

Vitassay qPCR

Rhinovirus & Enterovirus

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de Rinovirus y Enterovirus en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Rhinovirus and Enterovirus in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus, permite la detección y diferenciación de los virus Rinovirus y/o Enterovirus mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por Rinovirus y Enterovirus.

Referencias

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus 4x8 -well strip, low profile 7041041

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus 4x8 -well strip, high profile 7042041

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S041/ 7042S041	Rhinovirus & Enterovirus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C041	Rhinovirus & Enterovirus Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 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
- 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

Los Rinovirus al igual que los Enterovirus son virus no-SARS (SARS, síndrome respiratorio agudo y grave) relacionados como agentes patógenos para el sistema respiratorio que producen infecciones del tramo superior del tracto respiratorio o más comúnmente conocido como resfriado común. En el caso de los Rinovirus estos se encuentran en más del 35% de las infecciones por Coronavirus humano (HCoV) mientras que los enterovirus son menos abundantes (en torno a un 7%). La frecuencia de padecer esta infección aumenta en pacientes inmunodeprimidos.

Los síntomas de la infección, una vez pasado el periodo de incubación de 2 a 5 días, es fiebre de 1 a 5 días. En los casos más graves puede llegar a causar falta de aliento, síntomas gastrointestinales, náuseas, vómitos, fatiga y mialgia y tener una mayor duración. La transmisión es mediante las gotitas en la tos o estornudos o el estar expuesto a superficies contaminadas.

Al ser tantos los patógenos que se encuentran en un cuadro de SARS relacionado con HCoV es necesaria una técnica de caracterización sistemática con una excelente sensibilidad. Es ahí donde la PCR a tiempo real cobra su importancia y papel vital en el desarrollo de esta función.

Principio del test

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *5'UTR* para Enterovirus y/o Rinovirus. 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.

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus, 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 (Rinovirus), HEX, VIC o JOE (Enterovirus) y en el canal Cy5 (control interno (CI)).

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

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:

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Rhinovirus & Enterovirus 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 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 (Rinovirus), Cy5 (Control Interno) y los canales HEX, JOE o VIC (Enterovirus). 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 del Rinovirus (FAM), Enterovirus (HEX, JOE o VIC) y Control Interno (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, HEX, JOE o VIC 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:

Rinovirus (FAM)	Enterovirus (HEX)	Control Interno (Cy5)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Rinovirus y Enterovirus Positivos
+	-	+/-	-	+	Rinovirus Positivo, Enterovirus Negativo
-	+	+/-	-	+	Rinovirus Negativo, Enterovirus Positivo
-	-	+	-	+	Rinovirus y Enterovirus 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 187 frotis de garganta de pacientes sintomáticos mediante PCR en tiempo real usando Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus y los resultados se compararon con los obtenidos con CLART® PneumoVir DNA array (Genomica).

Se detectó Rinovirus en 87 muestras positivas por ambos kits. A parte de estas muestras, Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus detectó 13 muestras positivas más y CLART® PneumoVir DNA array (Genomica) detectó 2 muestras positivas más. Estas 15 muestras (La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado) fueron evaluadas por un método de detección molecular comercial adicional (FastTrack Respiratory Pathogens 33 o FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis) de las cuales dieron como resultado 10 de 15 muestras positivas.

Se detectó Enterovirus en 78 muestras positivas por ambos kits. A parte de estas muestras, Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus detectó 2 muestras positivas más y CLART® PneumoVir DNA array (Genomica) detectó 2 muestras positivas más. Estas 4 muestras (La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado) fueron evaluadas por un método de detección molecular comercial adicional (FastTrack Respiratory Pathogens 33 o FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis) de las cuales dieron como resultado 3 de 4 muestras positivas.

Estos resultados indican la alta sensibilidad y especificidad para detectar Rinovirus y Enterovirus utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus.

Sensibilidad analítica

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

Especificidad analítica

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

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella holmesii</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	Virus respiratorio sincitial A y B
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus metapneumovirus humano A y B
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	Coronavirus humano 229E y NL63
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	MERS Coronavirus
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	Adenovirus humano 2 cepa Adenoid 6
<i>Legionella bozemanii</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Adenovirus humano 5
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	Bocavirus
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Citomegalovirus cepa AD-169
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	Parechovirus Tipo 3
<i>Legionella longbeachae</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	HSV-1 cepa MacIntyre
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotipo 1/2b	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	HSV-2 MS
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	HHV6 cepa Z29
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ZQ22	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	Varicella-Zoster Virus Ellen
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus ha sido evaluado para Rinovirus RVH con las siguientes cepas: tipo A 8, tipo A 16, tipo A 30, tipo A 49, tipo A 90, tipo B 5, tipo B72 y tipo C, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus ha sido evaluado para Enterovirus con las siguientes cepas: D68, A71, tipo 7, tipo 30 y tipo 68. También frente a Coxsackievirus tipo A9, A21, A24, B3 y B4, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus, es compatible con los siguientes equipos:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)
- Cobas z480 (Roche)

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Rinovirus y Enterovirus. 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 en medio de transporte, plasma, frotis faríngeo, LCR y muestras fecales. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA 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 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 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	JOE	
	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	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus allows the detection and differentiation of Rhinovirus and Enterovirus by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Rhinovirus and ENterovirus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus 4x8 -well strip, low profile 7041041

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus 4x8-well strip, high profile 7042041

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S041/ 7042S041	Rhinovirus & Enterovirus strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C041	Rhinovirus & Enterovirus Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 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 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

Rhinoviruses, like Enteroviruses, are non-SARS viruses (SARS, acute and severe respiratory syndrome) related as pathogens for the respiratory system that cause upper respiratory tract infections or more commonly known as the common cold. In the case of Rhinoviruses, they are found in more than 35% of human Coronavirus (HCoV) infections, while enteroviruses are less abundant (around 7%). The frequency of suffering from this infection increases in immunosuppressed patients.

The symptoms of the infection, after the incubation period of 2 to 5 days, is a fever of 1 to 5 days. In the most severe cases it can cause shortness of breath, gastrointestinal symptoms, nausea, vomiting, fatigue and myalgia and have a longer duration. Transmission is through droplets in a cough or sneeze or being exposed to contaminated surfaces.

Since there are so many pathogens found in a SARS chart related to HCoV, a systematic characterization technique with excellent sensitivity is necessary. It is there where real-time PCR takes on its importance and vital role in the development of this function.

Principle of the test

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus test is based on the real-time amplification of conserved fragments of the *5'UTR* gene for Rhinovirus and Enterovirus. 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 increment in the fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus 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 Rhinovirus RNA target sequence is detected through the FAM channel, internal control in Cy5 channel and Enterovirus is detected through the HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

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 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:

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Rhinovirus & Enterovirus 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 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 (Rhinovirus), Cy5 (Internal Control) and HEX, JOE or VIC channels (Enterovirus). 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 Rhinovirus (FAM), Enterovirus (HEX, JOE o VIC) and Internal Control (Cy5), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, HEX, JOE o VIC 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:

Rhinovirus (FAM)	Enterovirus (HEX)	Internal Control (Cy5)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Rinovirus y Enterovirus Positive
+	-	+/-	-	+	Rinovirus Positive, Enterovirus Negative
-	+	+/-	-	+	Rinovirus Negative, Enterovirus Positive
-	-	+	-	+	Rinovirus y Enterovirus Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

If the negative samples do 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 187 throat swabs from symptomatic patients were analyzed by real-time PCR using Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus and the results were compared with those obtained with CLART® PneumoVir DNA array (Genomica).

Rhinovirus was detected in 87 positive samples by both kits. Apart from these samples, Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus detected 13 more positive samples and CLART® PneumoVir DNA array (Genomica) detected 2 more positive samples. These 15 samples (The low amount of template RNA detected in this sample is below the detection limit of the method used) were evaluated by an additional commercial molecular detection method (FastTrack Respiratory Pathogens 33 or FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis) of which resulted in 10 of 15 positive samples.

Enterovirus was detected in 78 positive samples by both kits. Apart from these samples, Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus detected 2 more positive samples and CLART® PneumoVir DNA array (Genomica) detected 2 more positive samples. These 4 samples (The low amount of template RNA detected in this sample is below the detection limit of the method used) were evaluated by an additional commercial molecular detection method (FastTrack Respiratory Pathogens 33 or FastTrack Respiratory Pathogens 21 (FastTrack Diagnosis) of which resulted in 3 of 4 positive samples.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect Rhinovirus and Enterovirus using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus.

Analytical sensitivity

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

Analytical specificity

The analytical specificity for Rhinovirus and Enterovirus was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity testing		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Influenza B/Florida/04/06 Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Influenza B/Phuket/3073/2013 Virus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Human 1, 2, 3 and 4 parainfluenza Virus
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	Respiratory Syncytial Virus A y B
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) Virus	Human A and B metapneumovirus Virus
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 Virus	Human Coronavirus 229E y NL63
<i>E. coli</i> 0. 1285;O18:H7:K1	Influenza A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09 Virus	MERS Coronavirus
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 Virus	Human Adenovirus 2 cepa Adenoid 6
<i>Legionella bozemanii</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) Virus	Adenovirus humano 5
<i>Legionella micdadei</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) Virus	Bocavirus
<i>Legionella dumoffii</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) Virus	Citomegalovirus cepa AD-169
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) Virus	Parechovirus Tipo 3
<i>Legionella longbeachae</i>	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) Virus	HSV-1 MacIntyre strain
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotipo 1/2b	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) Virus	HSV-2 MS
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) Virus	HHV6 Z29 strain
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Influenza B/Brisbane/60/2008-like Virus	Varicella-Zoster Virus Ellen
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019		

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus for Rhinovirus was evaluated against strains: 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, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus for Enterovirus was evaluated against strains: Enterovirus D68 and A71, Echovirus Type 7, 11, 30 and 68, Coxsackievirus types A9, A21, A24, B3, and B4, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Rhinovirus & Enterovirus has been validated on the following equipments:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)
- Cobas z480 (Roche)

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 Rhinovirus and Enterovirus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with samples in transport medium, plasma, throat swabs, CSF and stool samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA 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 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	JOE	
	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	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Duc H. Do, Stella Laus, Amy Leber, Mario J. Marcon, Jeanne A. Jordan, Judith M. Martinand Robert M. Wadowsky. A One-Step, Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Rhinovirus. *Journal of Molecular Diagnostics* 2010;102-108.
2. Riikka Osterback, Tuire Tevaluoto, Tiina Ylinen, Ville Peltola, Petri Susi, Timo Hyypiä Matti Warisa. 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.
3. Julien Dupouey, Laetitia Ninove, Vanessa Ferrier, Odile Py, Céline Gazin, Laurence Thirion-Perrier and Xavier de Lamballerie. Molecular detection of human rhinoviruses in respiratory samples: a comparison of Taqman probe-, SYBR green I- and BOXTO-based real-time PCR assays. *Virology Journal* 2014, 11:31.

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



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com