

# Vitassay qPCR

## Flu A + Flu B + RSV

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los virus Influenza A, Influenza B y RSV en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Influenza A, B and RSV virus in human samples





**Uso previsto**

Vitassay qPCR Flu A + Flu B+ RSV, permite la detección y diferenciación de los virus Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) 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, Influenza B y RSV.

**Referencias**

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV 4x8 -well strip, low profile 7041027

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV 4x8-well strip, high profile 7042027

**Materiales/Reactivos suministrados**

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S027/ 7042S027	Flu A+ Flu B +RSV Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C027	Flu A+ Flu B + RSV 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, pertenecientes a la familia de los *Orthomyxoviridae*, son los causantes de la mayoría de infecciones relacionadas con el tracto respiratorio inferior. Personas mayores o inmunodeprimidas corren un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y complicaciones de forma severa. Estos virus son una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

Las epidemias estacionales de gripe provocan aproximadamente 3-5 millones de casos y 250-500000 muertes anualmente. El resultado de esto es un acentuado impacto económico que incluye tanto costes directos como indirectos. Además, las epidemias de virus de la gripe A se pueden agrupar en numerosos subgrupos, siendo los más importantes aquellos que provocan patogenicidad en humanos. Estos últimos, actualmente, son el H1N1, H1N2, H2N2, H3N2 y H5N1.

Este tipo de virus pueden ser transmitidos mediante contacto directo con individuos afectados, objetos contaminados o por la inhalación de aerosoles contaminados. Tras una incubación de uno o dos días, la enfermedad presenta su fase aguda. Compuesta por escalofríos, fiebre, mialgia, dolor de cabeza y anorexia. Aunque la neumonía es la complicación más importante relacionada con estos virus, ya que puede haber infección neumónica viral primaria, bacteriana secundaria o una combinación de ambas.

El virus sincitial respiratorio (VSR), es un tipo de virus poseedor de envoltura y cadena de RNA monocatenaria negativa. El VSR pertenece al género *Orthopneumovirus*, que está dividido en dos grupos, A y B, atendiendo a las diferencias antigénicas y genómicas.

La infección por este tipo de virus causa una sintomatología parecida a un resfriado, pero también puede causar bronquitis, crup o infecciones del tracto respiratorio inferior, como bronquiolitis o neumonía. De cada 100 niños y niñas que padecen VSR, de 25 a 40 (25% a 40%), muestran signos de neumonía o bronquiolitis.

Este virus se transmite por secreciones nasofaríngeas en forma de gotas, las cuales provienen de individuos infectados. Estas gotas penetran a través del mucus de las membranas oculares, nasales o bucales mediante contacto directo, o auto-inoculación tras entrar en contacto con superficies contaminadas.

El diagnóstico de influenza está basado en el cultivo celular, testeo rápido de antígenos y, más recientemente, en la PCR en Tiempo Real. Concretamente en la que sitúa el gen *M1* como diana. Mientras que existen numerosos y distintos tipos de test de laboratorio para el diagnóstico de infecciones por VSR, tales como test de detección de antígenos o cultivos. Estos son útiles a la hora de diagnosticar a niños pequeños, pero no tanto con adultos o niños más mayores. El uso de PCR en Tiempo Real, estableciendo el gen *N* como diana, debería ser considerado en el caso de tratar con el último grupo, ya que sus muestras respiratorias pueden contener baja carga vírica.

### **Principio del test**

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la zona del gen *M1* para los virus de la gripe (Influenza A e Influenza B) y del gen *N* para el RSV. 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 + RSV, 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), ROX (Flu B) y Cy5 (RSV) 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 + RSV 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:

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
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 (Flu A), ROX (Flu B), Cy5 (RSV) 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 los virus de Influenza A (FAM), Influenza B (ROX) y RSV (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:

Flu A	Flu B	RSV	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Virus Flu A, Flu B y RSV Positivos
-	-	-	+	-	+	Virus Flu A, Flu B y RSV Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Virus Flu A Positivo, Virus Flu B y RSV Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Virus Flu A y Flu B Positivos, Virus RSV Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Virus Flu A y RSV Positivos, Virus Flu B Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Virus Flu B Positivo, Virus Flu A y RSV Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Virus Flu B y RSV Positivos, Virus Flu A Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Virus RSV Positivo, Virus Flu A y Flu B 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**

Un total de 256 muestras de frotis faríngeos procedentes de pacientes sintomáticos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV y CLART® PneumoVir DNA array (Genómica). Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV detectó el virus de la gripe A en 105 muestras. Dos de estas muestras no pudieron ser detectadas por Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV debido a que presentan una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Un total de 256 muestras de frotis faríngeos procedentes de pacientes sintomáticos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV y CLART® PneumoVir DNA array (Genómica). Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV detectó el virus de la gripe B en 51 muestras. Una de estas muestras no pudo ser detectada por Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV debido a que presenta una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Un total de 256 muestras de frotis faríngeos procedentes de pacientes sintomáticos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV y CLART® PneumoVir DNA array (Genómica). Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV detectó RSV en todas las 41 muestras positivas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Influenza A, Influenza B y RSV utilizando Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV.

## 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  $\geq 10$  copias de RNA viral por reacción.

## Especificidad analítica

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

Influenza A	Influenza B	RSV
<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 A/California/7/2009(H1N1)	Influenza A/California/7/2009(H1N1)
Influenza B/Florida/04/06	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Human metapneumovirus A and B	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Human coronavirus 229E	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09
Human rhinovirus	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)

Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
Human Adenovirus 5	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4
Human parainfluenza 1, 2, 3,4	Respiratory syncytial virus (RSV)	Human metapneumovirus A and B
MERS Coronavirus	Human metapneumovirus A and B	Human coronavirus 229E
	Human coronavirus 229E	Human rhinovirus
	Human rhinovirus	Influenza B/Brisbane/60/2008
	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Influenza B/Florida/04/06
	Human Adenovirus 5	Influenza B/Phuket/3073/2013
	MERS Coronavirus	MERS Coronavirus

### Reactividad analítica

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV ha sido evaluado para Influenza A con las siguientes cepas: A/New Caledonia/20/99(H1N1), cepa derivada de A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, cepa A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, cepa similar a A/Perth/16/2009(H3N2) derivado de A/Victoria/210/2009, cepa A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, cepa A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), cepa A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8), cepa A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) y cepa A/Anhui/1/2013 (H7N9), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV ha sido evaluado para Influenza B con las siguientes cepas: B/Brisbane/60/2008 (linaje B/Victoria), B/Florida/04/06 y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV ha sido evaluado para RSV frente al virus respiratorio sincitial humano (RSV) mostrando un resultado positivo.

### Termocicladores compatibles

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

- Roche LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)

- DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

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 (Influenza A y B) y RSV. 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 debe 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	Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7500 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™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	<b>Bio-Rad</b>
<b>Bio-Rad</b>	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
LightCycler @480 Real-Time PCR System	<b>Eppendorf</b>
LightCycler @96 Real-Time PCR System	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Cobas z480 Analyzer	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
<b>Agilent Technologies</b>	Mx3000P™ Real Time PCR System
AriaMx Real-Time PCR System	Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Qiagen</b>	<b>Analytik Jena Biometra</b>
Rotor-Gene ©	TOptical
<b>Cepheid</b>	qTOWER 2.0
SmartCycler®	<b>Abbott</b>
	Abbott m2000 RealTime System
	<b>BIONEER</b>
	Exicycler™ 96
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time*
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene ©
	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®

\* 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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3029P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

### 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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA- Technology)</b>	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

### Intended use

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

### References

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV 4x8 -well strip, low profile 7041027

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV 4x8-well strip, high profile 7042027

### Materials/reagents provided

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S027/ 7042S027	Flu A+ Flu B + RSV Virus strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C027	Flu A+ Flu B + RSV 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	yelow	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, which belong to the *Orthomyxoviridae* family, 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. Also, influenza A can be divided into numerous subgroups, but the most important ones are the ones that can cause illness in humans, them being, H1N1, H1N2, H2N2, H3N2 and H5N1.

Influenza can be transmitted either by maintaining direct contact with infected individuals, contaminated objects or by inhalation of contaminated aerosols. 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.

The human respiratory syncytial virus (RSV) is an enveloped, single stranded linear RNA genome virus. RSV, which belongs to the genus *Orthopneumovirus*, is divided into two major groups, A and B, based on antigenic and genomic differences.

RSV infection most commonly causes a cold-like illness. But it can also cause bronchitis, croup, and lower respiratory infections like bronchiolitis and pneumonia. Of every 100 infants and young children with RSV infection, 25 to 40 (25% to 40%) will show signs of pneumonia or bronchiolitis.

RSV is transmitted via large nasopharyngeal secretion droplets coming from infected individuals. These droplets enter via the mucus membranes of the eyes, nose and mouth following close contact, or self-inoculation after touching contaminated surfaces.

Several different types of laboratory tests are available for diagnosis of Influenza or RSV infection. Laboratory diagnosis of influenza has been accomplished using cell culture, rapid antigen testing, and, more recently, real-time PCR, concretely qPCR that targets the *M1* gene. Whereas for RSV, antigen detection tests and cultures are generally reliable when diagnosing young children but they are less useful in older children and adults. Use of highly sensitive RT-PCR assays, such as the ones that

target the *N*-gene, should be considered, particularly, when testing older children and adults, as they may have low viral loads in the obtained respiratory specimens.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *M1* gene for Flu A and B and specific conserved fragments of the *N* gene for RSV. 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 + RSV 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 and RSV virus RNA 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 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:

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

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

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

### Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Flu A+ Flu B + RSV Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (transparent 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*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (Influenza A), ROX (Influenza B), Cy5 (RSV) 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 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), ROX (Influenza B) and Cy5 (RSV), 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 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:

Flu A	Flu B	RSV	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Flu A , Flu B and RSV Positive
-	-	-	+	-	+	Flu A, Flu B and RSV Negative
+	-	-	+/-	-	+	Flu A Virus Positive, Flu B and RSV Negative
+	+	-	+/-	-	+	Flu A and Flu B Viruses Positive, and RSV Negative
+	-	+	+/-	-	+	Flu A and RSVs Positive, and Flu B Virus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Flu B Virus Positive, Flu A and RSVs Negative
-	+	+	+/-	-	+	Flu B and RSV Positive, Flu A Virus Negative
-	-	+	+/-	-	+	RSV Positive, Flu A and Flu B Viruses 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 256 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV and CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica). Influenza A virus was detected in 105 samples by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV. Two of them could not be detected by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV because the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

A total of 256 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV and CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica). Influenza B virus was detected in 51 samples by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV. One of them could not be detected by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV because the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

A total of 256 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Flu A+ Flu B +RSV and CLART® PneumoVir DNA array assay (Genomica). RSV was detected in all 41 positive samples by Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Flu A, Flu B and RSV using Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV.

### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Influenza A, Influenza B and RSV templates ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  viral RNA copies per reaction.

## Analytical specificity

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

Influenza A	Influenza B	RSV
<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>
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<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 A/California/7/2009(H1N1)	Influenza A/California/7/2009(H1N1)
Influenza B/Florida/04/06	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)
Influenza B/Phuket/3073/2013	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Influenza A/Switzerland/9715293/2013	Influenza A/Switzerland/9715293/2013
Human metapneumovirus A and B	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014
Human coronavirus 229E	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09
Human rhinovirus	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)
Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
Human Adenovirus 5	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4	Human parainfluenza 1, 2, 3, 4
Human parainfluenza 1, 2, 3,4	Respiratory syncytial virus (RSV)	Human metapneumovirus A and B
MERS Coronavirus	Human metapneumovirus A	Human coronavirus 229E

	and B	
	Human coronavirus 229E	Human rhinovirus
	Human rhinovirus	Influenza B/Brisbane/60/2008
	Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6	Influenza B/Florida/04/06
	Human Adenovirus 5	Influenza B/Phuket/3073/2013
	MERS Coronavirus	MERS Coronavirus

### Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV for Influenza A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013, A/Turkey/Germany R2485+86/2014, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) and A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, showing positive result.

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

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A+ Flu B + RSV for RSV was evaluated against Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) showing positive result.

### Compatible real-time PCR equipment

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

- Roche LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (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 Flu A, Flu B and RSV 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 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
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7500 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™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	<b>Bio-Rad</b>
<b>Bio-Rad</b>	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
LightCycler @480 Real-Time PCR System	<b>Eppendorf</b>
LightCycler @96 Real-Time PCR System	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Cobas z480 Analyzer	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
<b>Agilent Technologies</b>	Mx3000P™ Real Time PCR System
AriaMx Real-Time PCR System	Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Qiagen</b>	<b>Analytik Jena Biometra</b>
Rotor-Gene ©	TOptical
<b>Cepheid</b>	qTOWER 2.0
SmartCycler®	<b>Abbott</b>
	Abbott m2000 RealTime System
	<b>BIONEER</b>
	Exicycler™ 96
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time*
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene ©
	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®

\* 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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3029P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

### 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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA- Technology)</b>	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

## Bibliography/Bibliografia

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/](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.
4. Bawage SS, Tiwari PM, Pillai S, Dennis V, Singh SR. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. Adv Virol. 2013;2013:595768.
5. Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med. 2007 Apr;28(2):171-81.
6. Van Woensel JB, Kimpen JL, Brand PL. Respiratory tract infections caused by respiratory syncytial virus in children. Diagnosis and treatment. Minerva Pediatr. 2001 Apr;53(2):99-106.
7. I.H. Brown, et al. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. Journal of General Virology, 1998; 79: 2947-2955.

## 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
	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



