

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 respiratorias. 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
Vitassay qPCR Flu A + Flu B 96-well plate, low profile	7091021
Vitassay qPCR Flu A + Flu B 96-well plate, high profile	7092021

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041021 y 7042021:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S021/ 7042S021	Flu A + Flu B 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 x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Reactivos suministrados para las referencias 7091021 y 7092021:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P021/ 7092P021	Flu A + Flu B Virus Plate low/high profile	-	1 placa
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 x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	12 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

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

Resumen

La gripe es una enfermedad respiratoria contagiosa causada por los virus influenza que resulta en una morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas significativas. Los virus influenza son miembros de la familia *Orthomyxoviridae*. Hay cuatro tipos de virus influenza: A, B, C y D. Los virus influenza A y B son los dos tipos principales que causan epidemias estacionales casi todos los inviernos. En todo el mundo, se estima que estas epidemias anuales provocan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves y entre 290 000 y 650 000 muertes respiratorias.

Los virus influenza son virus ARN monocatenarios de sentido negativo. El genoma viral de influenza está compuesto por ocho segmentos. Los virus influenza A se clasifican además en subtipos según las combinaciones de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las proteínas de la superficie del virus. Los virus influenza B se clasifican además en dos linajes: B / Yamagata y B / Victoria. Tanto los virus influenza A como los B se pueden clasificar en grupos y subgrupos específicos.

Los virus de la gripe se transmiten principalmente por pequeñas gotitas que se forman cuando las personas con gripe tosen, estornudan o hablan. Estas gotitas que contienen virus se dispersan en el aire e infectan a las personas cercanas que las respiran. La propagación del virus se produce con menos frecuencia al tocar superficies contaminadas y luego tocarse los ojos, la nariz o la boca. El período de incubación es de aproximadamente 2 días, pero varía de uno a cuatro días. Algunas personas pueden infectarse con el virus de la gripe, pero no presentar síntomas. Durante este tiempo, esas personas aún pueden transmitir el virus a otras personas. Las personas con gripe son más contagiosas en los primeros 3-4 días después de que comienza su enfermedad.

La gripe puede causar una enfermedad de leve a grave y, en ocasiones, puede provocar la muerte. La gripe estacional se caracteriza por la aparición repentina de algunos o todos estos síntomas: fiebre o escalofríos, tos, dolor de garganta, secreción nasal, dolores

musculares o corporales, dolores de cabeza, fatiga (cansancio) y algunas personas pueden tener vómitos y diarrea. Las personas con mayor riesgo de enfermedad grave o complicaciones cuando se infectan son las mujeres embarazadas, los niños menores de 5 años, los ancianos, las personas con afecciones médicas crónicas y las personas con afecciones inmunosupresoras (como el VIH / SIDA, que reciben quimioterapia). Las complicaciones de la gripe pueden incluir neumonía bacteriana, infecciones de oído, infecciones de los senos nasales y empeoramiento de enfermedades crónicas. Otras posibles complicaciones graves pueden incluir inflamación del corazón (miocarditis), del cerebro (encefalitis) o de los tejidos musculares (miositis) e insuficiencia multiorgánica.

La confirmación de laboratorio del virus influenza a partir de secreciones de garganta, nasales y nasofaríngeas o aspirados o lavados traqueales se realiza comúnmente mediante detección directa de antígenos, aislamiento de virus o detección de ARN específico de influenza mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

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* de los virus Influenza A e Influenza B. 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 detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos primers y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el quencher. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

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.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso.
- 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 nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. 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 superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

Las muestras de pacientes deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático optimizado 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 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Preparación del control positivo

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

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

Preparación de la reacción

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

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

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

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

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) e 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 señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

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

En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

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.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, revisar todos los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. En caso de no resolverse, se recomienda repetir el ensayo preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

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 186 muestras de frotis faríngeos de pacientes sintomáticos 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 107 muestras. El ensayo CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para gripe A en 110 muestras clínicas. Estas tres 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 50 muestras fueron positivas por Vitassay qPCR Flu A + Flu B. CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para gripe B en 51 muestras clínicas. La baja cantidad de RNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Además, Vitassay qPCR Flu A + Flu B fue evaluado con el programa EQA QCMD 2017 Influenza virus A and B RNA. Este programa consistía en un panel compuesto por 10

muestras resuspendidas en medio de transporte positivas o negativas para los patógenos de estudio. Vitassay qPCR Flu A + Flu B detectó correctamente todas las muestras del panel.

Estos resultados indican una alta sensibilidad y especificidad para detectar los virus Influenza A y B utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Flu A + Flu 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:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

<i>Bordetella pertussis</i>	MERS Coronavirus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Bordetella holmesii</i>	Bocavirus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina	Virus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza A/South Australia/55/2014
<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	Virus Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Virus Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1
Rhinovirus humano	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63	Virus Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4
Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 31, 40 y 41	Virus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)
Metapneumovirus A y B humano	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8)
Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	Virus Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)
Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09-like
Virus Influenza B/Florida/04/06	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like
Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)
Virus Influenza B/Netherlands/207/06	Virus Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1) pdm09 (clade 6B.1)
Virus Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A)	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09
Virus Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3)	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09
Virus Influenza B/Colorado/6/2017	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)
Virus Influenza B/Maryland/15/2016	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)
Virus Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)
Virus Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a)	Virus Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a)
Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Flu A + Flu B para Influenza A ha sido evaluado con las siguientes cepas: A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09, A/Perth/16/2009(H3N2)-like, A/Thüringen/5/17 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) , A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2), A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8), A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8), A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 y A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

La reactividad de Vitassay qPCR Flu A + Flu B para Influenza B ha sido evaluado con las siguientes cepas: B/Brisbane/60/2008-like, B/Netherlands/207/06, B/Florida/04/06, B/Phuket/3073/2013, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus y B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 y B/Maryland/15/2016, obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

Termocicladores compatibles

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

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

I: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

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 los virus de la gripe A y/o 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.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes virus, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
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
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

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

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

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

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

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

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

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

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 respiratory samples. The product is intended for use in Influenza virus infections diagnosis alongside the patient's clinical data 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
Vitassay qPCR Flu A + Flu B 96-well plate, low profile	7091021
Vitassay qPCR Flu A + Flu B 96-well plate, high profile	7092021

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041021 and 7042021:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S021/ 7042S021	Flu A + Flu B strips low/high profile	-	4 x 8-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 x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8 cap strip

Reagents provided in references 7091021 and 7092021:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P021/ 7092P021	Flu A + Flu B Plate low/high profile	-	1 plate
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 x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	12 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

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

Summary

Influenza (flu) is a contagious respiratory illness caused by influenza viruses resulting in significant morbidity, mortality, and economic losses. Influenza viruses are a member of *Orthomyxoviridae* family. There are four types of influenza viruses: A, B, C and D. Influenza A and B viruses are the two main types of influenza viruses that cause seasonal epidemics almost every winter. Worldwide, these annual epidemics are estimated to result in about 3 to 5 million cases of severe illness, and about 290 000 to 650 000 respiratory deaths.

Influenza viruses are single-stranded, negative-sense RNA viruses. The influenza viral genome is composed of eight segments. Influenza A viruses are further classified into subtypes according to the combinations of the hemagglutinin (HA) and the neuraminidase (NA), the proteins on the surface of the virus. Influenza B viruses are further classified into two lineages: B/Yamagata and B/Victoria. Both influenza A and B viruses can be further classified into specific clades and sub-clades.

Flu viruses spread mainly by tiny droplets made when people with flu cough, sneeze or talk. These droplets containing viruses are dispersed into the air and infect persons in close proximity who breathe these droplets in. Spread of the virus is less often by touching contaminated surfaces and then touching the eyes, nose, or mouth. The incubation period is about 2 days but ranges from one to four days. Some people can be infected with the flu virus but have no symptoms. During this time, those people may still spread the virus to others. People with flu are most contagious in the first 3-4 days after their illness begins.

Influenza can cause mild to severe illness, and at times can lead to death. Seasonal influenza is characterized by a sudden onset of some or all these symptoms: fever or chills, cough, sore throat, runny nose, muscle or body aches, headaches, fatigue (tiredness) and some people may have vomiting and diarrhea. People at greater risk of severe disease or complications when infected are pregnant women, children younger than 5 years old, the elderly, individuals with chronic medical conditions and individuals with immunosuppressive conditions (such as HIV/AIDS, receiving chemotherapy).

Complications of flu can include bacterial pneumonia, ear infections, sinus infections and worsening of chronic medical conditions. Other possible serious complications triggered by flu can include inflammation of the heart (myocarditis), brain (encephalitis) or muscle (myositis) tissues, and multi-organ failure.

Laboratory confirmation of influenza virus from throat, nasal and nasopharyngeal secretions or tracheal aspirate or washings is commonly performed using direct antigen detection, virus isolation, or detection of influenza-specific RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-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 of Influenza A and Influenza B virus. 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 virus presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity that uses two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolyzed by its 5'-3' exonuclease activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of a real-time PCR equipment.

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 sequence is detected in ROX channel whereas the internal control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For professional *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 is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.

- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use.
- 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 and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. 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

Patient samples must be collected, transport and storage according to appropriate laboratory guidelines. For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. Follow the manufacturer's instructions for use. The assay has been validated with the following extraction kits:

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

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (Roche)

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)

Positive control preparation

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

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

Reaction setup

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

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (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 Plus™ or the Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results' analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve for FAM (Influenza A) and ROX (Influenza B) channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show the signal' absence in FAM and ROX channels, which validates the reaction.

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

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

Influenza A	Influenza B	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 failed
-	-	-	-	-	Experiment failed

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids.

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

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to review all the parameters and the sigmoid shape of the curve. If not resolved, it is recommended to repeat the test preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

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 186 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 107 samples by Vitassay qPCR Flu A + Flu B and in 110 samples by CLART® PneumoVir DNA array assay. For these 3 discordant samples, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

For Influenza B virus, a total of 50 clinical samples were positives for Vitassay qPCR Flu A + Flu B whereas CLART® PneumoVir DNA array assay detected 51 positive clinical samples. The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

In addition, Vitassay qPCR Flu A + Flu B was evaluated with the external EQA program QCMD 2017 Influenza virus A and B RNA. That program consisted of a panel composed with 10 samples resuspended in transport medium and they were positive or negative for the studied pathogens. Vitassay qPCR Flu A + Flu B correctly detected all samples from the panel.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect Influenza A and B viruses using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Flu A + Flu 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 viruses was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay	
<i>Bordetella pertussis</i>	MERS Coronavirus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
<i>Bordetella holmesii</i>	Bocavirus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella dumoffii</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Influenza A/South Australia/55/2014 virus
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus
Human rhinovirus	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus
Human coronavirus 229E, OC43 and NL63	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus
Human adenovirus types 1-5, 8, 31, 40, 41	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus
Human metapneumovirus A and B	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus
Respiratory syncytial virus (RSV)	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C) virus
Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09-like virus
Influenza B/Florida/04/06 virus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus
Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus
Influenza B/Netherlands/207/06 virus	Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)
Influenza B/Netherlands/2518/2016 virus (clade 1A)	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus
Influenza B/Netherlands/365/2016 virus (clade 3)	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus
Influenza B/Colorado/6/2017 virus	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus
Influenza B/Maryland/15/2016 virus	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus
Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus
Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)
Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A + Flu B for Influenza A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus, A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Flu A + Flu B for Influenza B was evaluated against strains: B/Brisbane/60/2008-like virus, B/Netherlands/207/06 virus, B/Florida/04/06 virus, B/Phuket/3073/2013 virus, B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, B/Netherlands/365/2016 (clade 3), B/Colorado/6/2017 and B/Maryland/15/2016, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

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

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

I: For Rotor-Gene® Q thermocycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q 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 Influenza A and/or Influenza B virus infections. All results must be interpreted by a specialist 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.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

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

* See Attached III to configure exposure settings.

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

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

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	Color Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

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

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

Bibliography/Bibliografía

1. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Influenza (Flu). Available from: <https://www.cdc.gov/flu/index.htm> Accessed January 2021
2. World Health Organization. Influenza (Seasonal). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) Accessed January 2021
3. Wang R, Taubenberger JK. (2010). Methods for molecular surveillance of influenza. Expert review of anti-infective therapy. 8(5):517-527.
4. Lakdawala SS, Lee N, Brooke CB. (2019). Teaching an Old Virus New Tricks: A Review on New Approaches to Study Age-Old Questions in Influenza Biology. *J Mol Biol.* 431(21):4247-4258.
5. Keilman LJ. (2019). Seasonal Influenza (Flu). *Nurs Clin North Am.* 54(2):227-243.

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™, Mx3005™ and AriaMx 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



VV Vitassay

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

www.vitassay.com