

# Vitassay qPCR

## Adenovirus

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de Adenovirus en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection of Adenovirus in human samples





## Uso previsto

Vitassay qPCR Adenovirus, permite la detección de adenovirus mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por adenovirus.

## Referencias

Vitassay qPCR Adenovirus 4x8 -well strip, low profile 7041013

Vitassay qPCR Adenovirus 4x8-well strip, high profile 7042013

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S013/ 7042S013	Adenovirus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C013	Adenovirus 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 DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Los adenovirus humanos (HAdV) son virus de DNA ubicuos que pueden causar un amplio espectro de enfermedades. Los adenovirus pertenecen al género *Mastadenovirus*, el cual contiene 7 especies conocidas de adenovirus humano (desde HAdV-A hasta HAdV-G). Históricamente, los HAdV se han clasificado en 51 serotipos mediante reacciones de hemaglutinación y de neutralización del suero, aunque nuevos tipos de adenovirus han sido identificados mediante datos genómicos, por lo que éstos se amplían a un total de 57 serotipos.

Se transmiten por las vías oro-fecal y respiratoria, y conducen a enfermedades respiratorias agudas (representando el 10% de las enfermedades respiratorias febriles en niños) y gastroenteritis. Los serotipos entéricos que están asociados más frecuentemente con este último síntoma son el 40 y el 41, aunque otros serotipos como el 31, 12, 18, 1, 2, 5 y 6 también se han visto envueltos en la etiología de la diarrea aguda.

El diagnóstico de infección por adenovirus se basa normalmente en aislamiento del virus en cultivos o mediante detección del antígeno. Sin embargo, la necesidad de métodos de detección más rápidos y sensibles ha conducido a que la PCR sea el más frecuentemente establecido entre todos ellos. La reacción de PCR a tiempo real dirigida a detectar el gen *hexon* es hoy en día el método de elección debido a su sensibilidad y especificidad.

## Principio del test

Vitassay qPCR Adenovirus se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región diana conservada del gen *hexon* codificado por el genoma de Adenovirus. Tras la extracción de DNA, la presencia de adenovirus codificado por el genoma de adenovirus se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Adenovirus, 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 mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

## Precauciones

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

## Procedimiento

### Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

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

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

## Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Adenovirus Positive Control (tubo rojo) con 100  $\mu\text{L}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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  $\mu\text{L}$  de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5  $\mu\text{L}$  de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

## Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Activación polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (Adenovirus) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

## **Análisis e interpretación de resultados**

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

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

### **Control positivo**

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de Adenovirus (FAM).

### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM.

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:

<b>Adenovirus (FAM)</b>	<b>Control Interno</b>	<b>Control Negativo</b>	<b>Control Positivo</b>	<b>Interpretación</b>
+	+/-	-	+	<b>Adenovirus Positivo</b>
-	+	-	+	<b>Adenovirus Negativo</b>
+	+	+	+	<b>Inválido</b>
-	-	-	-	<b>Inválido</b>

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todas las bacterias 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 95 muestras fecales provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real utilizando tres test de diagnóstico molecular: Vitassay qPCR Adenovirus, RIDA®Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex y RIDA®GENE Viral Stool Panel II (R-biopharm). El patógeno fue detectado en 48 muestras mediante el test Vitassay qPCR Adenovirus mientras que los otros 2 test detectaron 45 muestras positivas para adenovirus. La cantidad de DNA de las muestras discrepantes estaba por debajo del límite de detección del método empleado.

El conjunto de estos resultados nos indica la alta sensibilidad y especificidad para detectar Adenovirus utilizando el kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Adenovirus.

### **Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de las diferentes bacterias ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción.

### **Especificidad analítica**

La especificidad analítica para la detección de adenovirus fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.



No se observaron reacciones cruzadas de adenovirus entre ninguna de las especies:

<b>Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada</b>		
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Clostridium difficile</i>	Rotavirus A
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Norovirus Genotipos I and II
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Astrovirus Genotipos I-VIII
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus tipo 3, cepa GB
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Adenovirus Tipo 4, cepa RI-67
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Adenovirus Tipo 8
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Candida albicans</i>	Adenovirus tipo 15, cepa CH. 38
<i>Campylobacter fetus</i>		

### Reactividad analítica

Vitassay qPCR Adenovirus ha sido evaluado frente a Adenovirus humano 40 cepa Dugan, Adenovirus humano 41 cepa Tak, Adenovirus humano tipo 31 cepa 1315/63, Adenovirus humano tipo 1, Adenovirus humano 2 cepa Adenoid 6 y Adenovirus humano 5, Adenovirus humano tipo 6, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

### Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

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

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

### **Limitaciones**

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Adenovirus. 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 fecales humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con las diferentes bacterias, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER.2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	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	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	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
<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	618/660	
<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 3005P™ 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	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Intended use

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

## References

Vitassay qPCR Adenovirus 4x8 -well strip, low profile 7041013

Vitassay qPCR Adenovirus 4x8-well strip, high profile 7042013

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S013/ 7042S013	Adenovirus strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C013	Adenovirus 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	-	4 x 8 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

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

## Summary

Human adenoviruses (HAdV) are ubiquitous DNA viruses that cause a wide spectrum of illness. Adenoviruses are classified in the genus *Mastadenovirus*, which contains 7 known HAdV species (HAdV-A to HAdV-G). Historically, HAdVs have been classified by hemagglutination and serum neutralization reactions into 51 serotypes, although new adenovirus types identified by genomic data expand the types for a total of 57.

They are transmitted by the fecal-oral route and the respiratory route and are associated with acute respiratory disease (accounting for 10% of febrile respiratory diseases in children) and gastroenteritis. The enteric serotypes most frequently associated with the last symptom are 40 and 41, but additional serotypes 31, 12, 18, 1, 2, 5 and 6 have also been involved in the etiology of acute diarrhea.

Diagnosis of adenovirus infections is currently based on virus isolation in cell culture or antigen detection. However, the need for rapid and sensitive detection methods has led to PCR being the best established among all other methods. The Real time PCR reaction targeting *hexon* gene is now a method of choice due to its sensibility and specificity.

## Principle of the test

Vitassay qPCR Adenovirus test is based on the real-time amplification of a conserved fragments of the *hexon* gene encoded by the adenovirus genome. After DNA isolation, the presence of adenovirus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

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

## Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.

- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing and DNA extraction**

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

Maxwell® RSC Blood DNA Kit, using Maxwell® 16 instrument (Promega).

NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized Adenovirus 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.

### 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 DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

### Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (Adenovirus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

### Analysis and interpretation of results

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

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

## Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (adenovirus) which validates the reaction.

## Negative control

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

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

The result interpretation is summarized in the following table:

Adenovirus (FAM)	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Adenovirus Positive
-	+	-	+	Adenovirus 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

Overall, 95 faecal samples from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using three different molecular diagnostic tests: Vitassay qPCR Adenovirus, RIDA@Gene Rotavirus/Adenovirus Duplex and RIDA@GENE Viral Stool Panel II (r-Biopharm). Adenovirus was detected in 48 samples by Vitassay qPCR Adenovirus while the other two tests detected 45 Adenovirus positive samples. The DNA amount of these three non-detected samples was under the detection limit of the method.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect Adenovirus using the molecular diagnostic kit Vitassay qPCR Adenovirus.

**Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of adenovirus templates ranging from 10<sup>7</sup> to 10<sup>1</sup> copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥10 DNA copies per reaction.

**Analytical specificity**

The analytical specificity for adenovirus was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of adenovirus was seen between any of the species:

<b>Cross-reactivity assay</b>		
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Clostridium difficile</i>	Rotavirus A
<i>Salmonella bongori</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Norovirus Genotypes I and II
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Astrovirus Genotypes I-VIII
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i>	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Adenovirus Type 3, strain GB
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Adenovirus Type 4, strain RI-67
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Adenovirus Type 8
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Candida albicans</i>	Adenovirus Type 15, strain CH. 38
<i>Campylobacter fetus</i>		

## Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Adenovirus was evaluated against Human Adenovirus 40 strain Dugan, Human Adenovirus 41 strain Tak, Human Adenovirus Type 31 strain 1315/63, Human Adenovirus type 1, Human Adenovirus 2 strain Adenoid 6 and Human Adenovirus 5, Human Adenovirus type 6, showing positive result.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Adenovirus has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

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

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

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Adenovirus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- 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 bacteria, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	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	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	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
<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	618/660	
<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 3005P™ 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	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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:

<b>Thermocycler</b>	<b>Vitassay channel</b>	<b>Exposure values</b>
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## **Bibliography/Bibliografía**

1. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 498-505.
2. Damen M, Minnaar R, Glasius P, van der Ham A, Koen G, Wertheim P, Beld M. Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes. *J Clin Microbiol* 2008; 46(12): 3997-4003.
3. Buckwalter SP, Teo R, Espy MJ, Sloan LM, Smith TF, Pritt BS. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3): 766-771.
4. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 247-262.



## 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 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





