

Vitassay qPCR

Flu A + Flu B

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los virus Influenza A (Flu A) y B (Flu B) en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Influenza A (Flu A) and B (Flu B) virus in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B, permite la detección y diferenciación de los virus Influenza A (Flu A) e Influenza B (Flu B) mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los virus de Influenza A e Influenza B.

Referencias

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B 4x8-well strip, low profile	7041021
Vitassay qPCR Flu A+ Flu B 4x8-well strip, high profile	7042021

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S021/ 7042S021	Flu A+ Flu B Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C021	Flu A+ Flu B 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 de congelación y descongelación, se recomienda separar en alícuotas.
- Conservar los reactivos en la 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 virus de la gripe A y B causan la mayoría de las infecciones virales del tracto respiratorio inferior; los ancianos y personas inmunodeprimidas están especialmente en riesgo de desarrollar enfermedades graves y complicaciones. La gripe es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

Las epidemias de gripe estacional imponen una pesada carga a la sociedad, con 3-5 millones de casos y 250-500.000 muertes en todo el mundo cada año. El impacto económico resultante es alto e incluye tanto los costos directos como los indirectos.

Después de un período de incubación de uno a dos días, la enfermedad tiene un inicio abrupto, con escalofríos, fiebre, mialgia, dolor de cabeza y anorexia. La neumonía es la complicación más importante de la gripe. Puede producir neumonía viral primaria, neumonía bacteriana secundaria o una combinación de ambas.

El diagnóstico de laboratorio de la gripe se puede realizar mediante cultivo celular, pruebas de antígeno rápido y, más recientemente por PCR en tiempo real.

Principio del test

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la zona del gen *M1*. 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 Flu A+ Flu B, 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 (Flu A) y ROX (Flu B) 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.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en los laboratorios.
- 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:

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 Flu A+ Flu B Positive Control (tubo rojo) liofilizado en 100 µL de PCR grade water suministrado (tubo blanco). Mezclar bien con ayuda del vórtex. Después

del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar varios 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.

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) en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) 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*)	63°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Flu A) y ROX (Flu B) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3021P™ 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 los virus de Influenza A (FAM) y Influenza B (ROX).

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

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:

Influenza A	Influenza B	Control Interno	Control negativo	Control positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Influenza A e Influenza B Positivos
-	-	+	-	+	Influenza A e Influenza B Negativos
+	-	+/-	-	+	Influenza A Positivo Influenza B negativo
-	+	+/-	-	+	Influenza B Positivo Influenza A Negativo
+	+	+	+	+	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

Un total de 109 muestras de frotis faríngeos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Flu A+ Flu B y CLART® PneumoVir DNA array (Genómica).

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B detectó el virus de la gripe A en 75 muestras. El ensayo CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para gripe A en 77 muestras clínicas. Estas dos muestras negativas por PCR en tiempo real, eran muestras con una concentración de RNA por debajo del límite de detección del método. Para el virus de la gripe B, un total de 8 muestras fueron positivas por ambos ensayos.

La especificidad de Vitassay qPCR Flu A+ Flu B kit fue del 100% para ambos virus comparado con el método de referencia (32 muestras para gripe A y 101 muestras para gripe B).

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 de la gripe A y B fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Influenza A	Influenza B
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma 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>
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
Influenza B/Florida/04/06 virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Human metapneumovirus A and B	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Human coronavirus 229E	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Human rhinovirus	Respiratory syncytial virus (RSV)
Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Human metapneumovirus A and B
Human Adenovirus 5	Human coronavirus 229E
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	Human rhinovirus
	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6
	Human Adenovirus 5

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B Virus Real Time PCR para Influenza A ha sido evaluado con las siguientes cepas: virus A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, virus A/Perth/16/2009(H3N2)-like, A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Switzerland/9715293/2013 y A/Turkey/Germany, obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B Virus Real Time PCR para Influenza B ha sido evaluado con las siguientes cepas: virus B/Brisbane/60/2008-like (B/Victoria lineage),

B/Florida/04/06 y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
- Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System
- Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System
- AriaMx Real-Time PCR System
- DNA-Technology DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers
- Rotor-Gene® Q
- SmartCycler®

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.

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 los virus de la gripe A y B. 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 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 en la siguiente lista, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche
LightCycler @480 Real-Time PCR System
LightCycler @96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
SmartCycler®

T. con bloque de alto perfil
Applied Biosystems
7300/7500/7900HT Real-Time PCR
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
Eppendorf
Mastercycler™ <i>ep realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3021P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
BIONEER
Excicycler™ 96
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
SmartCycler®

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	618/60	
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 3021P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Intended use

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B allows the detection and differentiation of Influenza A (Flu A) and Influenza B (Flu B) virus by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Influenza virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B 4x8-well strip, low profile	7041021
Vitassay qPCR Flu A+ Flu B 4x8-well strip, high profile	7042021

Materials/reagents provided

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S021/ 7042S021	Flu A+ Flu B Virus strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C021	Flu A+ Flu B 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, we recommend to separate in aliquots.
- Keep all reagents of in the dark.

Additional equipment and material required

- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Influenza A and B viruses cause the majority of viral lower respiratory tract infections; elderly and compromised individuals are especially at risk of developing severe illness and complications. Influenza viruses are a significant cause of morbidity and mortality worldwide.

Seasonal influenza epidemics impose a heavy burden on society, with 3–5 million cases and 250-500 000 deaths worldwide every year. The resulting economic impact is large and includes both direct and indirect costs.

After an incubation period of one to two days, the illness has an abrupt onset, with chills, fever, myalgia, headache, and anorexia. Pneumonia is the most important complication of influenza. There may be primary viral pneumonia, secondary bacteria pneumonia, or a combination of both.

Laboratory diagnosis of influenza has been accomplished using cell culture, rapid antigen testing, and, more recently, real-time PCR.

Principle of the test

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *M1* gene. 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.

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B 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 Influenza A RNA target sequence is detected through the FAM channel, Influenza B virus RNA target in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

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.

- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the laboratories.
- 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:

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).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Flu A+ Flu B Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (white tube) supplied. 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.

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) into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls into each well
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly(optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programm 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*)	63°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Influenza A), ROX (Influenza B) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3021P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached 2)

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 (Influenza A) and ROX (Influenza B), which validates the reaction.

Negative control

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

The experiment seems to be fail 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:

Influenza A Virus	Influenza B Virus	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Influenza A and Influenza B viruses Positive
-	-	+	-	+	Influenza A and Influenza B viruses Negative
+	-	+/-	-	+	Influenza A Positive, Influenza B negative
-	+	+/-	-	+	Influenza B Positive Influenza A Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **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 109 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Flu A+ Flu B and CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica).

Influenza A virus was detected in 75 samples by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B Real Time PCR and in 77 samples by CLART® PneumoVir DNA array assay. For these 2 discordant samples, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used. For Influenza B virus, a total of 8 clinical samples were positives for both assays.

The specificity of Vitassay qPCR Flu A+ Flu B was 100% for both viruses (32 samples for Influenza A and 101 samples for influenza B).

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Influenza A and Influenza B virus 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 Influenza A and Influenza B virus was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Influenza A	Influenza B
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella micdadei</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma 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>
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus
Influenza B/Florida/04/06 virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Human metapneumovirus A and B	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Human coronavirus 229E	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Human rhinovirus	Respiratory syncytial virus (RSV)
Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Human metapneumovirus A and B
Human Adenovirus 5	Human coronavirus 229E
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	Human rhinovirus
	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6
	Human Adenovirus 5

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A+ Flu B Virus Real Time PCR for Influenza A was evaluated against strains: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Perth/16/2009(H3N2)like virus, A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Switzerland/9715293/2013 A/Turkey/Germany R2485+86/2014, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A+ Flu B Virus Real Time PCR for Influenza B was evaluated against strains B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06, B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B has been validated on the following equipments:

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System
Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Rotor-Gene® Q (Qiagen)
SmartCycler® (Cepheid).

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.

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Influenza virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with throat swabs 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 in the list below, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300/7500/7900HT Real-Time PCR
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR
StepOne™ Real-Time PCR System	Bio-Rad
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
Roche	Eppendorf
LightCycler @480 Real-Time PCR System	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
LightCycler @96 Real-Time PCR System	Stratagene / Agilent Technologies
Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
AriaMx Real-Time PCR System	Mx3021P™ Real Time PCR System
DNA-Technology	Analytik Jena Biometra
DTlite Real-Time PCR System	TOptical
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers	qTOWER 2.0
Qiagen	Abbott
Rotor-Gene®	Abbott m2000 RealTime System
Cepheid	BIONEER
SmartCycler®	Exicycler™ 96
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time
	Qiagen
	Rotor-Gene®
	Cepheid
	SmartCycler®

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	618/60	
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 3021P™ 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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Bibliography/Bibliografía

1. Methods for molecular surveillance of influenza. Wang R, Taubenberger JK. Expert review of anti-infective therapy. 2010;8(5):517-527.
2. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. World Health Organization. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Accessed 2015 Dec 30.
3. Kuo RL, Yang SL, Liu YC, Chen LT, Mok CK, Kuo SM, Shih SR, Tsao KC. Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. J Virol Methods. 2014 Nov;208:41-6.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3021™ 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

