrando un resultado positivo.

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*

	<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		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

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

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

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



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	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, 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.

Revision: April 2019





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cer-test.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC