

# Vitassay qPCR

## Panel I / Respiratory viruses

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) y subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial viruses (RSV) and subtyping of Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 in clinical samples.





## Uso previsto

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, permite la detección y diferenciación de Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) y subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) y por los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9.

## Referencias

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses 8x8-well strip, low profile 7041033

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses 8x8-well strip, high profile 7042033

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S027/ 7042S027	Flu A + Flu B + RSV strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S032/ 7042S032	Type II / Flu strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7011S032C/ 7012S032C	Neuroamidase confirmation strips low/high profile	-	1 tira de 8 pocillos
7C033	Panel I / Respiratory viruses 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	-	9 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  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Los influenza virus A y B, pertenecientes a la familia de los Orthomyxoviridae, son los causantes de la mayoría de las 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 influenza 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 influenza virus 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 (RSV), es un tipo de virus poseedor de envoltura y cadena de ARN monocatenaria negativa. El RSV 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 infantes y niños que padecen RSV, 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 autoinoculación 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 RSV, 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.

Del total de muestras positivas encontradas para Influenza A, un 72% se confirmó como subtipo H1N1)pdm09 y un 28% como subtipo H3N2. El número de muestras positivas para los otros dos subtipos (H5N1 y H7N9) está disminuyendo con los años, el último caso informado de H5N1 fue en 2017 y el de H7N9 en 2018. Por lo tanto, el número de veces que será necesario realizar la PCR de confirmación con la tira *Neuroaminidase* confirmation será inferior al 10% de los casos de Influenza detectados con este test.

### **Principio del test**

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *M1* para Influenza A y B, y del gen *N* para RSV (Flu A + Flu B + RSV, tira 1), además de emplear el gen *hemagglutinin* para el subtipaje de Influenza A ((H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9) (Type II / Flu, tira 2) y una región conservada de la zona del gen *neuroaminidase* para el subtipaje de Influenza A H5N1 y H7N9 (*Neuroaminidase* confirmation, tira 3) en muestras respiratorias. 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 Panel I / Respiratory viruses, 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. Cada kit incluye tres tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de Influenza A, Influenza B y/o RSV. Tras la reacción de amplificación, Influenza A se detecta en el canal FAM, Influenza B se detecta en el canal ROX, y RSV se detecta en el canal Cy5. La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de los subtipos (H1N1)pdm09 y H3N2 y el screening de H5N1, y H7N9 (Type II / Flu, tira 2). Tras la reacción de amplificación (H1N1)pdm09 se detecta en el canal FAM, H5N1 se detecta en el canal HEX, VIC o

JOE (según el equipo utilizado), H3N2 se detecta en el canal ROX y H7N9 se detecta en el canal Cy5. La primera tira contiene el control interno (CI) que se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La tercera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la confirmación de los subtipos H5N1 y H7N9 (*Neuroaminidase* confirmation, tira 3). Esta tercera tira solo se debe utilizar cuando se observe amplificación de H5N1 y H7N9 en la segunda tira. Tras la reacción de amplificación H5N1 se detecta en el canal FAM, H7N9 se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) que 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 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 contenido liofilizado del Panel I / Respiratory viruses Positive Control (tubo rojo) con 200 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**

La tercera tira (*Neuroaminidase* confirmation, tira 3) solo se debe utilizar cuando se observe amplificación de H5N1 y/o H7N9 en la segunda tira. Si no se observa amplificación de estos subtipos en la segunda tira, no utilice la tercera tira. Si observa amplificación de estos subtipos proceda como se indica a continuación. Además de esto, no repita el análisis realizado con la primera mezcla de reacción.

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo) (para los pocillos de la tercera tira (*Neuroaminidase* confirmation, tira 3) solo si son necesarios, según lo explicado anteriormente).
- 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 (\*) en la primera tira a través de los canales FAM (Influenza A), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (Influenza B), y Cy5 (RSV), en la segunda tira a través de los canales FAM (H1N1), ROX (H3N2), Cy5 (H7N9) y los canales HEX, JOE o VIC (H5N1) y en la tercera tira a través de los canales FAM (H5N1), ROX (H7N9) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

## **Análisis e interpretación de resultados**

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

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

### **Control positivo**

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales del panel de virus respiratorios.

### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal en el pocillo del control negativo.

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.



## **Interpretación de los resultados para Flu A + Flu B + RSV 8-well strips:**

- Una muestra se considera positiva para Influenza A si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no 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.
- Una muestra se considera positiva para Influenza B si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no 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.
- Una muestra se considera positiva para RSV si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no 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.
- Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral y el control interno sí la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.
- En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

## Interpretación de los resultados para Type II / Flu 8-well strips:

(H1N1) pdm09	H5N1	H3N2	H7N9	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 y H3N2 subtipos positivos; H5N1 y H7N9 subtipos posibles positivos*
-	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 subtipos negativos
+	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo; H3N2, H5N1 y H7N9 negativos
+	+	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo y H5N1 posible positivo; H3N2 y H7N9 negativos*
+	-	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos; H5N1 y H7N9 negativos
+	-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo y H7N9 posible positivo; H3N2 y H5N1 negativos*
+	+	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos y H5N1 posible positivo; H7N9 negativo*
+	+	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positivo, H5N1 y H7N9 posibles positivos; H3N2 negativo*
+	-	+	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 positivos, H7N9 posible positivo; H5N1 negativo*
-	+	-	-	-	+	Influenza A H5N1 posible positivo; Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2 y H7N9 negativos*
-	+	+	-	-	+	Influenza A H5N1 posible positivo y H3N2 positivo; Influenza (H1N1)pdm09 y H7N9 negativos*
-	+	-	+	-	+	Influenza A H5N1 y H7N9 posibles positivos; (H1N1)pdm09 y H3N2 negativos*
-	+	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positivo, H5N1 y H7N9 posibles positivos; y A (H1N1)pdm09 negativo*
-	-	+	-	-	+	Influenza A H3N2 positivo; (H1N1)pdm09, H5N1, y H7N9 negativos
-	-	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positivo y H7N9 posible positivo; (H1N1)pdm09 y H5N1 negativos*
-	-	-	+	-	+	Influenza A H7N9 posible positivo; (H1N1)pdm09, H3N2, y H5N1 negativos*
-	-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	+	Inválido

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

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

\* si observa amplificación en los canales HEX y/o Cy5, debe usar la tira 3 (*Neuroamidase confirmation*) para confirmar los subtipos H5N1 y / o H7N9.

## Interpretación de los resultados para *Neuroaminidase* confirmation 8-well strips:

H5N1	H7N9	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	H5N1 y H7N9 Positivos
-	-	+	-	+	H5N1 y H7N9 Negativo
+	-	+/-	-	+	H5N1 Positivo y H7N9 Negativo
-	+	+/-	-	+	H7N9 Positivo y H5N1 Negativo
-	-	-	-	-	Inválido
+	+	+	+	+	Inválido

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

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

Si las muestras negativas para todos los virus no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

### Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en la primera y tercera tira. 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

Para analizar la sensibilidad y la especificidad clínica se realizaron 2 ensayos clínicos de comparación. En uno se emplearon 256 muestras de frotis faríngeos y en el segundo ensayo se emplearon 127 muestras de frotis faríngeos y muestras en medio de transporte. La comparativa se llevó a cabo con los test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, CLART® PneumoVir DNA array (Genómica) y Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche).

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses detectó el virus de la gripe A en 105 muestras mientras que el test CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para gripe A en 107 muestras clínicas. Estas dos muestras negativas contenían una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses detectó el virus de la gripe B en 51 muestras y el test CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para 52 muestras clínicas. La concentración de RNA de la muestra negativa estaba por debajo del límite de detección.

Para RSV un total de 41 muestras fueron positivas para ambos ensayos.

Como se ha comentado anteriormente, se realizó un segundo ensayo con 127 muestras de frotis faríngeos. Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses detectó (H1N1)pdm09 en 82 muestras. El ensayo CLART® PneumoVir DNA + Cobas® Influenza A/B & RSV fue positivo para (H1N1)pdm09 en 85 muestras clínicas. Estas 3 muestras negativas para Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, eran muestras con una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Influenza A (H3N2) fue positivo para 33 muestras empleando Vitassay qPCR Panel I / Respiratory. EL ensayo CLART® PneumoVir DNA + Cobas® Influenza A/B & RSV fue positivo para H3N2 en 34 muestras clínicas. Esta muestra negativa para Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, era una muestra con una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Vitassay Panel I / Respiratory (tercera tira, *Neuroaminidase* confirmation) se evaluó con 59 muestras disueltas en medio de transporte procedentes de programas EQAs. Los resultados se compararon con los informes finales. Se detectaron 4 muestras positivas de H5N1 y 2 muestras positivas de H7N9.

Estos resultados muestran la alta sensibilidad y especificidad para detectar Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano (RSV) y subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, y H7N9 del kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses.

### **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 del Panel I / Respiratory viruses fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

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

## Reactividad analítica

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR ha sido evaluado con las siguientes cepas para Influenza A: 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.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR ha sido evaluado con las siguientes cepas para Influenza B: B/Brisbane/60/2008-like, 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.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR ha sido evaluado con las siguientes cepas para RSV: virus respiratorio sincitial humano (RSV) A y B, obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR para Influenza A(H1N1)pdm09 fue evaluada con las siguientes cepas: A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 y A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR para Influenza A(H3N2) fue evaluada con las siguientes cepas: 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/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) y A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR para Influenza A(H5N1) fue evaluada con la siguiente cepa: A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses Real Time PCR para Influenza A(H7N9) fue evaluada con las siguientes cepas: A/Anhui/1/2013 (H7N9), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

### **Termocicladores compatibles**

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (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**

- 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 disueltas en medio de transporte. 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	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™ 2 Real-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 Panel I / Respiratory viruses allows the detection and differentiation of Flu A, Flu B, and Respiratory Syncytial (RSV) viruses and subtyping of Flu A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Flu A, Flu B and/or RSV in combination with clinical and epidemiological risk factors and evaluation of infections with Influenza A subtypes: (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses 8x8 -well strip, low profile 7041033

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses 8x8-well strip, high profile 7042033

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S027/ 7042S027	Flu A + Flu B + RSV strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S032/ 7042S032	Type II / Flu strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7011S032C/ 7012S032C	Neuroamidinase confirmation strips low/high profile	-	1 x 8-well strip
7C033	Panel I / Respiratory viruses 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	-	9 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  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- 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.

Of the total positive samples found for Influenza A, 72% were confirmed as subtype H1N1) pdm09 and 28% as subtype H3N2. The number of positive samples for the other two subtypes (H5N1 and H7N9) is decreasing with the years, the last reported case of H5N1 was in 2017 and that of H7N9 in 2018. Therefore, the number of times it will be necessary to perform the Confirmation PCR with the *Neuroaminidase* confirmation strip will be less than 10% of Influenza cases detected with this test.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *M1* gene for Flu A and Flu B and the *N* gene for RSV (Flu A, Flu B & RSV, strip 1), as well as, the *hemagglutinin* gene for Influenza A subtyping (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9 (Type II / Flu, strip 2) and of specific conserved fragments of the *neuroaminidase* gene for Influenza A subtyping H5N1 and H7N9 (*Neuroaminidase* confirmation, strip 3). The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in by polymerase chain reaction. The presence of the RNA viral is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses 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. Each kit includes three kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of Flu A, Flu B and RSV. Influenza A RNA targets are amplified and detected in channel FAM, Influenza B RNA in channel ROX, and RSV RNA in channel Cy5. The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of subtypes (H1N1)pdm09 and H3N2 and the screening of H5N1 and H7N9 (Type II / Flu, strip 2). The amplification of the Influenza A (H1N1)pdm09 RNA target sequence is detected through the FAM channel, H3N2 RNA target in ROX channel, H7N9 RNA target in Cy5 channel and H5N1 RNA target in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached 2). The third strip contains the multiplex reaction mix for the confirmation of the H5N1 and H7N9 subtypes (*Neuroaminidase* confirmation, strip 3). This reaction mix should be used when amplification for H5N1 and H7N9 in the second reaction mix is observed. The amplification of the H5N1 RNA target sequence is

detected through the FAM channel, the H7N9 RNA target in ROX channel and the internal control (IC) is detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

## **Precautions**

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

## **Procedures**

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

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

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

## Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Panel I / Respiratory viruses Positive Control (red tube) in the 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

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

## Reaction setup

The third strip (*Neuroaminidase* confirmation, strip 3) should only be used when amplification of H5N1 and / or H7N9 is observed in the second strip. If amplification of these subtypes is not observed in the second strip, do not use the third strip. If you observe amplification of these subtypes proceed as indicated below. In addition to this, do not repeat the analysis performed with the first reaction mix

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run. (the wells of the third strip (*Neuroaminidase* confirmation, strip 3) only if necessary, as explained above).
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly(optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

## Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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



Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) in the first strip through the FAM (Influenza A), HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)), ROX (Influenza B), and Cy5 channels (RSV); in the second strip through the FAM (Influenza A H1N1), HEX, JOE or VIC (H5N1), ROX (H3N2), and Cy5 channels (H7N9) and in the third reaction mix through the FAM (H5N1), ROX (H7N9) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast 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 in the channels of the respiratory virus panel.

#### **Negative control**

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in the well of the negative control.

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.

#### **Interpretation of results for Flu A + Flu B + RSV 8-well strips:**

- A sample is considered positive for Influenza A if there is an amplification signal in FAM channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of targets can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
- A sample is considered positive for Influenza B if there is an amplification signal in ROX channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of targets can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
- A sample is considered positive for RSV if there is an amplification signal in CY5 channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal

control is not necessary because a high copy number of targets can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (HEX channel). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.
- In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

**Interpretation of results for Type II / Flu 8-well strips:**

(H1N1) pdm09	H5N1	H3N2	H7N9	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes positives; H5N1 and H7N9 subtypes possible positive*
-	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 subtypes negatives
+	-	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive;H3N2, H5N1 and H7N9 negatives
+	+	-	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive and H5N1 possible positive; H3N2 and H7N9 negatives*
+	-	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives;H5N1 and H7N9 negatives
+	-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive and H7N9 possible positive; H3N2 and H5N1 negatives*
+	+	+	-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives and H5N1 possible positive; H7N9 negative*
+	+	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 positive, H5N1 and H7N9 possible positive; H3N2 negative*
+	-	+	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 positives, H7N9 possible positive; H5N1 negative*
-	+	-	-	-	+	Influenza A H5N1 possible positive; Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2 and H7N9 negatives*
-	+	+	-	-	+	Influenza A H5N1 possible positive and H3N2 positive; Influenza (H1N1)pdm09 and H7N9 negatives*
-	+	-	+	-	+	Influenza A H5N1 and H7N9 possible positive;(H1N1)pdm09 and H3N2 negatives*
-	+	+	+	-	+	Influenza A H3N2 Positive, H5N1 and H7N9 possible positive; and A (H1N1)pdm09 negative*
-	-	+	-	-	+	Influenza A H3N2 positive; (H1N1)pdm09, H5N1, and H7N9 negatives
-	-	+	+	-	+	Influenza A H3N2 positive and H7N9 possible positive; (H1N1)pdm09 and H5N1 negatives*
-	-	-	+	-	+	Influenza A H7N9 possible positive; (H1N1)pdm09, H3N2, and H5N1 negatives*
-	-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	+	Experiment fail

**(+) Positive:** Amplification signal

**(-) Negative:** No amplification signal

\* Note that if you observe amplification in the HEX and/or Cy5 channels you should use the *Neuroaminidase* Confirmation strip, to confirm the H5N1 and / or H7N9 subtypes

## The result interpretation for *Neuroaminidase* confirmation 8-well strips:

H5N1	H7N9	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	H5N1 and H7N9 Positives
-	-	+	-	+	H5N1 and H7N9 Negatives
+	-	+/-	-	+	H5N1 Positive and H7N9 Negative
-	+	+/-	-	+	H7N9 Positive and H5N1 Negative
-	-	-	-	-	Experiment fail
+	+	+	+	+	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

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

### Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in strips 1 and 3. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

### Performance evaluation

#### Clinical sensitivity and specificity

To evaluate the clinical sensitivity and the specificity, two clinical assays were carried out. In the first one, 256 throat swabs samples were analyzed with Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses and CLART® PneumoVir DNA array (Genomica).

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses was able to detect Influenza A virus in 105 while CLART® PneumoVir DNA array was able to detect influenza A 107 samples. For this two discordant samples, the amount of RNA was below the detection limit of the method used.

Influenza B virus was detected in 51 samples with Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses and in 52 samples by CLART® PneumoVir DNA array. For this discordant sample, the amount of RNA template was below the detection limit of the method used.

For RSV, a total of 41 clinical samples were positives for both assays.

For the second analysis, 127 throat swabs and samples in transport medium from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses, CLART® PneumoVir DNA array (Genomica) and Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche).

Influenza A (H1N1)pdm09 was detected in 82 samples by Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses and in 85 samples by CLART® PneumoVir DNA + Cobas® Influenza A/B & RSV. For these 3 discordant samples, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

Influenza A (H3N2) was detected in 33 samples by Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses and in 34 samples by CLART® PneumoVir DNA + Cobas® Influenza A/B & RSV. For this discordant sample, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses (Neuroaminidase confirmation) was evaluated with 59 samples dissolved in transport medium from EQAs programs. The results were compared with the final reports. Four positive samples of H5N1 and two positive samples of H7N9 were detected.

The specificity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses shows a high sensitivity and specificity to detect Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial (RSV) viruses and subtyping of Influenza A (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9.

### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Influenza A, Influenza B, RSV, (H1N1)pdm09, H3N2, H5N1 and H7N9 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 Panel I / Respiratory viruses was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

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

## Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Flu 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) virus showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Flu B was evaluated against strains: B/Brisbane/60/2008-like 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 results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for RSV was evaluated against strains: Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) A and B, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Influenza A (H1N1)pdm09 was evaluated against the strains: A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus and A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Influenza A (H3N2) was evaluated against strains: 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/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)) viruses, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Influenza A (H5N1) was evaluated against strains A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses for Influenza A (H7N9) was evaluated against strains: A/Anhui/1/2013(H7N9) virus, showing positive result.

### **Compatibles real-time PCR equipment**

Vitassay qPCR Panel I / Respiratory viruses has been validated on the following equipments:

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

- 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 dissolved in transport medium. 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
<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. 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
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number







**VA** Vitassay

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

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)