

Vitassay qPCR

AMB

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Adenovirus, Metapneumovirus and/or Bocavirus humanos in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR AMB, permite la detección y diferenciación de Adenovirus, Metapneumovirus y/o Bocavirus humanos mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus humanos.

Referencias

Vitassay qPCR AMB 4x8 -well strip, low profile 7041028

Vitassay qPCR AMB 4x8-well strip, high profile 7042028

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S028/ 7042S028	AMB strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C028	AMB Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x1 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA/DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son la causa mayoritaria de hospitalización en infantes y niños en países desarrollados, y una de las causas principales de muerte en países en vías de desarrollo. Como las coinfecciones son algo común al realizar el diagnóstico, algunos de los patógenos más comúnmente diagnosticados son el Adenovirus, y los recientemente descubiertos Metapneumovirus y Bocavirus.

El Bocavirus pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Bocavirus*. Está caracterizado por ser un virus de ADN monocatenario, posee cuatro genotipos distintos. Estos son: HBoV 1, HBoV 2, HBoV 3 y HBoV 4. El HBoV1 se encuentra principalmente en muestras respiratorias, relacionándose con la sibilancia aguda. Mientras que los otros tres se encuentran en muestras fecales, y se relacionan con episodios de gastroenteritis. Dependiendo de la forma en que sea transmitido, ya sea por aerosoles y vía respiratoria o por ingestión, probablemente se desarrolle en un tipo de enfermedad u el otro. Además, no se observa epidemiología estacional en este virus, si no que aparece de forma continua durante todo el año.

El Metapneumovirus afecta principalmente a niños, aunque en adultos cursa de forma parecida a una gripe, mientras que en pacientes ancianos o inmunocomprometidos supone una importante causa de morbilidad. El Metapneumovirus pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, concretamente al género *Metapneumovirus*. Posee dos genotipos, A y B. Y cada genotipo posee a su vez dos subtipos, los cuales son A1, A2 (siendo el más comúnmente encontrado en huéspedes del virus), B1 y B2. Cabe añadir que el subtipo A2 está dividido en los subgenotipos A2a y A2b. Además, el virus parece presentar un patrón epidemiológico que comprende final de invierno y principios de primavera. Aunque una fase epidemiológica en verano no puede ser descartada.

Los Adenovirus humanos (HAdVs) son un grupo diverso de virus de DNA bicatenario responsables de una gran cantidad de patologías clínicas. Pertenecen a la familia *Adenoviridae* y al género *Mastadenovirus*. Están categorizados por especies (AdA, AdB1, AdB2, AdC, AdD, AdE, and AdF), y cada especie recategorizada por serotipo (Ad1 a Ad51). A fecha de 2007, existían 51 serotipos reconocidos. Los tipos AdB1, AdC y AdE son considerados responsables de epidemias con síntomas severos. Ad3 y Ad7 pertenecientes a AdB1 son normalmente responsables de las patologías respiratorias más complicadas. El tipo AdC (1, 2, 5 y 6) se asocia con enfermedades de curso febril y en pacientes inmunocomprometidos. Debido a esto, el serotipo prácticamente determina cual será la sintomatología y severidad de la enfermedad.

La PCR en Tiempo Real ha demostrado ser capaz de lidiar con las complicaciones surgidas con el uso de las técnicas convencionales. Además, es capaz de revelar coinfecciones no sólo de distintos virus si no de distintos serotipos de Adenovirus en una única infección. Todo ello es posible gracias a la determinación de diversas dianas,

siendo el gen *Hexon* para el Adenovirus, el gen *N* para el Metapneumovirus y el gen *NS1* para el Bocavirus.

Principio del test

Vitassay qPCR AMB se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *hexon* (Adenovirus) y del gen *NS1* (Bocavirus). El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido, de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de los virus se realiza mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa seguida de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen *N* de Metapneumovirus.

Vitassay qPCR AMB, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (Adenovirus), ROX (Metapneumovirus) y Cy5 (Bocavirus) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA/DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (ROCHE).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del AMB Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA/DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Adenovirus), ROX (Metapneumovirus), Cy5 (Bocavirus) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3029P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de Adenovirus (FAM), Metapneumovirus (ROX) y Bocavirus (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

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

Adenovirus	Metapneumovirus	Bocavirus	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus Positivos
-	-	-	+	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Adenovirus Positivo, Metapneumovirus y Bocavirus Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Adenovirus y Metapneumovirus Positivos, Virus Bocavirus Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Adenovirus y Bocavirus Positivos, Metapneumovirus Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Metapneumovirus Positivo, Adenovirus y Bocavirus Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Metapneumovirus y Bocavirus Positivos, Adenovirus Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Bocavirus Positivo, Adenovirus y Metapneumovirus Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los virus no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Se analizaron un total de 142 frotis de garganta de pacientes sintomáticos mediante PCR en tiempo real usando Vitassay qPCR AMB y los resultados se compararon con los obtenidos con FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). Se detectó Adenovirus en 68 muestras con Vitassay qPCR AMB y en 69 muestras usando FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). Esta muestra de diferencia no se pudo detectar con Vitassay qPCR AMB porque la cantidad de DNA estaba por debajo del límite de detección del método utilizado.

Se detectó Metapneumovirus en 39 muestras con Vitassay qPCR AMB y en 37 muestras usando FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). La cantidad de RNA de la muestra no detectada estaba por debajo del límite de detección del método utilizado.

Se detectó Bocavirus en 34 muestras con Vitassay qPCR AMB y en 37 muestras usando FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). La cantidad de DNA de la muestra no detectada estaba por debajo del límite de detección del método utilizado.

Estos resultados indican la alta sensibilidad y especificidad para detectar Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR AMB.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA/DNA molde de los diferentes virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA/DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes virus, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
Adenovirus	Metapneumovirus	Bocavirus
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Influenza B/Brisbane/60/2008	Influenza B/Brisbane/60/2008	Influenza B/Brisbane/60/2008
Influenza B/Florida/04/06	Influenza B/Florida/04/06	Influenza B/Florida/04/06
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza B/Phuket/3073/2013
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Rinovirus humano	Rinovirus humano	Rinovirus humano
Coronavirus 229E humano	Coronavirus 229E humano	Coronavirus 229E humano
Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4
MERS Coronavirus	MERS Coronavirus	MERS Coronavirus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Respiratory syncytial virus (RSV)	Respiratory syncytial virus (RSV)
Metapneumovirus A y B humano	Adenovirus	Adenovirus
Bocavirus	Bocavirus	Metapneumovirus A y B humano

Reactividad analítica

Vitassay qPCR AMB ha sido evaluado para Adenovirus frente a Adenovirus humano, mostrando un resultado positivo.

Vitassay qPCR AMB ha sido evaluado para Metapneumovirus frente a Metapneumovirus humano genotipo A y Metapneumovirus humano genotipo B, mostrando un resultado positivo.

Vitassay qPCR AMB ha sido evaluado para Bocavirus frente a Bocavirus humano mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR AMB, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Roche LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Adenovirus, Metapneumovirus y Bocavirus. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de frotis faríngeo. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA/DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. 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 del RNA/DNA 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 los diferentes virus, 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.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

Intended use

Vitassay qPCR AMB allows the detection and differentiation of human Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR AMB 4x8 -well strip, low profile	7041028
Vitassay qPCR AMB 4x8-well strip, high profile	7042028

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S028/ 7042S028	AMB strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C028	AMB Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x1 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- RNA/DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Acute viral respiratory tract infections are the leading cause of hospitalization for infants and young children in developed countries, whilst a major cause of death in developing countries. As coinfections are very normal when diagnosing this type of infections, Adenovirus and two recently discovered viruses: Metapneumovirus and Bocavirus, are some of the most common pathogens found.

Bocavirus belongs to the *Parvoviridae* family and the *Bocavirus* genus, having four different genotypes. These being: HBoV 1, HBoV 2, HBoV 3 and HBoV 4. HBoV1 is mainly found in respiratory samples and is related with acute wheezing illness, whilst HBoV 2, 3 and 4 are found in fecal samples and related with gastroenteritis. Depending in which way it is transmitted, through respiration or direct ingestion; it will probably develop into one type of disease or the other. Also, no seasonal prevalence has been observed for HBoV, being found throughout the year.

Metapneumovirus mainly affects children, but in adults appears with flu-like symptoms, and is a major cause of morbidity in elderly and immunocompromised patients. It belongs to the *Paramyxoviridae* family, more concretely to the *Metapneumovirus* genus, possessing two genotypes: A and B. Then, each genotype having two subtypes, these being: A1, A2 (which coincidentally is the most common among hosts), B1 and B2. Lastly, the A2 subtype is also divided into A2a and A2b sub-genotypes. The virus is characterized by a late winter-early spring epidemiologic pattern, even though summer infections cannot be excluded.

Human adenoviruses (HAdVs) are a diverse group of double-stranded DNA viruses responsible for a wide variety of human ailments. Belonging to the *Adenoviridae* family and *Mastadenovirus* genus, they are categorized by species (AdA, AdB1, AdB2, AdC, AdD, AdE, and AdF) and each species can be then categorized by serotype (Ad1 to Ad51). As of 2007, 51 serotypes are recognized. AdB1, AdC and AdE can cause widespread outbreaks with severe clinical presentations. Ad3 and Ad7 from AdB1 are often responsible for the most severe respiratory symptomatologies. AdC (1, 2, 5, and 6) are associated with febrile respiratory illness in children and illnesses in immunocompromised patients. With this given, serotype directly correlates with the severity and symptomology of disease.

Real Time PCR has proven to be able to cope with the complications that traditional techniques cannot, and is capable of revealing coinfections of multiple Ad serotypes, differentiates Bocavirus, Metapneumovirus and Adenovirus from RSV or influenzas. And it is all thanks to the targeting of the *Hexon* gene for Adenovirus, *N* gene for Metapneumovirus and the *NS1* gene for the Bocavirus.

Principle of the test

Vitassay qPCR AMB test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *hexon* gene (Adenovirus) and the *NS1* gene (Bocavirus). The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The presence of the virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe. After RNA isolation, the detection of Metapneumovirus 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 *N* gene of Metapneumovirus.

Vitassay qPCR AMB test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the Adenovirus DNA target sequence is detected through the FAM channel, Metapneumovirus RNA target in ROX channel and Bocavirus DNA in Cy5 channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA/DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (QIAGEN).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (ROCHE).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized AMB Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA/DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Adenovirus), ROX (Metapneumovirus), Cy5 (Bocavirus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Adenovirus), ROX (Metapneumovirus) and Cy5 (Bocavirus), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

Adenovirus	Metapneumovirus	Bocavirus	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus Positives
-	-	-	+	-	+	Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus Negatives
+	-	-	+/-	-	+	Adenovirus Positive, Metapneumovirus and Bocavirus Negatives
+	+	-	+/-	-	+	Adenovirus and Metapneumovirus Positives, Bocavirus Negative
+	-	+	+/-	-	+	Adenovirus and Bocavirus Positives, Metapneumovirus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Metapneumovirus Positive, Adenovirus and Bocavirus Negatives
-	+	+	+/-	-	+	Metapneumovirus and Bocavirus Positives, Adenovirus Negative
-	-	+	+/-	-	+	Bocavirus Positive, Adenovirus and Metapneumovirus Negatives
+	+	+	+	+	+	Invalid
-	-	-	-	-	-	Invalid

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 142 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR AMB and the results were compared with those obtained using FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). Adenovirus was detected in 68 samples with Vitassay qPCR AMB and in 69 samples using FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). This sample of difference could not be detected with Vitassay qPCR AMB because the amount of template DNA is below the detection limit of the method used.

Metapneumovirus was detected in 39 samples with Vitassay qPCR AMB and in 37 samples using FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). The amount of RNA template of this non-detected sample was below the detection limit of the method used.

Bocavirus was detected in 34 samples with Vitassay qPCR AMB and in 37 samples using FTD Adenovirus/Metapneumovirus/Bocavirus (Fast-Track). The amount of DNA template of this non-detected sample was below the detection limit of the method used.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR AMB.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA/DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
Adenovirus	Metapneumovirus	Bocavirus
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> metilicilin resistant	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Influenza B/Brisbane/60/2008	Influenza B/Brisbane/60/2008	Influenza B/Brisbane/60/2008
Influenza B/Florida/04/06	Influenza B/Florida/04/06	Influenza B/Florida/04/06
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza B/Phuket/3073/2013
Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Human Rinovirus	Human Rinovirus	Human Rinovirus
Human Coronavirus 229E	Human Coronavirus 229E	Human Coronavirus 229E
Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4
MERS Coronavirus	MERS Coronavirus	MERS Coronavirus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Respiratory syncytial virus (RSV)	Respiratory syncytial virus (RSV)
Human Metapneumovirus A y B	Adenovirus	Adenovirus
Bocavirus	Bocavirus	Human Metapneumovirus A y B

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR AMB for Adenovirus was evaluated against Human Adenovirus, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR AMB for Metapneumovirus was evaluated against Human Metapneumovirus genotype A and Human Metapneumovirus genotype B, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR AMB for Bocavirus was evaluated against Human Bocavirus showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR AMB has been validated on the following equipments:

- Roche LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Adenovirus, Metapneumovirus and Bocavirus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with throat swab samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA/DNA from clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, either samples containing high concentrations of target RNA/DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

Bibliography/Bibliografía

1. David Metzgar, *et al.* PCR Analysis of Egyptian Respiratory Adenovirus Isolates, Including Identification of Species, Serotypes, and Coinfections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 5743-5752.
2. Gregory C. Gray, *et al.* Genotype Prevalence and Risk Factors for Severe Clinical Adenovirus Infection, United States 2004-2006. *Clinical Infectious Diseases*, 2007; 45(9): 1120-1131.
3. Mbayame Ndiaye Niang, *et al.* Respiratory viruses in patients with influenza-like illness in Senegal: Focus on human respiratory adenoviruses. *PLOS ONE*, 2017; 12 (3): e0174287.
4. Gregory C. Gray, *et al.* Adenovirus Transmission—Worthy of Our Attention. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006; 194 (7): 871-873.
5. Magdalena Kendall Scott, *et al.* Human Adenovirus Associated with Severe Respiratory Infection, Oregon, USA, 2013-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 2016 Jun; 102-108.
6. John V. Williams, *et al.* Human Metapneumovirus and Lower Respiratory Tract Disease in Otherwise Healthy Infants and Children. *The New England Journal of Medicine*, 2004; 350: 443-450.
7. Guy Boivin, *et al.* Virological Features and Clinical Manifestations Associated with Human Metapneumovirus: A New Paramyxovirus Responsible for Acute Respiratory-Tract Infections in All Age Groups. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002; 186 (9): 1330-1334.
8. Wenhua Kong, *et al.* Circulation of Human Metapneumovirus Among Children With Influenza-Like Illness in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 2016; 88: 774-781.
9. Ann R. Falsey, *et al.* Human Metapneumovirus Infections in Young and Elderly Adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003; 187 (5): 785-790.
10. Bernadette G. van den Hoogen, *et al.* Prevalence and Clinical Symptoms of Human Metapneumovirus Infection in Hospitalized Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003; 188 (10): 1571-1577.
11. Sai-Zhen Zeng, *et al.* Clinical Features of Human Metapneumovirus Genotypes in Children With Acute Lower Respiratory Tract Infection in Changsha, China. *Journal of Medical Virology*, 2015; 87: 1839-1845.
12. Amber K. Haynes, *et al.* Human Metapneumovirus Circulation in the United States, 2008 to 2014. *PEDIATRICS*, 2016; Volume 137: number 5.
13. Tobias Allander, *et al.* Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. *Clinical Infectious Diseases*, 2007; 44 (7): 904-910.
14. Nathalie Bastien, *et al.* Human Bocavirus Infection, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 2006; 12 (5): 848-850.

15. Xiaoming Ma, et al. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; 44 (3): 1132-1134.
16. Diego Vicente, et al. Human Bocavirus, a Respiratory and Enteric Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2007; 13 (4): 636-637.
17. Xiaochun Wang, et al. Complete Genomes of Three Human Bocavirus Strains from Children with Gastroenteritis and Respiratory Tract Illnesses in Jiangsu, China. *Journal of Virology*, 2012; 86 (24): 13826-13827.
18. Marcello Guido, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World Journal of Gastroenterology*, 2016; 22 (39): 8684-8697.

Trademarks

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™ and Mx3029™ 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.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number

