

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae

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

VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HNS106L
VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HNS106H
VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HNS112L
VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HNS112H
VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HNS113L
VIASURE <i>H. influenzae, N. meningitidis & S. pneumoniae</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HNS113H

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* and/or *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid or blood samples from patients with signs and symptoms of meningitis. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *H. influenzae*, *N. meningitidis* and/or *S. pneumoniae* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae*.

2. Summary and Explanation

The most common causes of bacterial meningitis in adults are *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. These organisms are spread from person to person by close contact with respiratory secretions. Once acquired, each species can colonize the mucosa of the nasopharynx and oropharynx, which is known as pharyngeal carriage. From there, they may cross the mucosa and enter the blood. Once in the blood, they can reach the meninges, causing meningitis, or other body sites causing other syndromes. The term "meningitis" describes inflammation of the membranes (meninges) that surrounds and protects the brain and spinal cord. Meningitis symptoms include sudden onset of fever, headache, and stiff neck. There are often other symptoms, such as nausea, vomiting, photophobia and altered mental status. Bacterial meningitis is a lifethreatening condition that requires prompt recognition and treatment.

Haemophilus influenzae, a pleomorphic gram-negative coccobacillus. Is a common commensal microorganism of the upper respiratory tract. It is a human-only pathogen that can cause severe invasive disease, including meningitis, pneumonia, and septicemia. *H. influenzae* strains are divided based on the presence or absence of a polysaccharide capsule; there are 6 encapsulated serotypes (Hia–Hif) and nonencapsulated, nontypeable *H. influenzae* (NTHi) strains. Among them, Hib strains are considered the most prevalent.

Neisseria meningitidis may either be encapsulated or unencapsulated. However, nearly all invasive *N. meningitidis* organisms are encapsulated, or surrounded by a polysaccharide capsule. This capsular polysaccharide is used to classify *N. meningitidis* into 12 serogroups. Six of these serogroups cause the great majority of infections in people: A, B, C, W135, X, and Y. Meningitis epidemics are generally caused by serogroup A, although outbreaks have also been caused by serogroups C, W135, and X.

Streptococcus pneumoniae cause severe infections like meningitis, community-acquired pneumonia (CAP), bacteremia, bronchitis, sinusitis, and otitis media. More than 90 different serotypes of *S. pneumoniae* have been identified to date on the basis of the biochemical structure of the capsular polysaccharide that is a major virulence factor. The distribution of serotypes can vary with age, geography and time.

Cerebrospinal fluid culture is considered the diagnostic reference standard for bacterial meningitis, and bacterial isolation is important for antimicrobial susceptibility testing and molecular epidemiology. However, CSF culture requires at least a day or more, and has limited sensitivity. Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) of CSF



and blood has been suggested as a rapid diagnostic test for bacterial meningitis, and amplification of DNA from non-viable bacteria could potentially facilitate diagnosis in culture negative cases. Using multiple analytic approaches, we found that qPCR assays on CSF and blood specimens were highly accurate for diagnosis of *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, and *H. influenzae* meningitis.

3. Principle of the procedure

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *H. influenzae*, *N. meningitidis* and/or *S. pneumoniae* in clinical samples. After DNA isolation, the identification of *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* is performed by the amplification of a conserved region of the *hdp* gene for *Haemophilus influenzae*, *lytA* and *piaA* genes for *Streptococcus pneumoniae* and *ctrA* gene for *Neisseria meningitidis*, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 monitor PCR inhibition. *Haemophilus influenzae* DNA targets are amplified and detected in the FAM channel, *Streptococcus pneumoniae* DNA targets are amplified and detected in the ROX channel, *Neisseria meningitidis* DNA targets are amplified and detected in the Cy5 channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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-HNS1SL/ VS-HNS1SH	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-HNS1C	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HNS106L, VS-HNS106H, VS-HNS112L and VS-HNS112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-HNS1PL/ VS-HNS1PH	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> 96- well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-HNS1C	<i>H. influenzae</i> , <i>N.</i> <i>meningitidis</i> & <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HNS113L and VS-HNS113H.

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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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. DNA extraction

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).



8.2. Lyophilized positive control

H. influenzae, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*H. influenzae*), ROX (*S. pneumoniae*), Cy5 (*N. meningitidis*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for 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 the negative control well and the presence of signal for *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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:

<i>H. influenzae</i> (FAM)	<i>S. pneumoniae</i> (ROX)	<i>N. meningitidis</i> (Cy5)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> and <i>N. meningitidis</i> Positive
-	-	-	+	-	+	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> and <i>N. meningitidis</i> Negative
+	-	-	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> Positive, <i>S. pneumoniae</i> and <i>N. meningitidis</i> Negative
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i> Positive, and <i>N. meningitidis</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> and <i>N. meningitidis</i> Positive, and <i>S. pneumoniae</i> Negative
-	+	-	+/-	-	+	<i>S. pneumoniae</i> Positive, <i>H. influenzae</i> and <i>N. meningitidis</i> Negative
-	+	+	+/-	-	+	<i>S. pneumoniae</i> and <i>N. meningitidis</i> Positive, <i>H. influenzae</i> Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>N. meningitidis</i> Positive, <i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

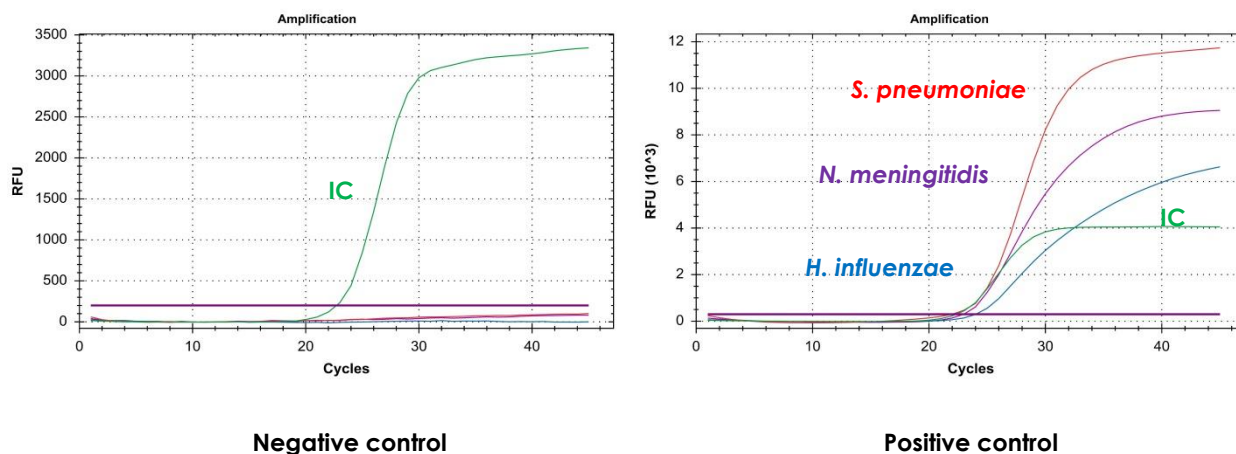
-: No amplification curve

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 (i.e. cerebrospinal fluid), it has been validated only with blood 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with 2 QCMD programmes (QCMD 2017 Central Nervous System II EQA Pilot Study and QCMD 2017 Respiratory III EQA Pilot Study). These panels consist of 18 clinical specimens dissolved in transport medium and saline samples. The results were compared with the EQA programme final reports. All *H. influenzae* (3/18), *N. meningitidis* (2/18) and *S. pneumoniae* (3/18) samples could be detected. In addition, *Streptococcus agalactiae* sample could be confirmed as a negative.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* using VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *N. meningitidis* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* (Figure 2, 3 and 4).

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

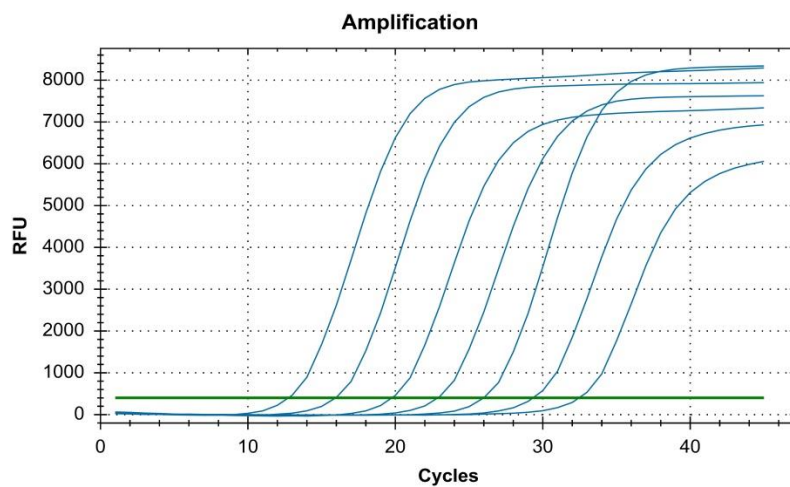


Figure 3. Dilution series of *S. pneumoniae* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).

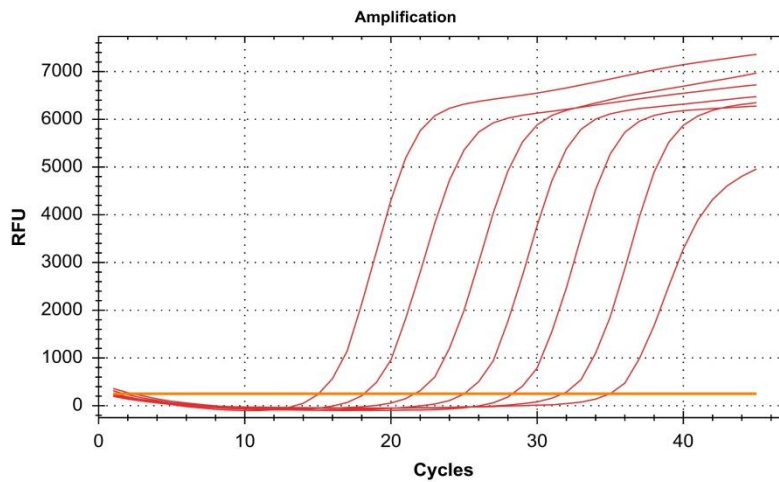
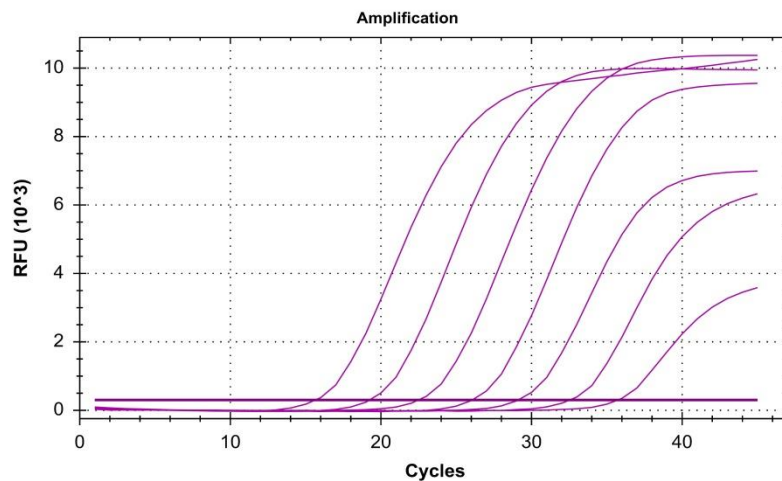


Figure 4. Dilution series of *N. meningitidis* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel Cy5).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common meningitis and encephalitis 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>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Cryptococcus gattii</i>	-	HSV-1	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	Dengue 1 virus strain Hawaii A	-	HSV-2	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	HHV 6 Type A and B	-
<i>Enterococcus faecium</i> VZA1	-	Dengue 3 virus strain H87	-	Varicella-Zoster Virus	-
<i>Enterococcus faecium</i> Serotype 11	-	Dengue 4 virus strain H241	-	Coxsackievirus A9	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Coxsackievirus A24	-
<i>Listeria innocua</i>	-	Yellow Fever Virus	-	Coxsackievirus B3	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-	St Louis Encephalitis Virus virus strain 17D	-	Echovirus 11	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	-	West Nile Virus Heja	-	Echovirus 30	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	-	West Nile Virus Ug37	-	Enterovirus 68	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup A	-	West Nile Virus strain H160/99	-	Enterovirus 71	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	Tick-Borne Encephalitis virus	-	Parechovirus Type 3	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Epstein-Barr virus	-		-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Citomegalovirus	-		-

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit for *H. influenzae* was evaluated against *Haemophilus influenzae* strain MinnA showing positive result.

The reactivity of VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit for *S. pneumoniae* was evaluated against *Streptococcus pneumoniae* strain Z022 showing positive result.

The reactivity of VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit for *N. meningitidis* was evaluated against *N. meningitidis* strain Z022 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
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler®480 Real-Time PCR System [#]
Roche	LightCycler®96 Real-Time PCR System [#]
Roche	Cobas z480 Analyzer [#]
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System †
DNA-Technology	DPrime 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 3 to check optical measurement exposure setting.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

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

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



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". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y/o *S. pneumoniae* en muestras de fluido cerebroespinal o sangre procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por meningitis. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *H. influenzae*, *N. meningitidis* y/o *S. pneumoniae* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras de fluido cerebroespinal, 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*.

2. Introducción y explicación

Las causas más comunes de meningitis bacteriana en adultos son *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Estos organismos se contagian de persona a persona por contacto cercano con secreciones respiratorias. Una vez adquiridas, cada especie puede colonizar la mucosa de la nasofaringe y la orofaringe, lo que se conoce como transporte faríngeo. Desde allí, pueden cruzar la mucosa y entrar en la sangre. Una vez en la sangre, pueden alcanzar las meninges, causando meningitis, u otros sitios del cuerpo causando otros síndromes. El término "meningitis" describe la inflamación de las membranas (meninges) que rodean y protegen el cerebro y la médula espinal. Los síntomas de la meningitis son fiebre repentina, dolor de cabeza y rigidez en el cuello. Puede haber otros síntomas, como náuseas, vómitos, fotofobia y alteración del estado mental. La meningitis bacteriana es una afección potencialmente mortal que requiere reconocimiento y tratamiento oportunos.

Haemophilus influenzae, un cocobacilo gramnegativo pleomórfico. Es un microorganismo comensal común del tracto respiratorio superior. Es un patógeno solo para el ser humano que puede causar una enfermedad invasiva grave, como son meningitis, neumonía y septicemia. Las cepas de *H. influenzae* se dividen en función de la presencia o ausencia de una cápsula de polisacárido; hay 6 serotipos encapsulados (Hia-Hif) y cepas de *H. influenzae* no encapsuladas y no tipificables (NTHi). Entre ellos, las cepas Hib se consideran las más frecuentes.

Neisseria meningitidis puede estar encapsulada o no encapsulada. Sin embargo, casi todos los organismos invasivos de *N. meningitidis* están encapsulados o rodeados por una cápsula de polisacárido. Este polisacárido capsular se usa para clasificar *N. meningitidis* en 12 serogrupos. Seis de estos serogrupos causan la gran mayoría de las infecciones en personas: A, B, C, W135, X e Y. Las epidemias de meningitis generalmente son causadas por el serogrupo A, aunque otros brotes también han sido causados por los serogrupos C, W135 y X.

Streptococcus pneumoniae causa infecciones graves como meningitis, neumonía adquirida en la comunidad (CAP), bacteriemia, bronquitis, sinusitis y otitis media. Hasta la fecha, se han identificado más de 90 serotipos diferentes de *S. pneumoniae* sobre la base de la estructura bioquímica del polisacárido capsular que es un importante factor de virulencia. La distribución de los serotipos puede variar según la edad, la geografía y el tiempo.



El cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR) se considera el estándar de referencia de diagnóstico para la meningitis bacteriana, y el aislamiento bacteriano es importante para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y la epidemiología molecular. Sin embargo, el cultivo de CSF requiere al menos un día o más, y tiene una sensibilidad limitada. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) del LCR y de la sangre se ha sugerido como una prueba de diagnóstico rápido para la meningitis bacteriana, y la amplificación del DNA de bacterias no viables, podría facilitar el diagnóstico en los casos del cultivo negativo. Usando múltiples enfoques analíticos, encontramos que los ensayos de qPCR en muestras de LCR y de sangre son altamentepreciados para el diagnóstico de meningitis por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*.

3. Procedimiento

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y/o *S. pneumoniae* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada de los genes *hdp* para *Haemophilus influenzae*, *lytA* y *piaA* para *Streptococcus pneumoniae* y *crtA* para *Neisseria meningitidis*.

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 *Haemophilus influenzae* se detecta en el canal FAM, *Streptococcus pneumoniae* se detecta en el canal ROX, *Neisseria meningitidis* se detecta en el canal Cy5 y el control interno(CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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-HNS1SL/ VS-HNS1SH	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-HNS1C	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HNS106L, VS-HNS106H, VS-HNS112L y VS-HNS112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-HNS1SL/ VS-HNS1SH	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-HNS1C	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> & <i>S. pneumoniae</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HNS113L y VS-HNS113H.

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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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. Extracción de DNA

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



Para la extracción de DNA a partir de muestras de fluido cerebroespinal o sangre 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.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

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



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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*H. influenzae*), ROX (*S. pneumoniae*), Cy5 (*N. meningitidis*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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 de *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae*. 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:

<i>H. influenzae</i> (FAM)	<i>S. pneumoniae</i> (ROX)	<i>N. meningitidis</i> (Cy5)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>N. meningitidis</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>N. meningitidis</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> Positivo <i>S. pneumoniae</i> y <i>N. meningitidis</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> y <i>S. pneumoniae</i> Positivos, y <i>N. meningitidis</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	<i>H. influenzae</i> y <i>N. meningitidis</i> Positivos, y <i>S. pneumoniae</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>S. pneumoniae</i> Positivo, <i>H. influenzae</i> y <i>N. meningitidis</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>S. pneumoniae</i> y <i>N. meningitidis</i> Positivos, <i>H. influenzae</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>N. meningitidis</i> Positivo, <i>H. influenzae</i> y <i>S. pneumoniae</i> Negativos
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

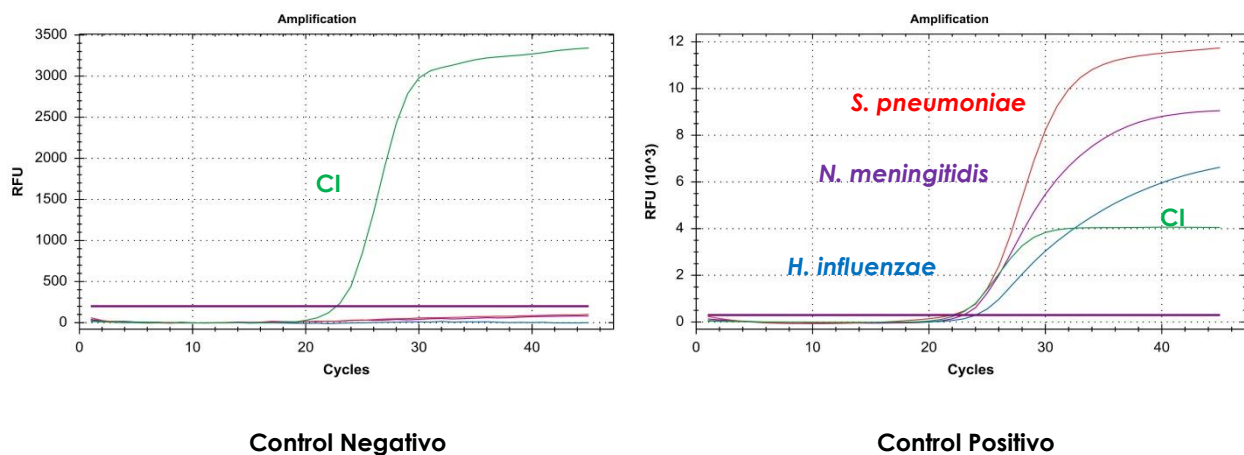
-: sin curva de amplificación



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

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

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ 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 (muestras de fluido cerebroespinal), aunque sólo ha sido validado con muestras de sangre.
- 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con dos paneles de muestras que la organización QCMD dispuso en el año 2017 (QCMD 2017 Central Nervous System II EQA Pilot Study and QCMD 2017 Respiratory Ill EQA Pilot Study). Estos paneles se componen de 18 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte y muestras salinas. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EEC. Todas las muestras *H. influenzae* (3/18), *N. meningitidis* (2/18) y *S. pneumoniae* (3/18) pudieron ser detectadas. En cambio, la muestra positiva para *Streptococcus agalactiae* pudo ser confirmada como negativa.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *H. influenzae*, *N. meningitidis* y/o *S. pneumoniae*; utilizando VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. (Figura 2, 3 y 4).

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

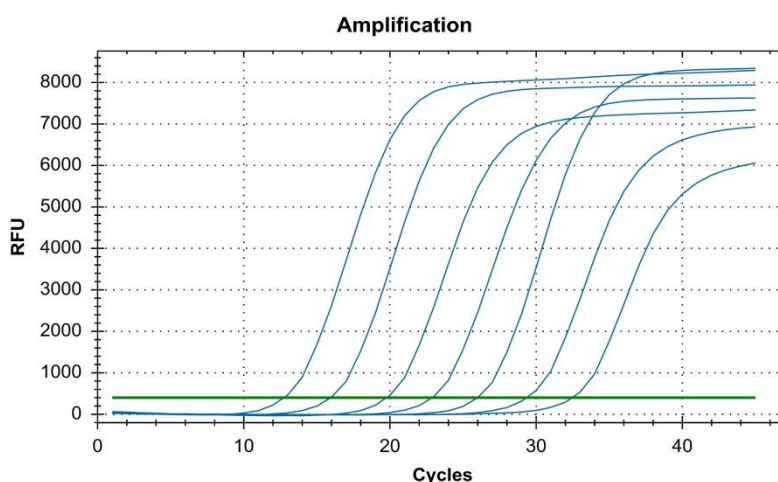


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar *S. pneumoniae* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

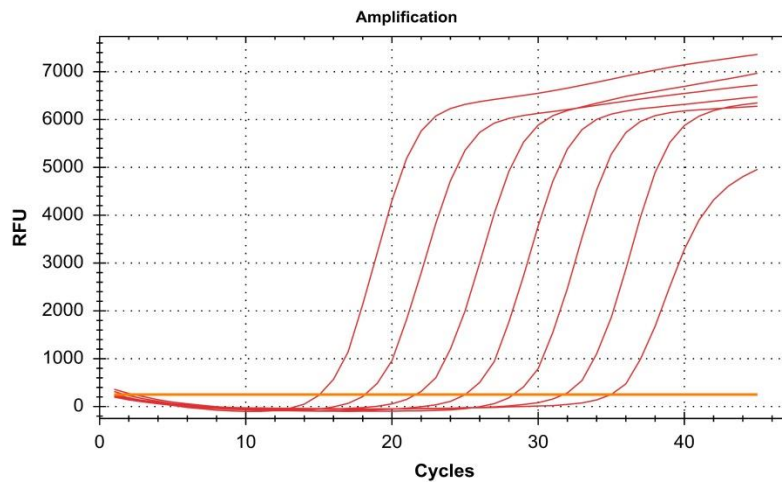
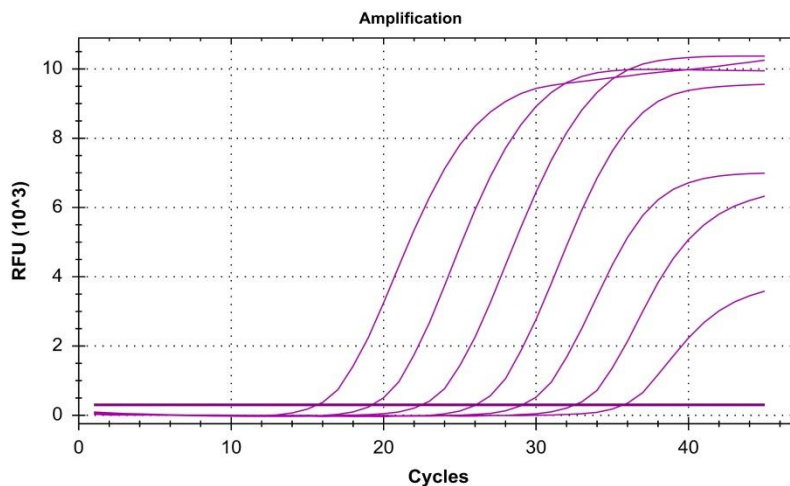


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar *N. meningitidis* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos de meningitis y encefalitis más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Cross-reactivity testing					
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Cryptococcus gattii</i>	-	HSV-1	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii A	-	HSV-2	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	HHV 6 Tipo A y B	-
<i>Enterococcus faecium</i> VZA1	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus Varicella-Zoster	-
<i>Enterococcus faecium</i> Serotipo 11	-	Virus Dengue 4 cepa H241	-	Coxsackievirus A9	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Coxsackievirus A24	-
<i>Listeria innocua</i>	-	Virus Yellow Fever	-	Coxsackievirus B3	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-	Virus St Louis Encephalitis Virus cepa 17D	-	Echovirus 11	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotipo 1/2b	-	Virus West Nile Heja	-	Echovirus 30	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Cepa CIP 59.53	-	Virus West Nile Ug37	-	Enterovirus 68	-
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogrupo A	-	Virus West Nile cepa H160/99	-	Enterovirus 71	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	Virus Tick-Borne Encefalitis	-	Parechovirus Tipo 3	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Epstein-Barr	-		-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Citomegalovirus	-		-

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit para *H. influenzae* se evaluó frente a *Haemophilus influenzae* cepa MinnA, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit para *S. pneumoniae* se evaluó frente a *Streptococcus pneumoniae* cepa Z022, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* Real Time PCR Detection Kit para *N. meningitidis* se evaluó frente a *N. meningitidis* cepa Z022, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. V. Thors *et al.* Population density profiles of nasopharyngeal carriage of 5 bacterial species in pre-school children measured using quantitative PCR offer potential insights into the dynamics of transmission. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2016;12:2, 375—382.
2. M. G. S. Carvalho *et al.* Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA. *Journal of clinical microbiology* 2007; 2460-2466.
3. C.E. Corless *et al.* Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septocemia Using Real-Time PCR. *Journal of clinical microbiology* 2001; 1553-1558.
4. K. Trzcinski *et al.* Superiority of Trans-Oral over Trans-Nasal Sampling in Detecting *Streptococcus pneumoniae* Colonization in Adults. *Plos One* 2013; 8(3): e60520.



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

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



ANEXO 1

Compatibilidad de los equipos a tiempo real más comunes

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

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler®480 Real-Time PCR System#
Roche	LightCycler®96 Real-Time PCR System#
Roche	Cobas z480 Analyzer#
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Stratagene / Agilent Technologies	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‡

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 3 para la configuración de los valores de exposición.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

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

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



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". 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 *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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).

VIASURE *H. influenzae*, *N. meningitidis* & *S. pneumoniae* 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).

- 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.







CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC