

VIASURE

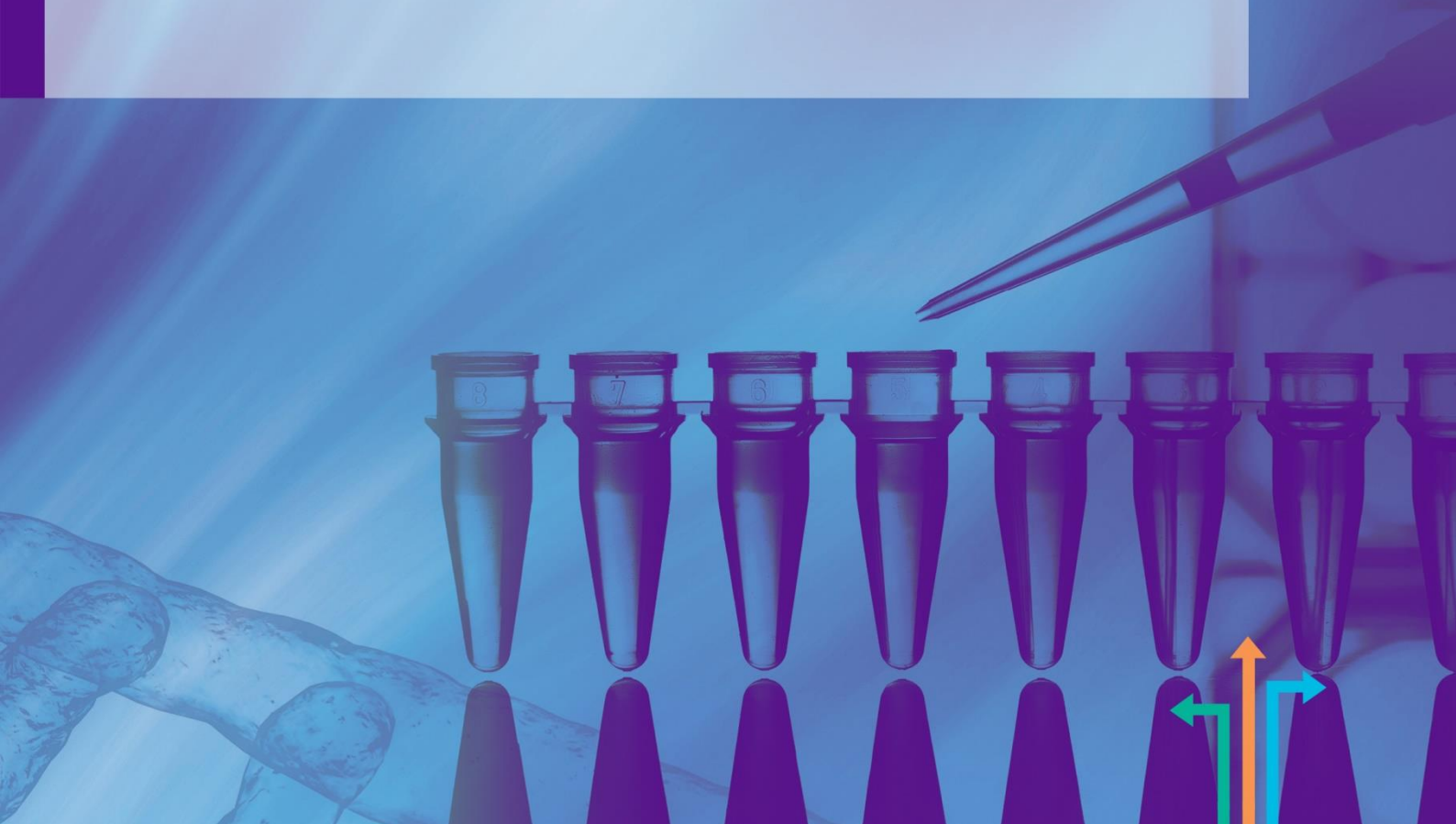
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Respiratory Panel I

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

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-RP0112L
VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-RP0112H
VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-RP0113L
VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-RP0113H



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) and/or Human Respiratory Syncytial Virus (RSV); human rhinovirus (HRV) and/or human enterovirus (HEV); human Adenovirus (AdV), Metapneumovirus (MPV) and/or Bocavirus (BoV); MERS Coronavirus 1 (MERS-CoV 1); MERS Coronavirus 2 (MERS-CoV 2); Coronavirus (CoV) 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains; and /or Parainfluenza 1 (PIV-1), Parainfluenza 2 (PIV-2), Parainfluenza 3 (PIV-3) and/or Parainfluenza 4 (PIV-4) in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Flu A, Flu B and/or RSV; HRV and/or HEV; AdV, MPV and/or BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains and/or Parainfluenza viruses in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA/DNA are extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for Flu A, Flu B and RSV; HRV and HEV; AdV, MPV and BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, OC43 and HKU1 strains and Parainfluenza viruses.

2. Summary and Explanation

Respiratory infections are a major global health problem, mainly affecting young children and the elderly in low- and middle-income countries. The causative agents of this type of infections are viral or bacterial, being viruses more frequently involved. The management of the infections is crucial to prevent epidemics or pandemics, so accurate and specific diagnosis tools are required.

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

Influenza B is divided into 2 antigenically and genetically distinct lineages, Victoria and Yamagata, whereas Influenza A viruses has been classified into subtypes based on the combinations of the envelope proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Currently, influenza A(H1N1) and A(H3N2) are the circulating seasonal influenza A virus subtypes. Besides, humans can also be infected with avian influenza virus subtypes A(H5N1) and A(H7N9) since their emergence in China in 2003 and 2013, respectively.

Human respiratory syncytial viruses (RSV) are an enveloped, single stranded linear RNA virus that belongs to the *Paramyxoviridae* family. RSV is divided into two major groups, A and B, based on antigenic and genomic differences. RSV is a common contributor of respiratory infections causing bronchitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages. People often feel some or all of these symptoms: rhinorrhea, low-grade fever, cough, sore throat, headache, and wheezing. RSV is transmitted via large



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

Human rhinoviruses (HRVs) and human enteroviruses (HEVs) are the most common cause of infections in people worldwide. They are members of the *Enterovirus* genus of the virus family *Picornaviridae*. HRVs include 153 currently known types divided into three species (A, B and C), while HEVs consist of 104 types belonging to four species (A, B, C and D). Traditionally, human enteroviruses are categorized into polioviruses and nonpolio enteroviruses (coxsackieviruses, echoviruses, and numbered enteroviruses).

HRVs are the usual cause of common cold but are also frequently found in otitis media, sinusitis, bronchitis, pneumonia, and asthma exacerbations. Therefore, due to they are restricted to the respiratory tract the mode of transmission are mostly the via aerosols of respiratory droplets and from fomites (contaminated surfaces), including direct person-to-person contact. Currently there is no specific antiviral treatment for rhinovirus infection.

In contrast to HRVs, replication of HEVs is not restricted to the respiratory tract but also can take place in the small intestine and spread to various target organs. They are readily transmitted from person to person through an air and/or via a fecal-oral route, or even through contaminated objects. Most HEV infections are asymptomatic or manifest common cold-like symptoms. However, HEV infections can be more severe, causing poliomyelitis, meningitis, encephalitis, myocarditis, exanthema, acute hemorrhagic conjunctivitis, and severe generalized infections in newborns. Therefore, sample collection for HEVs diagnosis should be performed according to clinical manifestations. Cerebrospinal fluid (CSF), blood, respiratory samples and stool samples are commonly used.

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 (AdV-A to AdV-F) that can cause human infections ranging from respiratory disease (mainly species AdV-B and C), and conjunctivitis (AsV-B and D), to gastroenteritis (AdV-F serotypes 40 and 41). Adenoviruses can be spread due to close personal contact or air transmission by coughing and sneezing. Manifestations of respiratory infections include common cold, fever, sore throat (pharyngitis), bronchitis and pneumonia.

Human Metapneumoviruses is an enveloped, single-stranded, negative-sense RNA virus that belongs to the *Paramyxoviridae* family. Clinical symptoms of Metapneumovirus include cough, fever, nasal congestion, and shortness of breath, and may progress to bronchiolitis or pneumonia. Metapneumovirus is mainly transmitted by infectious airborne droplets. Children younger than five years are the most susceptible to infection.

Human Bocaviruses are small non-enveloped single-stranded DNA viruses which belong to the *Parvoviridae* family. Bocaviruses are highly prevalent in co-infections with other pathogens. Clinical manifestations range from mild upper respiratory tract infections to bronchiolitis, and lower respiratory tract diseases, such as pneumonia. The common symptoms are fever, cough, acute otitis media, tonsillitis and conjunctivitis, sinusitis, and rhinorrhea.

Coronaviruses are enveloped, large single positive stranded RNA viruses classified as a family within the *Nidovirales* order. Four coronavirus genera have been identified: alpha, beta, gamma, and delta. All human coronaviruses belong to alpha and beta genera, and MERS-CoV belong to lineage C beta-coronaviruses.



MERS is considered a zoonotic infection. The virus is believed to be originated in bats thanks to the isolation of other lineage C beta-coronaviruses that are very close phylogenetically. However, camels are thought to be the major reservoir host and the animal source of infection in humans, carrying strains of MERS-CoV identical to human strains. Human-to-human transmission occurs due to close contact, probably via infected person's respiratory secretions. The clinical symptoms of MERS-CoV infection range from asymptomatic or mild respiratory symptoms to severe acute respiratory disease and death in nearly 40% of infected patients. Typical presentation of the disease includes fever, cough and shortness of breath. Pneumonia and gastrointestinal symptoms are also common findings.

Coronaviruses are large enveloped viruses containing a single-stranded RNA genome of positive polarity, which belong to the *Coronaviridae* family. They are directly related to diseases for the lower respiratory tract, gastrointestinal tract and central nervous system, being the most common symptoms the following: fever, digestive problems, rhinitis, pharyngitis, laryngitis, otitis, bronchitis, bronchiolitis, pneumonia or severe complications such as meningitis. Coronaviruses are characterized for their division into three serotypes or groups. Groups 1 and 2 refer to mammalian Coronaviruses, whilst group 3 consists of avian Coronaviruses. Common human Coronaviruses are the HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 and HCoV-HKU1 strains. Their pathways of transmission are unclear, being air suspected as their main vehicle of transmission, even though they are known to be ubiquitous to the environment.

Parainfluenza viruses (PIV) are enveloped, single negative-sense strand of RNA, which belong to the *Paramyxoviridae* family and are divided genetically and antigenically into 4 types. All of them can cause respiratory infections in infants, children, and adults; although the location of the infection and some symptoms depend on the type. PIV-1 and PIV-2 both cause upper and lower respiratory illness, such as cold and croup, with PIV-1 most often identified in children. PIV-3 is more often associated with lower illness (bronchiolitis, bronchitis, and pneumonia) and PIV-4 is recognized less often but may cause mild to severe respiratory illnesses. PIV usually spread from an infected person to others through the air by coughing and sneezing, close personal contact or touching objects or contaminated surfaces.

Respiratory infection diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. The diagnosis of these viruses and bacteria is traditionally based on cultures and serology methods, which have special requirements and are time-consuming. Therefore, Real Time PCR is the preferred method of diagnostic testing for respiratory infections considering that it is one of the most sensitive and specific diagnostic tool.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the Flu A, Flu B and/or RSV; HRV and/or HEV; AdV, MPV and/or BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains and/or Parainfluenzas viruses in respiratory samples. After DNA isolation, the identification of AdV and/or BoV, is performed by the amplification of a conserved region of the specific genes (Table 1) using specific primers and fluorescent-labelled probes. After RNA isolation, the detection of RNA viruses (Flu A, Flu B, RSV, HRV, HEV, MPV, MERS-CoV 1, MERS-CoV 2, CoV 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains and/or Parainfluenzas viruses (PIV-1, PIV-2, PIV-3 and PIV-4)) is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent



amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of specific genes using specific primers and a fluorescent-labelled probes (Table 1, Pathogens detected in each reaction tube and target genes).

Respiratory Panel I 8-well strip contains in each reaction well the following reaction mixes for the detection of the specific targets (Table 1):



	Code	Controls	Reaction mix placed into each well Pathogens and target genes
1	ABR	IC	Flu A, Flu B & RSV Flu A and Flu B (M1 gene), RSV (N gene)
2	RHE	IC	Rhinovirus + Enterovirus Rhinovirus and Enterovirus (conserved sequence of 5'UTR region)
3	AMB	IC	Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Adenovirus (hexon gene), Bocavirus (NS1 gene) and Metapneumovirus (N gene)
4	ME1	IC	MERS Coronavirus 1 MERS Coronavirus 1 (E gene (upE))
5	ME2	IC	MERS Coronavirus 2 MERS Coronavirus 2 (open reading frame 1a (ORF 1a))
6	COR	-	Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Strains 229E, OC43, NL63 and HKU1 (nucleoprotein gene)
7	PAC	IC	Parainfluenza 1+3 Parainfluenza 1 and Parainfluenza 3 (hemagglutinin-neuraminidase gene)
8	PBD	IC	Parainfluenza 2+4 Parainfluenza 2 (hemagglutinin-neuraminidase gene) and Parainfluenza 4 (fusion gene)

Table 1. *Respiratory Panel I* 8-well strips provided in VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit. Reaction mix placed into each well, pathogens detected and target genes. IC: Internal control. Note that the first well is marked with a hole on the top right corner.

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

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition (if present). Each DNA/RNA targets are amplified and detected in specific channels (FAM, HEX, ROX, and/or Cy5) and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE



channel (if present)(depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2)(Table 5).

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 2 and Table 3:

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Respiratory Panel I</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA/DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-RP0112L and VS-RP0112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
<i>Respiratory Panel I</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA/DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-RP0113L and VS-RP0113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA/DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.



VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-RP0113L and VS-RP0113H). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- **Make sure to put the strip in the correct direction. The first well is marked with a hole on the top right corner. Be careful not to invert the strip throughout PCR process.**
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.



- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult safety data sheets, upon request.

8. Test procedure

8.1. RNA/DNA extraction

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

For RNA/DNA extraction from respiratory samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA/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.
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, using COBAS® AmpliPrep (ROCHE).
- ZP02003 MagPurix Viral Nucleic Acids Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.) (Device intended to isolate viral nucleic acids from human respiratory specimens).
- ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.) (Device intended to isolate viral nucleic acids from human respiratory specimens).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)
- NX-48 Viral NA Kit, using the Nextactor® NX-48 system (Genolution) (Device intended to isolate nucleic acids from respiratory swab specimens).
- CLART PneumoVir (Genomica).

8.2. Lyophilized positive control

Respiratory Panel I Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Respiratory Panel I* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

8.3. PCR protocol

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



strips. **Make sure to put the strip in the correct direction (Table 1). The first well is marked with a hole on the top right corner.**

- 1) Reconstitute the number of strips you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA/DNA sample, reconstituted *Respiratory Panel I* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in the 8 wells of each strip and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

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

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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX (JOE or VIC) channels following Table 5. Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2).

The reaction mixes places in each well of *Respiratory Panel I* strip allow the detection of the specific target pathogens in the following channels (Table 5).

	Code	Channels			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ABR	Flu A	Internal Control	Flu B	RSV
2	RHE	Rhinovirus	Enterovirus	-	Internal Control
3	AMB	Adenovirus	Internal Control	Metapneumovirus	Bocavirus
4	ME1	MERS Coronavirus 1	Internal Control	-	-
5	ME2	MERS Coronavirus 2	Internal Control	-	-
6	COR	Coronavirus 229E	Coronavirus HKU1	Coronavirus NL63	Coronavirus OC43
7	PAC	Parainfluenza 3	Internal Control	-	Parainfluenza 1
8	PBD	Parainfluenza 4	Internal Control	-	Parainfluenza 2

Table 5. Pathogens identified in each detection channel.

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 controls of each well from *Respiratory Panel I* strip and the presence of signal for *Respiratory Panel I* positive control of each well from *Respiratory Panel I* strip. Check Internal Control signal (ABR, RHE, AMB, ME1, ME2, PAC and PBD, reaction mixes, apart from COR reaction mix) 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.

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

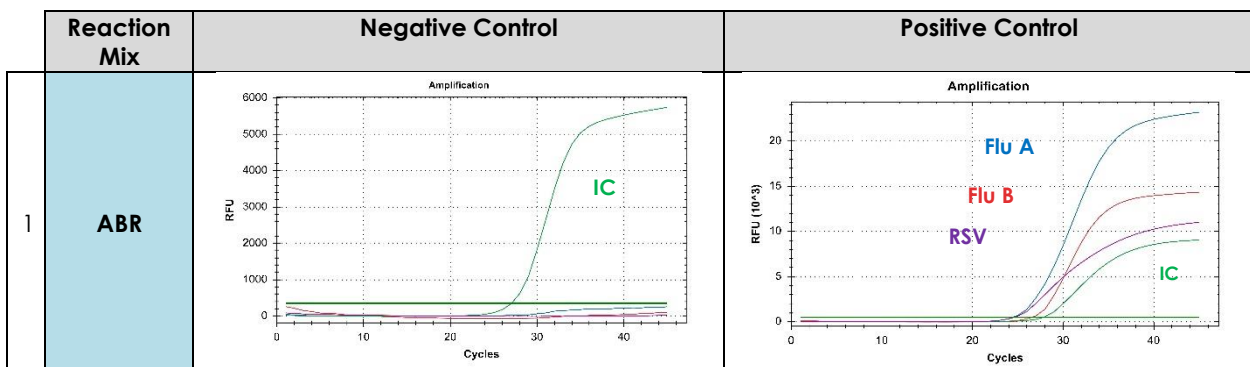
A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (if available). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control (if available).

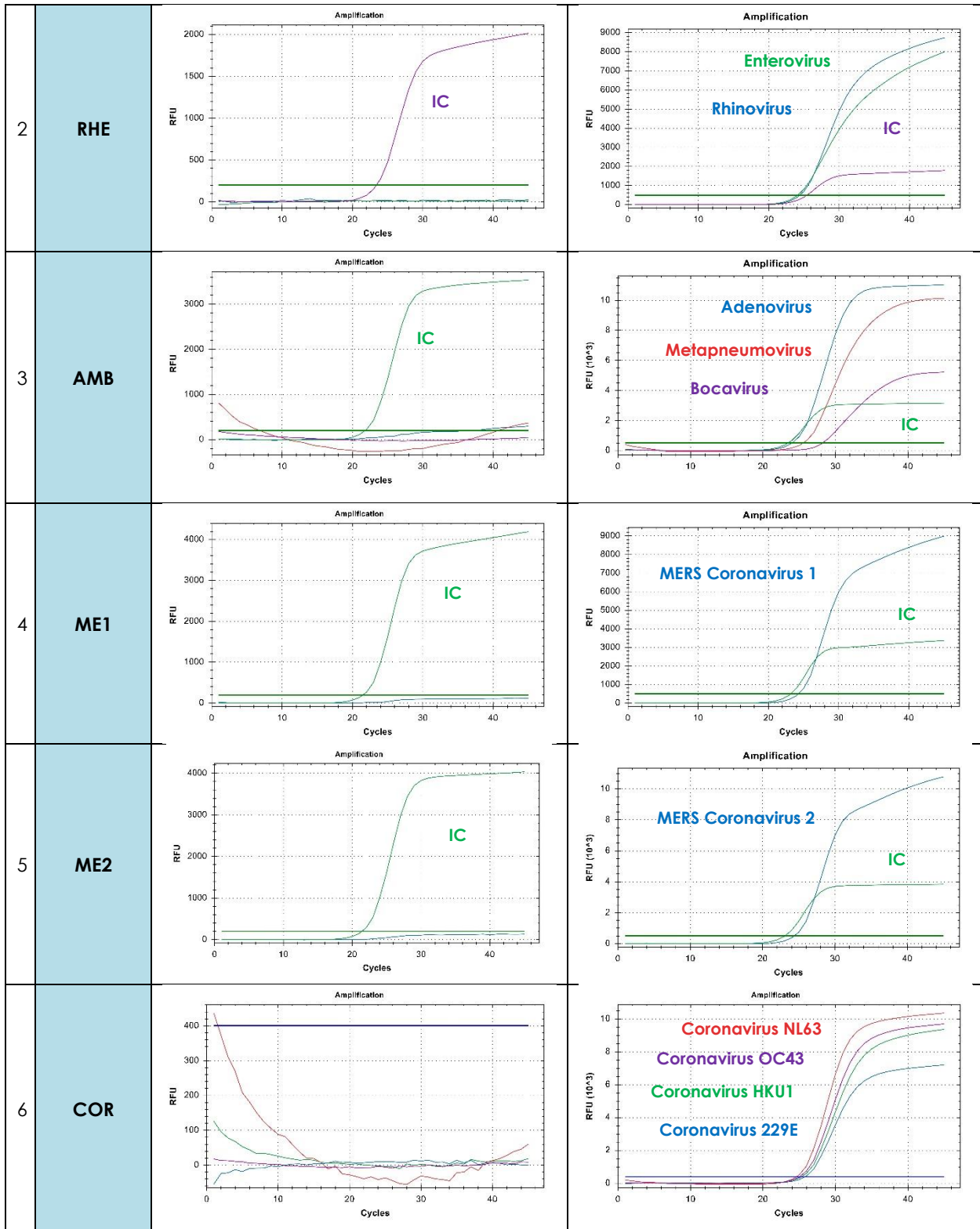
Using the following table read and analyze the results:



	Reaction Mix	Pathogens	Channels			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ABR	Flu A	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Flu B			Positive	
		RSV				Positive
2	RHE	Rhinovirus	Positive			
		Enterovirus		Positive		
		Internal Control				Positive/Negative
3	AMB	Adenovirus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Metapneumovirus			Positive	
		Bocavirus				Positive
4	ME1	MERS Coronavirus 1	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
5	ME2	MERS Coronavirus 2	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
6	COR	Coronavirus 229E	Positive			
		Coronavirus HKU1		Positive		
		Coronavirus NL63			Positive	
		Coronavirus OC43				Positive
7	PAC	Parainfluenza 3	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Parainfluenza 1				Positive
8	PBD	Parainfluenza 4	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Parainfluenza 2				Positive

Table 6. Sample interpretation. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.





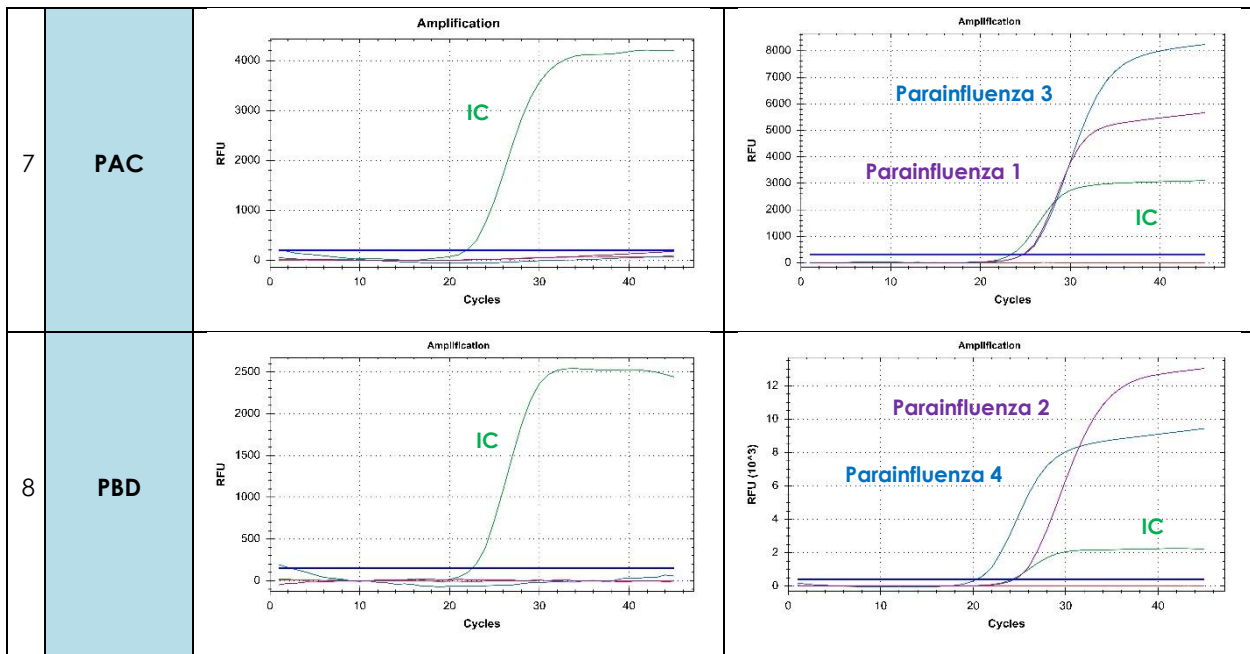


Table 7. Correct run of negative and positive controls run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

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

In case of absence of internal control signal in sample wells (with the exception of COR reaction mix), we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with RNA/DNA extracted from throat swab samples (ABR, PAC, PBD, AMB, RHE, COR); samples in transport medium (RHE, ME1 and ME2) and plasma samples (RHE).
- 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 Flu A, Flu B and/or RSV; HRV and/or HEV; AdV, MPV and/or BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains and/or Parainfluenzas viruses either by samples containing high concentrations of target RNA/DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of **Flu A, Flu B & RSV Reaction mix** was tested using 256 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method ("CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)).

The results were as follows:

Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	105	0	105
	-	2*	149	151
	Total	107	149	256

Table 8. Comparative results for Flu A.

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

Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	1*	204	205
	Total	52	204	256

Table 9. Comparative results for Flu B.

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

Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	41	0	41
	-	0	215	215
	Total	41	215	256

Table 10. Comparative results for RSV.

The clinical performance of **Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix** was tested using 187 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method ("CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)).

The results were as follows:



Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	87	13*#	100
	-	2*#	85	87
	Total	89	98	187

Table 11. Comparative results for Rhinovirus.

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

Besides, these sample have been evaluated by an additional commercial molecular detection method (FastTrack Respiratory Pathogens 33 or FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis)). These assays found 10/15 samples tested positive for Rhinovirus.

Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	78	2*#	80
	-	2*#	105	107
	Total	80	107	187

Table 12. Comparative results for Enterovirus.

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

Besides, these sample have been evaluated by an additional commercial molecular detection method (FastTrack Respiratory Pathogens 33 (FastTrack Diagnosis)). These assays found 3/4 samples tested negative for Enterovirus.

The clinical performance of **Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix** was tested using 142 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained by molecular detection method (FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)).

The results were as follows:

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	67	1*	68
	-	2*	72	74
	Total	69	73	142

Table 13. Comparative results for Adenovirus.

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

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	37	2*	39
	-	0	103	103
	Total	37	105	142

Table 14. Comparative results for Metapneumovirus.

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

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	34	0	34
	-	3*	105	108
	Total	37	105	142

Table 15. Comparative results for Bocavirus.

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



MERS Coronavirus Reaction mix was evaluated by six different panels: QCMD 2016 and 2017 panels for MERS Coronavirus EQA Programme, with INSTAND e.V.'s Virus Genome Detection – Coronaviruses 2016 and 2017 and with NEQAS for Microbiology: - Molecular detection of respiratory viruses program 2017-2018. These panels consist of 48 clinical samples (samples in transport medium, cell lysates, simulated nasopharyngeal and throat swabs, and nasopharyngeal aspirates). The results were compared with those presented by EQA programme final reports. All MERS Coronavirus samples (18/48) could be detected. In addition, MERS Coronavirus Negative and Non-MERS Coronavirus samples that were positive for other viruses (which include Coronavirus OC43 and Coronavirus NL63) could be confirmed as negative.

The clinical performance of **Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix** was tested using 45 respiratory specimens from EQA programs. These results were compared with the final EQA Reports. The results were as follows:

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	7	0	7
	-	0	38	38
	Total	7	38	45

Table 16. Comparative results for Coronavirus 229E.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	1	0	1
	-	0	44	44
	Total	0	44	45

Table 17. Comparative results for Coronavirus HKU1.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	11	0	11
	-	0	34	34
	Total	11	34	45

Table 18. Comparative results for Coronavirus NL63.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	18	0	18
	-	0	27	27
	Total	18	27	45

Table 19. Comparative results for Coronavirus OC43.

The clinical performance of **Parainfluenza Reaction mixes** were tested using 78 throat swab samples from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (CLART® PneumoVir (Genomica)). The results were as follows:



Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	0	1*	1
	-	1*#	76	77
	Total	1	77	78

Table 20. Comparative results for Parainflueza 1.

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

#Besides, these samples have been evaluated by an additional commercial kit (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirming our results.

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	0	0	0
	-	0	78	78
	Total	0	78	78

Table 21. Comparative results for Parainflueza 2.

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	40	1*#	41
	-	2*#	35	37
	Total	42	36	78

Table 22. Comparative results for Parainflueza 3.

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

#Besides, these samples have been evaluated by an additional commercial kit (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirming our results.

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	10	1*#	11
	-	0	67	67
	Total	10	68	78

Table 23. Comparative results for Parainflueza 4.

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

#Besides, these samples have been evaluated by an additional commercial kit (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirming our results.

The results show a high sensitivity and specificity to Flu A, Flu B and RSV; HRV and HEV; AdV, MPV and BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, OC43 and HKU1 strains and Parainfluenzas viruses using VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA/DNA copies per reaction for Flu A, Flu B and RSV; HRV and HEV; AdV, MPV and BoV; MERS-CoV; CoV 229E, NL63, HKU1 and OC43 and Parainfluenzas viruses.



12.3. Analytical specificity

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

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Respiratory Syncytial virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Human Parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Human Metapneumovirus A and B	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Human Coronavirus 229E, OC43 and NL63	-/+
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Human Adenovirus	-/+
<i>Legionella micdadei</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	-/+	Human Bocavirus	-/+
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	-/+	MERS Coronavirus	-/+
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Human Rhinovirus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8) virus	-/+	Enterovirus D68 and A71	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+	Echovirus Type 11 and 30	-/+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-/+	Coxsackievirus types A9, A21, A24, B3, and B4	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+		

Table 24. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **Flu A, Flu B & RSV Reaction mix**, was evaluated against Influenza A strains (A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus, A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)); both lineages of Influenza B (B/Brisbane/60/2008-like virus, B/Netherlands/207/06 virus, B/Florida/04/06 virus, B/Phuket/3073/2013 virus, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 and B/Maryland/15/2016); RSV (RSV A and RSV B) , showing positive result.



The reactivity of **Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix** was evaluated against specific Rhinovirus clinical specimens (HRV, HRV type A 8, HRV type A 16, HRV type A 30, HRV type A 49, HRV type A 90, type B 5, HRV type B 72 and HRV type C) and against Enterovirus specific species and types (Enterovirus D68 and A71, Echovirus Type 7, 11, 30 and 68, Coxsackievirus types A9, A21, A24, B3, and B4), showing positive results.

The reactivity of VIASURE **Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix**, was evaluated against Human Adenovirus using viral DNA extracted Human Adenovirus type 1, Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6, Human Adenovirus Type 3, strain GB, Human Adenovirus Type 4, strain RI-67, Human Adenovirus Type 5, Human Adenovirus Type 6, Human Adenovirus Type 8, Human Adenovirus Type 15 strain CH. 38, Human Adenovirus Type 31 strain 1315/63, Human Adenovirus 40 strain Dugan and Human Adenovirus 41 strain Tak, against Human Metapneumovirus genotypes A and B, and against Human Bocavirus, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **MERS Coronavirus Reaction mix**, was evaluated against MERS Coronavirus, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix**, was evaluated against strain 229E, NL63, HKU1 and OC43 of Human Coronavirus, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Parainfluenza 1+3 and Parainfluenza 2+4 Reaction mixes** were evaluated against Parainfluenza 1, 2, 3 and 4; showing positive result.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

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

(1) Select Ramp Speed "Standard".

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

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

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

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

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



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

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

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

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



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV); Rhinovirus humano (RVH) y/o Enterovirus humano (EVH); Adenovirus humano (AdV), Metapneumovirus (MPV) y/o Bocavirus (BoV); MERS Coronavirus 1 (MERS-CoV 1); MERS Coronavirus 2 (MERS-CoV 2); Coronavirus (CoV) cepas 229E, NL63, OC43 y/o HKU1; y/o Parainfluenza 1 (PIV-1), Parainfluenza 2 (PIV-2), Parainfluenza 3 (PIV-3) y/o Parainfluenza 4 (PIV-4); en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección respiratoria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Flu A, Flu B y/o RSV; RVH y/o EVH; AdV, MPV y/o BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, OC43 y/o HKU1; y/o virus Parainfluenzas en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA/DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, 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 Flu A, Flu B y RSV; RVH y EVH; AdV, MPV y BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, OC43 y HKU1; y virus Parainfluenzas.

2. Introducción y explicación

Las infecciones respiratorias son un importante problema de salud mundial, que afecta principalmente a niños pequeños y ancianos en países de bajos y medianos ingresos. Los agentes causantes de este tipo de infecciones son virales o bacterianos, siendo los virus más frecuentemente involucrados. El manejo de las infecciones es crucial para prevenir epidemias o pandemias, por lo que se requieren herramientas de diagnóstico precisas y específicas.

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

El virus de la Influenza B se divide en 2 linajes antigénicos y genéticamente distintos, Victoria y Yamagata, mientras que los virus de la Influenza A se dividen en subtipos de acuerdo con dos proteínas de la superficie del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Entre los muchos subtipos de Influenza A, en el ser humano están circulando en la actualidad los subtipos A(H1N1) y A(H3N2). En los años 2003 y 2013 se notificaron en China casos de infección en seres humanos con los virus de la gripe aviar Influenza A(H5N1) y A(H7N9).

El virus respiratorio sincitial humanos (RSV) es un virus envuelto cuyo genoma consiste en un RNA monocatenario lineal de sentido negativo no segmentado que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. El RSV se divide en dos grupos principales, A y B, en función de las diferencias antigénicas y genómicas. El virus Respiratorio Sincitial



humano es el principal agente causante de infecciones respiratorias como bronquitis, neumonía y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, pudiendo afectar a toda la población en un amplio rango de edad. Los pacientes afectados a menudo sienten algunos o todos estos síntomas: rinorrea, fiebre de bajo grado, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, y sibilancias. El RSV se transmite a través de grandes gotas de secreción nasofaríngea de individuos infectados, contacto cercano o auto inoculación tras tocar superficies contaminadas.

Los rinovirus humanos (RVH) y los enterovirus humanos (EVH) son la causa más común de infecciones en personas de todo el mundo. Son miembros del género *Enterovirus* de la familia de virus *Picornaviridae*. Los RVH incluyen 153 tipos conocidos actualmente divididos en tres especies (A, B y C), mientras que los EVH consisten en 104 tipos que pertenecen a cuatro especies (A, B, C y D). Tradicionalmente, los enterovirus humanos se clasifican en poliovirus y no enterovirus (coxsackievirus, echovirus y enterovirus numerados).

Los RVH son la causa habitual del resfriado común, pero también se encuentran con frecuencia en la otitis media, la sinusitis, la bronquitis, la neumonía y las exacerbaciones del asma. Por lo tanto, debido a que están restringidos al tracto respiratorio, el modo de transmisión es principalmente a través de aerosoles de gotitas respiratorias y de fómites (superficies contaminadas), incluido el contacto directo de persona a persona. Actualmente no existe un tratamiento antiviral específico para la infección por rinovirus.

A diferencia de los RVH, la replicación de EVH no está restringida al tracto respiratorio sino que también puede tener lugar en el intestino delgado y diseminarse a varios órganos diana. Se transmiten fácilmente de persona a persona a través del aire y / o vía fecal-oral, o incluso a través de objetos contaminados. La mayoría de las infecciones por EVH son asintomáticas o manifiestan síntomas comunes similares a los del resfriado. Sin embargo, las infecciones por EVH pueden ser más graves, causando poliomieltitis, meningitis, encefalitis, miocarditis, exantema, conjuntivitis hemorrágica aguda e infecciones generalizadas graves en recién nacidos. Por lo tanto, la recolección de muestras para el diagnóstico de EVH debe realizarse de acuerdo con las manifestaciones clínicas. El líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, muestras respiratorias y muestras de heces se usan comúnmente.

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* de virus no encapsulados y bicatenarios (ADNs). Hay más de 50 serotipos de adenovirus humanos inmunológicamente distintos clasificados en 6 especies (AdV-A a AdV-F) que pueden causar infecciones en humanos que van desde enfermedades respiratorias (principalmente especies AdV-B y C) y conjuntivitis (AsV-B y D), a la gastroenteritis (AdV-F serotipos 40 y 41). Los adenovirus pueden diseminarse debido al contacto personal cercano o la transmisión de aire al toser y estornudar. Las manifestaciones de infecciones respiratorias incluyen resfriado común, fiebre, dolor de garganta (faringitis), bronquitis y neumonía.

Metapneumovirus humano es un virus de RNA envuelto, monocatenario y de sentido negativo que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Los síntomas clínicos del Metapneumovirus incluyen tos, fiebre, congestión nasal y dificultad para respirar, y pueden progresar a bronquiolitis o neumonía. El metapneumovirus se transmite principalmente por gotas aéreas infecciosas. Los niños menores de cinco años son los más susceptibles a la infección.



Los Bocavirus humanos son pequeños virus no encapsulados de DNA monocatenario que pertenecen a la familia *Parvoviridae*. Los Bocavirus presentan alta prevalencia en coinfecciones con otros patógenos. Las manifestaciones clínicas varían desde infecciones leves del tracto respiratorio superior a bronquiolitis, y enfermedades de las vías respiratorias inferiores, como la neumonía. Los síntomas más comunes son fiebre, tos, otitis media, amigdalitis y conjuntivitis agudas, sinusitis y rinorrea.

Los coronavirus son virus encapsulados con una única gran hebra de RNA de sentido positivo que se clasifican como una familia dentro del orden *Nidovirales*. Se han identificado cuatro géneros de coronavirus: alfa, beta, gamma y delta. Todos los coronavirus humanos pertenecen a los géneros alfa y beta, y el MERS-CoV pertenece a los beta-coronavirus de linaje C.

El MERS se considera una infección zoonótica. Se cree que el virus se originó en murciélagos gracias al aislamiento de otros beta-coronavirus de linaje C muy próximos filogenéticamente. Sin embargo, se piensa que los camellos son el principal reservorio huésped y la fuente de infección para los humanos, ya que portan cepas de MERS-CoV idénticas a las humanas. La transmisión entre humanos se produce por contacto próximo, probablemente a través de las secreciones respiratorias de las personas infectadas. Los síntomas clínicos de la infección por MERS-CoV van desde asintomáticos o síntomas respiratorios leves a enfermedad respiratoria aguda y fallecimiento de casi un 40% de los pacientes infectados. La presentación típica de la enfermedad incluye fiebre, tos y falta de aire. También se dan frecuentemente neumonía y problemas gastrointestinales.

Los coronavirus son virus envueltos con un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, que pertenece a la familia *Coronaviridae*. Están directamente relacionados con enfermedades del tracto respiratorio, digestivo o el sistema nervioso central. Siendo los síntomas más comunes los siguientes: fiebre, problemas digestivos, rinitis, faringitis, laringitis, otitis, bronquitis, bronquiolitis, neumonía o complicaciones más severas como la meningitis. Los Coronavirus están divididos en tres grupos o serotipos, el 1 y 2, que comprenden los Coronavirus de mamíferos y el grupo 3 o de Coronavirus aviarios. Los Coronavirus que afectan a los humanos de forma más común son las cepas HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1. Aunque sus vías de transmisión no están claramente especificadas, pese a ser un virus ubicuo, se sospecha que el aire pueda ser su principal vehículo de transmisión.

Los virus de parainfluenza (PIV) son cadenas de RNA con sentido negativo único, que pertenecen a la familia *Paramyxoviridae* y se dividen genéticamente y antigénicamente en 4 tipos. Todos ellos pueden causar infecciones respiratorias en bebés, niños y adultos; aunque la localización de la infección y algunos de los síntomas dependen del tipo. La infección por HPIV-1 y HPIV-2 da lugar enfermedades respiratorias del tracto superior e inferior, como resfriado y gripe, siendo el virus HPIV-1 más frecuentemente identificado en niños. HPIV-3 se asocia principalmente con enfermedades respiratorias del tracto inferior (bronquiolitis, bronquitis y neumonía) y HPIV-4 se reconoce con menos frecuencia, pero pueden causar enfermedades respiratorias leves y graves. HPIV se suele propagar de una persona infectada a otras personas a través del aire debido la tos y los estornudos, contacto personal o tocando objetos o superficies contaminados con HPIV.

El diagnóstico puede ser problemático, ya que una amplia gama de patógenos puede causar infecciones respiratorias agudas que se presentan con síndromes clínicos similares. El diagnóstico de estos virus y bacterias se basa tradicionalmente en métodos de cultivo y serología, que tienen requisitos especiales y requieren mucho



tiempo. Por lo tanto, PCR en tiempo real es el método preferido de pruebas de diagnóstico para infecciones respiratorias, ya que es una de las herramientas de diagnóstico más sensibles y específicas.

3. Procedimiento

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de Flu A, Flu B y/o RSV; HRV y/o HEV; AdV, MPV y/o BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, OC43 y/o HKU1 y/o virus Parainfluenzas en muestras respiratorias. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de AdV y/o BoV se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes específicos (Tabla 1) utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia. Tras el aislamiento de RNA, la detección de virus de RNA (Flu A, Flu B, RSV, HRV, HEV, MPV, MERS-CoV 1, MERS-CoV 2, CoV cepas 229E, NL63, OC43 y/o HKU1 y/o virus Parainfluenza (PIV-1, PIV-2, PIV-3 y PIV-4)) se realiza mediante una RT en tiempo real en el que la transcripción inversa y la posterior amplificación de la secuencia diana específica se producen en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación 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 de los genes específicos. (Tabla 1, Patógenos detectados en cada tubo de reacción y genes diana).

La tira de 8 pocillos de VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo las siguientes mezclas de reacción para la detección de las dianas específicas (Tabla 3):

	Código	Controles	Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo Patógenos y genes diana
1	ABR	IC	Flu A, Flu B & RSV Flu A and Flu B (gen M1), RSV (gen N)
2	RHE	IC	Rhinovirus + Enterovirus Rhinovirus y Enterovirus (region conservada del gen 5'UTR)
3	AMB	IC	Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Adenovirus (gen hexon), Bocavirus (gen NS1) y Metapneumovirus (gen N)
4	ME1	IC	MERS Coronavirus 1 MERS Coronavirus 1 (gen E (upE))
5	ME2	IC	MERS Coronavirus 2 MERS Coronavirus 2 (open reading frame 1a (ORF 1a))
6	COR	-	Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Cepas 229E, OC43, NL63 y HKU1 (gen nucleoprotein)
7	PAC	IC	Parainfluenza 1+3 Parainfluenza 1 y Parainfluenza 3 (gen hemagglutinin-neuraminidase)
8	PBD	IC	Parainfluenza 2+4 Parainfluenza 2 (gen hemagglutinin-neuraminidase) y Parainfluenza 4 (gen fusion)

Tabla 3. Respiratory Panel I 8-well strips incluidas in VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit. Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo, patógenos detectados y genes diana. CI: Control interno Observe que el primer pocillo de la tira está marcado por el agujero en la esquina superior derecha.

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa (si está presente). Cada diana de DNA/RNA se amplifica y detecta en canales específicos (FAM, HEX, ROX y Cy5) y el control interno (CI) en el canal HEX, VIC o JOE (si está presente) (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2) (Tabla 5).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 2 y 3:

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Respiratory Panel I</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Panel I</i> Positive Control	cDNA/DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-RP0112L y VS-RP0112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Respiratory Panel I</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Respiratory Panel I</i> Positive Control	cDNA/DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-RP0113L y VS-RP0113H.



5. Material requerido y no suministrado

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

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA/DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Respiratory Panel I* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.



- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-RP0113L y VS-RP0113H). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- **Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta. El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha. Tenga cuidado de no invertir la tira durante todo el proceso de PCR.**
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de RNA/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 RNA/DNA a partir muestras respiratorias, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA/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.
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit, utilizando COBAS® AmpliPrep (ROCHE).



- ZP02003 MagPurix Viral Nucleic Acids Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.) (Dispositivo destinado a aislar ácidos nucleicos virales de muestras respiratorias humanas).
- ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.) (Dispositivo destinado a aislar ácidos nucleicos virales de muestras respiratorias humanas).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)
- NX-48 Viral NA Kit, utilizando Nexttractor® NX-48 system (Genolution) (Dispositivo destinado a aislar ácidos nucleicos a partir de hisopos respiratorios).
- CLART PneumoVir (Genomica).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Respiratory Panel I* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Respiratory Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de tiras 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. **Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta (Tabla 1). El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.**

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA/DNA extraído de cada muestra, de *Respiratory Panel I* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en los 8 pocillos de cada strip y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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



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

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX (JOE o VIC). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2).

Las mezclas de reacción situadas en cada pocillo de la tira de *Respiratory Panel I* permiten la detección específica de cada patógeno en los siguientes canales (Tabla 5).

	Código	Canales			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ABR	Flu A	Internal Control	Flu B	RSV
2	RHE	Rhinovirus	Enterovirus	-	Internal Control
3	AMB	Adenovirus	Internal Control	Metapneumovirus	Bocavirus
4	ME1	MERS Coronavirus 1	Internal Control	-	-
5	ME2	MERS Coronavirus 2	Internal Control	-	-
6	COR	Coronavirus 229E	Coronavirus HKU1	Coronavirus NL63	Coronavirus OC43
7	PAC	Parainfluenza 3	Internal Control	-	Parainfluenza 1
8	PBD	Parainfluenza 4	Internal Control	-	Parainfluenza 2

Table 5. Patógenos identificados en cada canal de detección.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el control negativo de cada pocillo de la tira de *Respiratory Panel I* y la presencia de señal para el control positivo del *Respiratory Panel I* de cada pocillo de la tira de *Respiratory Panel I*. Comprobar la emisión de la señal del control interno (mezclas de reacción ABR, RHE, AMB, ME1, ME2, PAC y PBD, excepto la mezcla de reacción COR) 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.

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno (si lo presenta) o control de extracción 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.



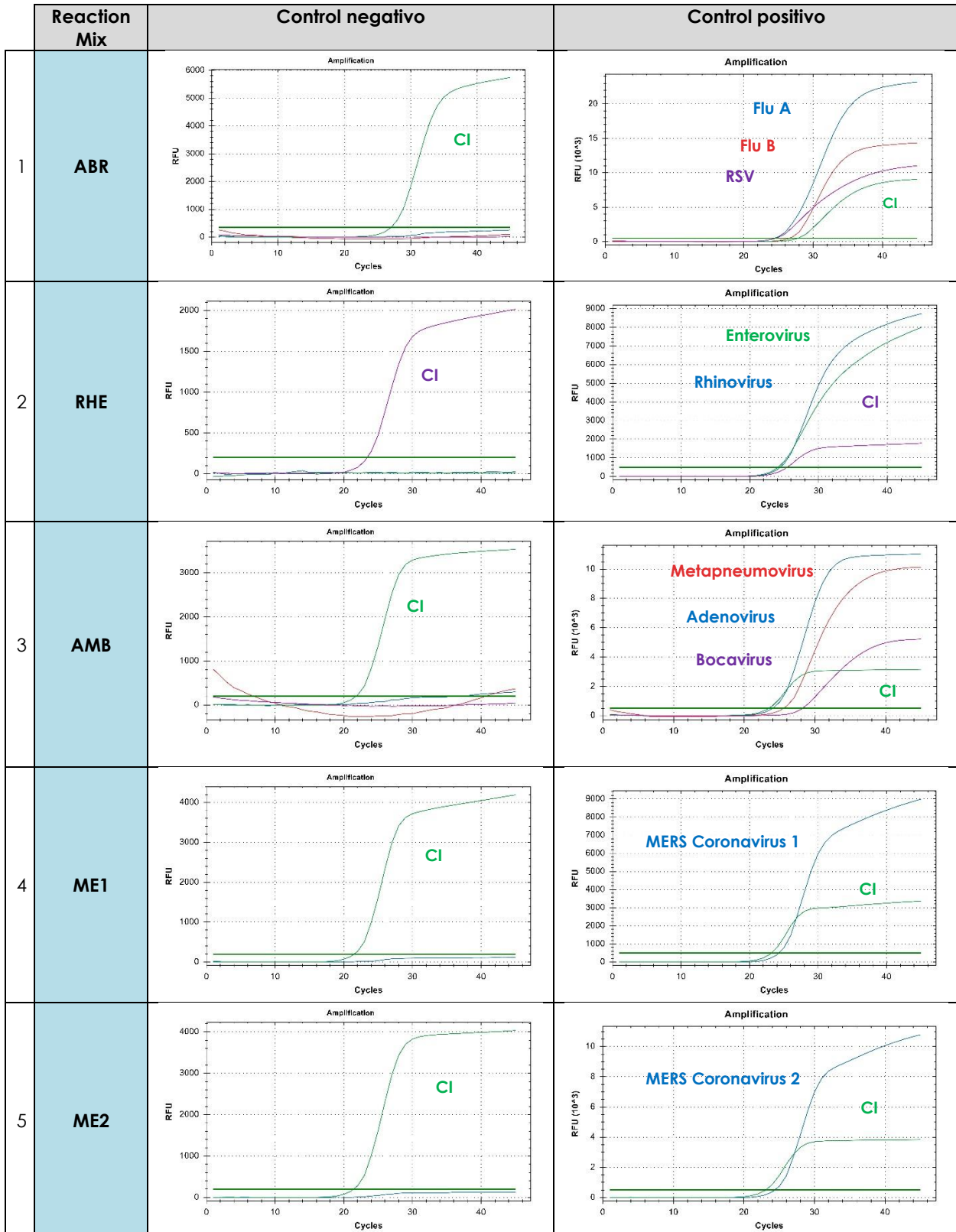
Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno (si lo presenta) si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno (si lo presenta).

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

	Reaction Mix	Patógenos	Canales			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ABR	Flu A	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
		Flu B			Positivo	
		RSV				Positivo
2	RHE	Rhinovirus	Positivo			
		Enterovirus		Positivo		
		Control interno				Positivo/Negativo
3	AMB	Adenovirus	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
		Metapneumovirus			Positivo	
		Bocavirus				Positivo
4	ME1	MERS Coronavirus 1	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
5	ME2	MERS Coronavirus 2	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
6	COR	Coronavirus 229E	Positivo			
		Coronavirus HKU1		Positivo		
		Coronavirus NL63			Positivo	
		Coronavirus OC43				Positivo
7	PAC	Parainfluenza 3	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
		Parainfluenza 1				Positivo
8	PBD	Parainfluenza 4	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
		Parainfluenza 2				Positivo

Tabla 6. Interpretación de la muestra Positivo: curva de amplificación. Vacío: sin curva de amplificación.





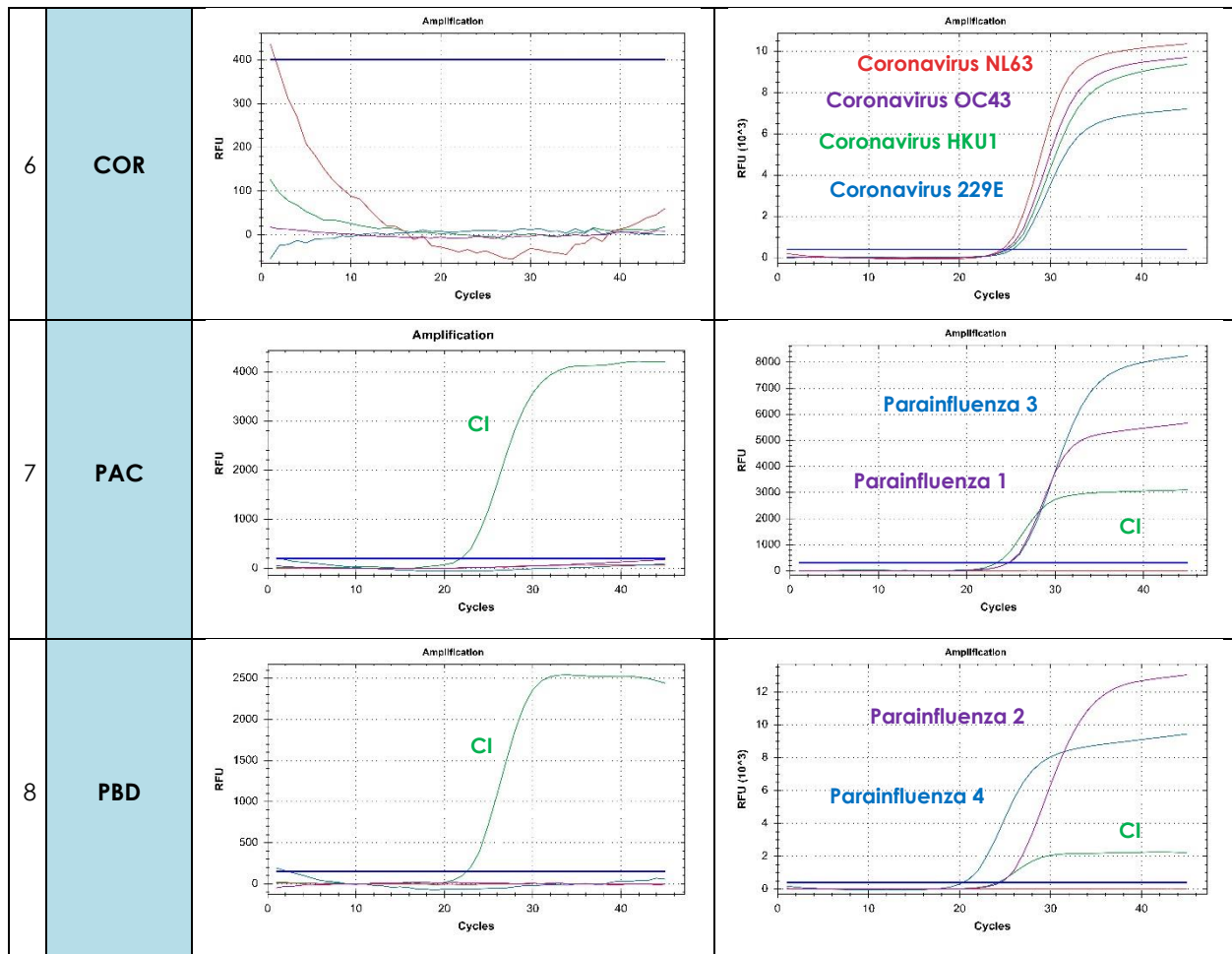


Tabla 7. Amplificación de control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

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 (excepto en la mezcla de reacción COR), se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.



- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado solo con RNA/DNA extraído de muestras frotis faríngeo (ABR, PAC, PBD, AMB, RHE, COR); muestras en medio de transporte (RHE, ME1 y ME2) y muestras de plasma (RHE).
- 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 Flu A, Flu B y/o RSV; HRV y/o HEV; AdV, MPV y/o BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, OC43 y/o HKU1 y/o virus Parainfluenzas, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA/DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 256 muestras respiratorias (frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando **Flu A, Flu B & RSV Reaction mix**. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular ("CLART®PneumoVir DNA array" (Genómica)). Los resultados fueron los siguientes:

Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genómica)			
		+	-	Total
	+	105	0	105
	-	2*	149	151
Total		107	149	256

Tabla 8. Comparativa de resultados para Influenza A.

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

Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genómica)			
		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	1*	204	205
Total		52	204	256

Tabla 9. Comparativa de resultados para Influenza B.

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



Flu A, Flu B & RSV Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	41	0	41
	-	0	215	215
	Total	41	215	256

Tabla 10. Comparativa de resultados para RSV.

Se evaluaron 187 muestras respiratorias (frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando **Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix**. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular ("CLART®PneumoVir DNA array" (Genomica)). Los resultados fueron los siguientes:

Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	87	13*#	100
	-	2*#	85	87
	Total	89	98	187

Tabla 11. Comparativa de resultados para Rhinovirus.

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

Además, estas muestras han sido evaluadas por un método de detección molecular comercial adicional (FastTrack Respiratory Pathogens 33 o FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis)). Estos ensayos encontraron 10/15 muestras positivas para Rhinovirus.

Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix	"CLART® PneumoVir DNA array" (Genomica)			
		+	-	Total
	+	78	2*#	80
	-	2*#	105	107
	Total	80	107	187

Tabla 12. Comparativa de resultados para Enterovirus.

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

Además, estas muestras han sido evaluadas por un método de detección molecular comercial adicional (FastTrack Respiratory Pathogens 33 (FastTrack Diagnosis)). Estos ensayos encontraron 3/4 muestras negativas para Enterovirus.

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix se evaluó utilizando 142 muestras respiratorias (frotis de garganta) de pacientes sintomáticos. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)).

Los resultados fueron los siguientes:

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	67	1*	68
	-	2*	72	74
	Total	69	73	142

Tabla 13. Comparativa de resultados para Adenovirus.



Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	37	2*	39
	-	0	103	103
	Total	37	105	142

Tabla 14. Comparativa de resultados para Metapneumovirus.

Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix	FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track)			
		+	-	Total
	+	34	0	34
	-	3*	105	108
	Total	37	105	142

Tabla 15. Comparativa de resultados para Bocavirus.

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

MERS Coronavirus Reaction mix se evaluó mediante 6 paneles diferentes: QCMD 2016 y 2017 MERS Coronavirus EQA Programme, con INSTAND e.V.'s Virus Genome Detection – Coronaviruses 2016 y 2017 y con NEQAS for Microbiology - Molecular detection of respiratory viruses program 2017-2018. Estos paneles constan de 48 muestras clínicas (muestras en medio de transporte, lisados celulares, frotis simulados nasofaríngeos y de garganta, y aspirados nasofaríngeos). Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQA para la detección de MERS Coronavirus. Todas las muestras del MERS Coronavirus (18/48) pudieron ser detectadas. Además, tanto las muestras MERS Coronavirus negativas como las MERS Coronavirus negativas pero positivas para otros virus (incluyendo el Coronavirus OC43 y el Coronavirus NL63) pudieron ser confirmadas como negativas.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix se evaluó con muestras procedentes de los paneles EQA. Las características clínicas del test VIASURE se testaron utilizando 45 muestras. Los resultados se compararon con los reports finales de los programas EQA. Los resultados fueron los siguientes:

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	7	0	7
	-	0	38	38
	Total	7	38	45

Tabla 16. Comparativa de resultados para Coronavirus 229E.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	1	0	1
	-	0	44	44
	Total	0	44	45

Tabla 17. Comparativa de resultados para Coronavirus HKU1.



Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	11	0	11
	-	0	34	34
	Total	11	34	45

Tabla 18. Comparativa de resultados para Coronavirus NL63.

Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix	EQA reports			
		+	-	Total
	+	18	0	18
	-	0	27	27
	Total	18	27	45

Tabla 19. Comparativa de resultados para Coronavirus OC43.

Parainfluenza Reaction mixes se evaluaron utilizando 78 muestras de frotis de garganta de pacientes sintomáticos. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (CLART® PneumoVir (Genomica)).

Los resultados fueron los siguientes:

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	0	1*	1
	-	1*#	76	77
	Total	1	77	78

Tabla 20. Comparativa de resultados para Parainfluenza 1.

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

Además, esta muestra ha sido evaluada por un método de detección molecular comercial adicional (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirmando nuestros resultados.

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	0	0	0
	-	0	78	78
	Total	0	78	78

Tabla 21. Comparativa de resultados para Parainfluenza 2.

Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genomica)			
		+	-	Total
	+	40	1*#	41
	-	2*#	35	37
	Total	42	36	78

Tabla 22. Comparativa de resultados para Parainfluenza 3.

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

Además, esta muestra ha sido evaluada por un método de detección molecular comercial adicional (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirmando nuestros resultados.



Parainfluenza Reaction mix	CLART® PneumoVir DNA array (Genómica)			
		+	-	Total
	+	10	1*#	11
	-	0	67	67
Total		10	68	78

Tabla 23. Comparativa de resultados para Parainfluenza 4.

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

Además, esta muestra ha sido evaluada por un método de detección molecular comercial adicional (RIDA®GENE Parainfluenza (R-Biopharm)), confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para Flu A, Flu B y RSV; HRV y HEV; AdV, MPV y BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, OC43 y HKU1 y virus Parainfluenzas utilizando VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para Flu A, Flu B y RSV; RVH y EVH; AdV, MPV y BoV; MERS-CoV; CoV cepas 229E, NL63, HKU1 y OC43 y virus Parainfluenzas.

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo Respiratory Panel I fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectó reactividad cruzada entre casi ninguno de los siguientes microorganismos probados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Virus Respiratorio Syncytial	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	-	Virus Parainfluenza humana 1, 2, 3 y 4	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Metapneumovirus humano A y B	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	Coronavirus humano 229E	-/+
<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-/+	Adenovirus humano	-/+
<i>Legionella micdadei</i>	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	-/+	Bocavirus humano	-/+
<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-/+	MERS Coronavirus	-/+
<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-/+	Rhinovirus humano	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 virus (H5N8)	-/+	Enterovirus D68 y A71	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	-/+	Echovirus tipos 11 y 30	-/+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-/+	Coxsackievirus tipos A9, A21, A24, B3, y B4	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-/+		

Tabla 24. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Respiratory Panel I Real Time PCR Detection Kit para **Flu A, Flu B & RSV Reaction mix**, se evaluó frente a las cepas de virus Influenza A (A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09, A/Perth/16/2009(H3N2)-like, A/Thüringen/5/17 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2), A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8), A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8), A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 y A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C) y ambos linajes de virus Influenza B (B/Brisbane/60/2008-like, B/Netherlands/207/06, B/Florida/04/06, B/Phuket/3073/2013, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus y B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 y B/Maryland/15/2016), **RSV** (RSV A y RSV B), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE **Rhinovirus + Enterovirus Reaction mix**, se evaluó para **Rinovirus** frente a especímenes clínicos específicos de Rinovirus RVH, RVH tipo A 8, RVH tipo A 16, RVH tipo A 30, RVH tipo A 49, RVH tipo A 90, tipo B 5, RVH tipo B 72 y RVH tipo C y para **Enterovirus** frente a Enterovirus D68 y A71, Echovirus Tipo 7, 11, 30 y 68, Coxsackievirus tipos A9, A21, A24, B3, y B4, mostrando resultados positivos.



La reactividad de VIASURE **Adenovirus, Metapneumovirus & Bocavirus Reaction mix**, se evaluó frente a Adenovirus humano utilizando DNA viral extraído Adenovirus humano tipo 1, Adenovirus humano 2 cepa Adenoid 6, Adenovirus humano Tipo 3, cepa GB, Adenovirus humano Tipo 4, cepa RI-67, Adenovirus humano Tipo 5, Adenovirus humano Tipo 6, Adenovirus humano Tipo 8, Human Adenovirus tipo 15 cepa CH. 38, cepa 1315/63 del Adenovirus humano Tipo 31, cepa Dugan del Adenovirus 40 humano y la cepa Tak del Adenovirus 41 humano., Metapneumovirus humano genotipos A y B, y Bocavirus humano, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE **MERS Coronavirus Reaction mix**, se evaluó frente a MERS Coronavirus, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE **Coronavirus 229E, NL63, OC43 & HKU1 Reaction mix**, se evaluó frente a las cepas 229E, NL63, HKU1 y OC43 de Coronavirus humano, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE **Parainfluenza 1+3 and Parainfluenza 2+4 Reaction mixes** se evaluaron frente a Parainfluenza 1, 2, 3 y 4; mostrando resultados positivos.

13. Bibliography/Bibliografía

1. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
3. R.L. Kuo *et al.* Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
4. W.P. Glezen *et al.* The burden of Influenza B: A structured literature review. *American Journal of Public Health* 2013; 103(3): 43-51.
5. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
6. C. E. French *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016;10(4): 268-290.
7. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189- 192.
8. A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
9. M. Hindiyeh *et al.* Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424 .
10. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Accessed 2015 Dec 30.
11. R.Österback *et al.* Simultaneous Detection and Differentiation of Human Rhino- and Enteroviruses in Clinical Specimens by Real-Time PCR with Locked Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 3960-3967.



12. H. Harvala *et al.* Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology* 2018; vol.101, 11-17.
13. K.K.W. To *et al.* Rhinovirus respiratory tract infection in hospitalized adult patients is associated with TH2 response irrespective of asthma. *The Journal of infection* 2018; S0163-4453(18)30058-6.
14. A Heim. *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003; 70: 228–239.
15. 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.
16. V. Peltola *et al.* Human Bocavirus Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2013; 32 (2): 178-179.
17. V. Babkin *et al.* A study of the human bocavirus replicative genome structures. *Virus Research* 2015; 15: 196-202.
18. X. Deng *et al.* Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *Journal of Virological Methods* 2014; 195: 112–119.
19. W. Shen *et al.* Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1. *Journal of Virology* 2015; 89: 10097-10109.
20. S. Esposito *et al.* Identification of Human Adenovirus in Respiratory Samples with Luminex Respiratory Virus Panel Fast V2 Assay and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Molecular Science* 2016; 17(3):297.
21. J. Klemenc *et al.* Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Improved Detection of Human Metapneumovirus. *Journal of Clinical Virology* 2012; 54(4):371-5.
22. J.E Schuster *et al.* Human Metapneumovirus. *Pediatrics in review* 2013 ; 34(12) : 558-565.
23. S. Panda *et al.* Human Metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International Journal of Infectious Diseases* 2014; 25:45-52.
24. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/Metapneumovirus/clinical.html>
25. V.M. Corman *et al.* Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *European Surveillance* 2012; 17(39). pii: 20285. Erratum in: *European Surveillance* 2012; 17(40): pii/20288.
26. V.M. Corman *et al.* Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *European Surveillance* 2012; 17(49): pii: 20334.
27. A. Zumla *et al.* Middle East Respiratory Syndrome. *Lancet* 2015; 386(9997): 995–1007.
28. A.S. Omrani *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): animal to human interaction. *Pathogens and Global Health* 2015; 109(8): 354-362.
29. A.H. Mohd *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology Journal* 2016; 13: 87.
30. I.M. Mackay *et al.* MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal* 2015; 12: 222.
31. Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/index.html>).
32. World Health Organization (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/mers-cov/en/>).



33. E. R. Gaunt, *et al.* Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63 and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 2940-2947.
34. M. K. Ijaz, *et al.* Survival Characteristics of Airborne Human Coronavirus 229E. *Journal of General Virology*, 1985; 66: 2743-2748.
35. Astrid Vabret, *et al.* An Outbreak of Coronavirus OC43 Respiratory Infection in Normandy, France. *Clinical Infectious Diseases*, 2003; 36 (8): 985-989.
36. Julien R. St-Jean, *et al.* Human Respiratory Coronavirus OC43: Genetic Stability and Neuroinvasion. *Journal of Virology*, 2004; 8824-8834.
37. Nathalie Bastien, *et al.* Human Coronavirus NL63 Infection in Canada. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005; 191 (4): 503-506.
38. Astrid Vabret, *et al.* Detection of the New Human Coronavirus HKU1: A Report of 6 Cases. *Clinical Infectious Diseases*, 2006; 42 (5): 634-639.
39. Frank Esper, *et al.* Coronavirus HKU1 Infection in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 2006; 12 (5): 775-779.
40. K.J. Henrickson *et al.* Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(2): 242-264.
41. R. Pechhini *et al.* Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2015; 19(4): 358-362
42. K.E. Templeton *et al.* Rapid and Sensitive Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(4): 1564-1569.
43. R.R. Jansen *et al.* Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 51(3): 179-85.

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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

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

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

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

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

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

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

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

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

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



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

Revision: November 2019





CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



ISO 13485

Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC