

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Adenovirus

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-ADV106L
VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-ADV106H
VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-ADV112L
VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-ADV112H
VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-ADV113L
VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-ADV113H

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

Adenoviruses belong to the *Adenoviridae* family of non-enveloped and double-stranded (dsDNA) viruses. There are more than 50 immunologically distinct human Adenovirus serotypes classified into 6 species (HAdV-A to HAdV-F) that can cause human infections ranging from respiratory disease (mainly species HAdV-B and C), and conjunctivitis (HAdV-B and D), to gastroenteritis (HAdV-F serotypes 40 and 41). In addition to the previous serotypes, the HAdV 31, 12, 18, 1, 2, 5 and 6 have been associated with acute diarrhea. Although epidemiologic characteristics of the Adenovirus vary by type, all are transmitted by direct contact or by fecal-oral route. They are pathogenic for all age groups of the population, especially for children. These viruses are highly infectious; small inoculation is required to produce infection.

Target gene most frequently employed for the specific detection of HAdV is the *hexon* gene.

3. Principle of the procedure

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of gastroenteritis caused by Adenovirus in human stool samples. After DNA isolation, the identification of Adenovirus is performed by the amplification of a conserved region of the *hexon* gene using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

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

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. Adenovirus DNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

4. Reagents provided

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:



Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-ADV1SL/ VS-ADV1SH	Adenovirus 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-ADV1C	Adenovirus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ADV106L, VS-ADV106H, VS-ADV112L and VS-ADV112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-ADV1PL/ VS-ADV1PH	Adenovirus 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-ADV1C	Adenovirus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-ADV113L and VS-ADV113H.

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 Adenovirus Real Time PCR Detection Kit.

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°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.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

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

8. Test procedure

8.1. Sample preparation

Stool samples should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For longer storage, the samples must be frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenize stool sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended

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

8.1.1. DNA extraction

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



- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).
- RIDA® Xtract (R-biopharm)
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

8.2. Lyophilized positive control

Adenovirus 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 *Adenovirus* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

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

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up your thermocycler.

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



Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Adenovirus) and HEX, JOE or VIC channels (CI). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none.

9. Result interpretation

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

Using the following table read and analyze the results:

Adenovirus (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Adenovirus Positive
-	+	-	+	Adenovirus Negative
-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

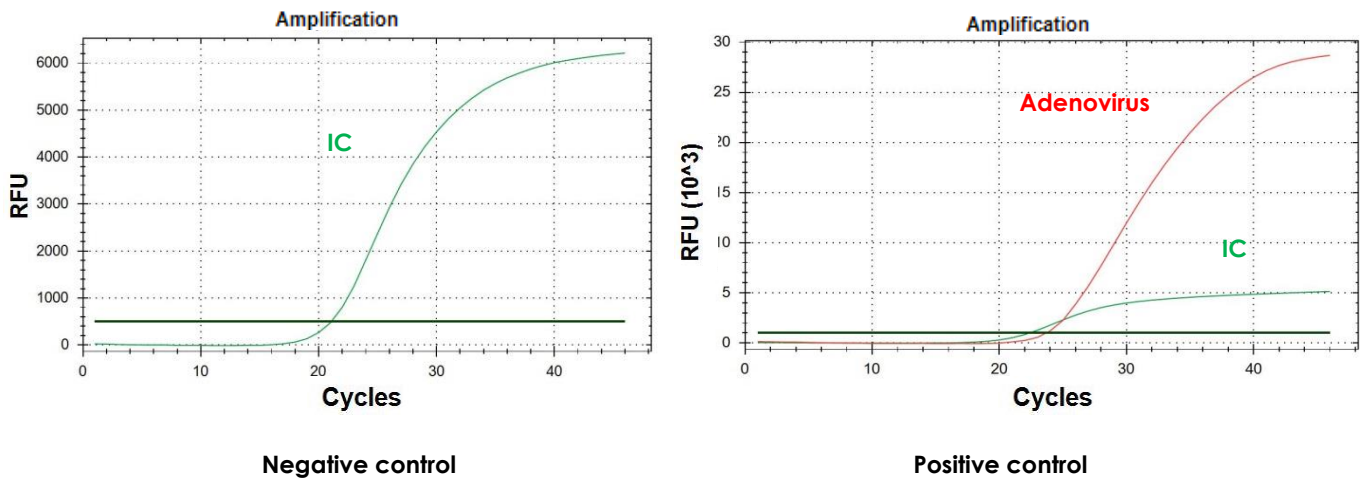
-: No amplification curve

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

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



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



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

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

10. Limitations of the test

- The 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 human faecal samples.
- 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 Adenovirus either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics



12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit was tested using 95 faecal samples from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex and RIDA®GENE Viral Stool Panel II (r-Biopharm)). In case of discrepancies, the results were evaluated by Nested-PCR according to published protocol.

The results were as follows:

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit	RIDA®Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex + RIDA®GENE Viral Stool Panel II + PCR conventional (r-Biopharm)		
		+	-
	+	45	3*
	-	0	47
	Total	45	50

Table 5. Comparative results

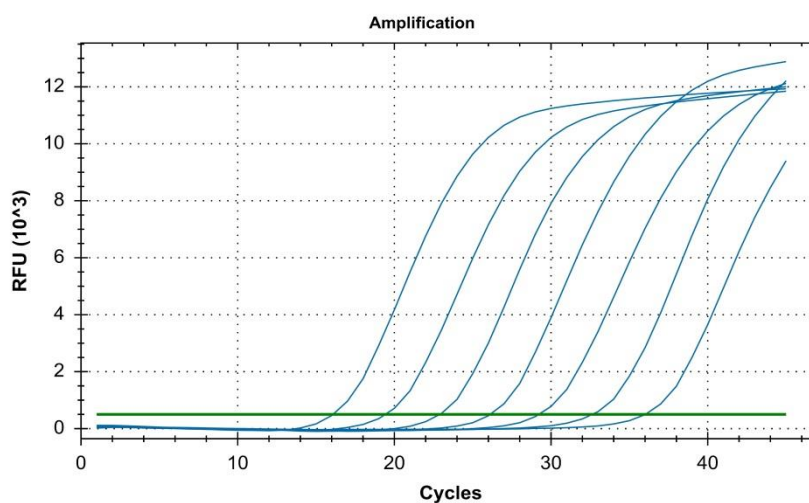
* The low amount of template DNA detected in these faecal samples is below the detection limit of the methods used and so it may produce random positive results.

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

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction. (Figure 2).

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



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Adenovirus assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica O:3</i>	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica O:9</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Salmonella enterica subsp. entérica</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	Norovirus Genotypes I and II	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit was evaluated against Human Adenovirus 40, Human Adenovirus 41 strain Tak, Human Adenovirus type 1, Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6, Human Adenovirus 5 and Human Adenovirus type 6 showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Roche	Cobas z480 Analyzer [#]
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
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
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000PT™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005PT™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System †
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System †

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

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

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

† See Annex 2 to check optical measurement exposure setting.



ANNEX 2

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". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -150, HEX channel – 3000, ROX channel – 2000 and Cy5 channel - 1500.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 150, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

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

2. Introducción y explicación

Los Adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* de virus no encapsulados de DNA bicatenario (dsDNA). Existen más de 50 serotipos inmunológicamente diferenciados de Adenovirus humanos agrupados en 6 especies (AdVH-A hasta AdVH-F) que pueden causar infecciones en seres humanos que van desde enfermedades respiratorias (principalmente AdVH-B y C), y conjuntivitis (AdVH-B y D), hasta gastroenteritis (serotipos AdVH-F 40 y 41). Adicionalmente a estos últimos, los serotipos AdVH 31, 12, 18, 1, 2, 5 y 6 se han visto también asociados con diarrea aguda. Aunque las características epidemiológicas de Adenovirus varían por tipo, todos se transmiten por contacto directo o por vía fecal-oral y son considerados patógenos para todos los grupos de edad de la población independientemente de la edad, especialmente para los niños. De hecho, estos virus son altamente infecciosos y unas pocas partículas virales son suficientes para causar infección.

El gen diana más frecuentemente empleado para la detección específica de AdVH es el gen *hexon*.

3. Procedimiento

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de gastroenteritis causada por Adenovirus en muestras de heces humanas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de Adenovirus se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *hexon*.

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit utiliza 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 DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE Adenovirus 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) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Tras la reacción de amplificación, Adenovirus se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).



4. Reactivos suministrados

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-ADV1SL/ VS-ADV1SH	Adenovirus 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-ADV1C	Adenovirus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ADV106L, VS-ADV106H, VS-ADV112L y VS-ADV112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-ADV1SL/ VS-ADV1SH	Adenovirus 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-ADV1C	Adenovirus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ADV113L y VS-ADV113H.

5. Material requerido y no suministrado

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

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



- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

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

7. Precauciones para el usuario

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

8. Procedimiento del test

8.1. Preparación de la muestra

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.



Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

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

8.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir muestras de heces humanas, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA 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.
- QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).
- QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).
- RIDA® Xtract (R-biopharm).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NucliSENS® EasyMAGTM, sistema de extracción automatizado (bioMérieux).

8.3. Control positivo liofilizado

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

8.4. Protocolo PCR

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

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

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

- 2) Añadir muestras y controles.



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

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

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

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

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

9. Interpretación de resultados

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

Adenovirus (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Adenovirus Positivo
-	+	-	+	Adenovirus Negativo
-	-	-	+	Inválido
+	+	+	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

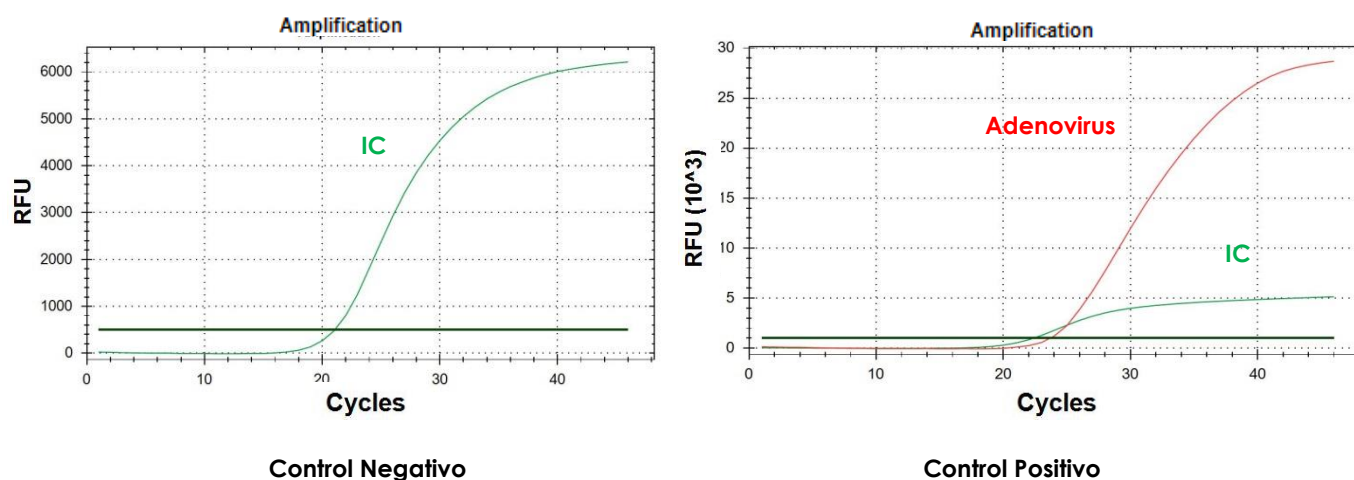
-: sin curva de amplificación

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



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

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



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

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

10. Limitaciones del test

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



11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 95 muestras fecales de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por kits comerciales de PCR a tiempo real (RIDA®Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex y RIDA®GENE Viral Stool Panel II (R-biopharm)). En caso de discrepancias, los resultados se evaluaron mediante Nested-PCR según el protocolo.

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit	RIDA®Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex + RIDA®GENE Viral Stool Panel II + PCR convencional			
		+	-	Total
	+	45	3*	48
	-	0	47	47
	Total	45	50	95

Tabla 5. Comparativa de resultados

* La baja cantidad de DNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios

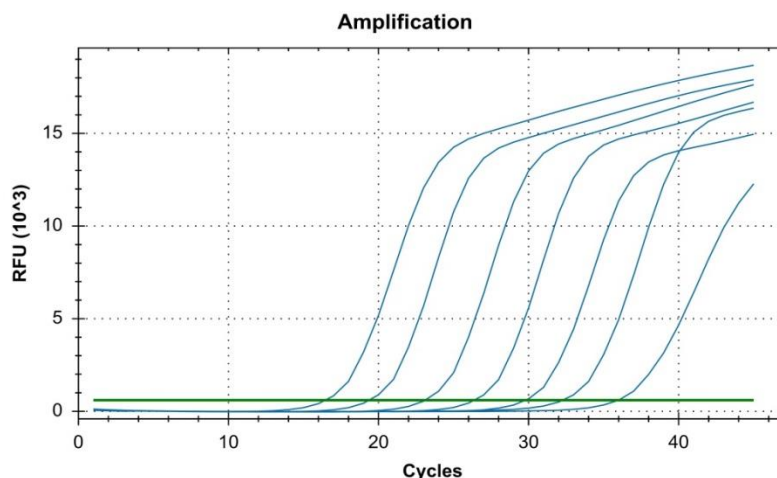
Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar la Adenovirus utilizando VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Adenovirus.Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción. (Figura 2).



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



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de adenovirus fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Campylobacter lari</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	<i>Campylobacter fetus</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
<i>Helicobacter heilmannii</i>	-	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	-	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-
<i>Salmonella bongori</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i>	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-
<i>Salmonella enterica subsp. entérica</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Rotavirus A	-
<i>Salmonella pullorum</i>	-	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	Norovirus Genotipos I y II	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	-	Astrovirus Genotipos I-VIII	-

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.



12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a Adenovirus humano serotipo 40, Adenovirus humano serotipo 41 cepa Tak, Adenovirus humano tipo 1, Adenovirus humano serotipo 2 cepa Adenoid 6, Adenovirus humano serotipo 5 y Adenovirus humano tipo 6 mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. I Wilhelmi *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and infection* 2003; 9: 247-262.
2. A Heim. *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003; 70: 228–239.
3. N Jothikumar. *et al.* Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71: 3131–3136.
4. A Allard. *et al.* Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(2): 498-505.

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

	In vitro 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
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Roche	Cobas z480 Analyzer [#]
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

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

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

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

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

† Ver Anexo 2 para la configuración de los valores de exposición.



ANEXO 2

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". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 100.



VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), 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).

VIASURE Adenovirus Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), 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).

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



CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC