

# Vitassay qPCR

**HSM**

PCR en tiempo real para la identificación y diferenciación específica de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the specific identification and differentiation of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* in clinical samples.





## Uso previsto

Vitassay qPCR HSM permite la identificación y diferenciación específica de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* en muestras respiratorias. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones respiratorias producidas por estos patógenos, junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

## Referencias

|  |         |
|--|---------|
| Vitassay qPCR HSM 4x8-well strip, low profile  | 7041065 |
| Vitassay qPCR HSM 4x8-well strip, high profile | 7042065 |

## Materiales/Reactivos suministrados

| Código                | Reactivo/Material           | Color    | Cantidad              |
|-----------------------|-----------------------------|----------|-----------------------|
| 7041S065/<br>7042S065 | HSM strips low/high profile | -        | 4 tiras de 8 pocillos |
| 7C065                 | HSM Positive Control        | rojo     | 1 vial                |
| 7001A                 | PCR grade water             | blanco   | 1 vial x 1 mL         |
| 7002B                 | Resuspension buffer         | verde    | 1 vial x 1,8 mL       |
| 7003N                 | Negative control            | amarillo | 1 vial x 1 mL         |
| 7004O                 | Tapas ópticas               | -        | 4 tiras de 8 tapones  |

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

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

## Resumen

La nasofaringe humana constituye un nicho ideal para las bacterias, incluidas algunas especies potencialmente patógenas. La colonización asintomática de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* puede provocar el desarrollo de infecciones graves de las vías respiratorias, así como de enfermedades invasivas. Se da sobre todo en niños, que podrían transmitir la infección a personas susceptibles, como son sus abuelos. Las infecciones causadas por estas bacterias incluyen neumonía, otitis media, sepsis y meningitis. Se han desarrollado vacunas contra estos patógenos, con las que se han prevenido y disminuido las infecciones y las muertes debidas a los mismos.

*Haemophilus influenzae* es un cocobacilo extracelular gram-negativo pleomórfico que suele colonizar el tracto respiratorio superior de los seres humanos sanos, los cuales son el único reservorio natural conocido de la bacteria. Esta es responsable de una amplia variedad de infecciones de la mucosa de las vías respiratorias y de enfermedades invasivas como la meningitis bacteriana. *H. influenzae* se subdivide en 7 grupos, incluidos 6 que expresan distintos serotipos de cápsula de polisacáridos (serotipos A-F) y un grupo no encapsulado denominado *H. influenzae* no tipificable (NTHi). El NTHi se asocia con mayor frecuencia a enfermedades inflamatorias leves de la mucosa humana, como la otitis media (OM), la sinusitis y las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), pero también puede causar enfermedad invasiva. El *H. influenzae* tipo b (Hib) encapsulado solía ser una de las causas más comunes de infección de las vías respiratorias bajas hasta la introducción de la vacuna contra el *H. influenzae* serotipo b, a principios de la década de 1990 y de la vacuna conjugada de polisacáridos (PCV) contra el *Streptococcus pneumoniae* a principios de la década de 2000. Sin embargo, estas vacunas no protegen contra las cepas de *H. influenzae* no tipificables, cuya incidencia ha aumentado considerablemente, especialmente entre los niños y los ancianos, en todo el mundo.

*Streptococcus pneumoniae* es un patógeno oportunista, extracelular y gram-positivo que coloniza las superficies mucosas del tracto respiratorio superior humano. La clasificación basada en su cápsula de polisacáridos clasifica a *S.pneumoniae* en al menos 97 serotipos antigénicamente distintos. Hasta el 27-65% de los niños y <10% de los adultos son portadores de *S. pneumoniae*, teniendo una relación comensal con la bacteria. *S.pneumoniae* podría desarrollar una enfermedad inflamatoria invasiva por diseminación local, aspiración o siembra al torrente sanguíneo. *S. pneumoniae* es una de las principales causas bacterianas de una amplia gama de infecciones, como la otitis media, la neumonía adquirida en la comunidad, la sepsis y la meningitis. La infección suele producirse junto con infecciones virales del tracto respiratorio superior.

*Moraxella catarrhalis* es un diplococo gram-negativo, aeróbico, no móvil y no encapsulado, de la familia *Moraxellaceae*. Es un patógeno exclusivamente humano con

su nicho localizado en el tracto respiratorio humano. *M. catarrhalis* causa infecciones de las mucosas en niños inmunocompetentes (principalmente otitis media) y adultos (exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica). La enfermedad invasiva es extremadamente rara y ocurre casi exclusivamente en individuos inmunocomprometidos. El uso generalizado de las vacunas conjugadas contra el neumococo ha alterado los patrones de colonización nasofaríngea y ha provocado un aumento de la prevalencia de la colonización y la infección por *M. catarrhalis*.

### Principio del test

Vitassay qPCR HSM se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *hdp* para *Haemophilus influenzae*, *lytA* y *piaA* para *Streptococcus pneumoniae* y *copB* para *Moraxella catarrhalis*. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos 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 HSM, se trata de una prueba lista 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. Tras la reacción de amplificación *H. influenzae* se detecta en el canal FAM, *S. pneumoniae* se detecta en el canal ROX, *M. catarrhalis* se detecta en el canal Cy5 y el control interno (CI) se detecta en HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

### Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- 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, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## **Procedimiento**

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

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)

### **Preparación del control positivo**

Reconstituir el contenido liofilizado del HSM 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 para cada uno de los ensayos).
- 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 DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o 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 |
|--|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial                      | 95°C        | 2 min  | 1      |
| Desnaturalización                              | 95°C        | 10 seg | 45     |
| Hibridación/Elongación<br>(Recogida de datos*) | 60°C        | 50 seg |        |

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (*H. influenzae*), ROX (*S. pneumoniae*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), y Cy5 (*M. catarrhalis*). 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 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 en 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 (Ct ≤40) en los canales FAM, ROX, y Cy5.

## Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >40 o no señal) de FAM, ROX, y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

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

| HSM                           |                               |                                |                          | Interpretación  |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---|
| <i>H. influenzae</i><br>(FAM) | <i>S. pneumoniae</i><br>(ROX) | <i>M. catarrhalis</i><br>(Cy5) | Control Interno<br>(HEX) |   |
| +                             | +                             | +                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>M. catarrhalis</i> Positivos           |
| +                             | -                             | -                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>H. influenzae</i> Positivo, <i>S. pneumoniae</i> y <i>M. catarrhalis</i> Negativos   |
| +                             | +                             | -                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>H. influenzae</i> y <i>S. pneumoniae</i> Positivos, y <i>M. catarrhalis</i> Negativo |
| +                             | -                             | +                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>H. influenzae</i> y <i>M. catarrhalis</i> Positivos, y <i>S. pneumoniae</i> Negativo |
| -                             | +                             | -                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>S. pneumoniae</i> Positivo, <i>H. influenzae</i> y <i>M. catarrhalis</i> Negativos   |
| -                             | +                             | +                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>S. pneumoniae</i> y <i>M. catarrhalis</i> Positivos, y <i>H. influenzae</i> Negativo |
| -                             | -                             | +                              | +/- <sup>1</sup>         | <i>M. catarrhalis</i> Positivo, <i>H. influenzae</i> y <i>S. pneumoniae</i> Negativos   |
| -                             | -                             | -                              | + <sup>2</sup>           | DNA molde diana no Detectado  |
| -                             | -                             | -                              | - <sup>2</sup>           | Test fallido  |

**Positivo (+):** Señal de amplificación (Ct ≤40)

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

<sup>1</sup> 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

<sup>2</sup> En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35



del control interno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también 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**

En un estudio se analizaron 126 muestras respiratorias (muestras de esputo, lavado broncoalveolar, broncoaspirado, frotis óticos, nasales, y faríngeos) procedentes de pacientes con síntomas de infección respiratoria, con el kit Vitassay qPCR HSM. La extracción se realizó con Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular) y para el análisis se utilizó el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR HSM fueron comparados con los obtenidos con el FTD Bacterial pneumoniae CAP (Fast Track Diagnostics) y se muestran en la siguiente tabla:

| Microorganismo        | TP | TN | FP | FN | Muestras totales | SE               | SP               | PPV              | NPV              | Kappa |
|-----------------------|----|----|----|----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| <i>H. influenzae</i>  | 82 | 39 | 0  | 5* | 126              | 0.94 (0.86-0.97) | 1 (0.88-1)       | 1 (0.94-1)       | 0.88 (0.74-0.95) | >0.99 |
| <i>S. pneumoniae</i>  | 33 | 91 | 0  | 2* | 126              | 0.94 (0.79-0.99) | 1 (0.94-1)       | 1 (0.87-1)       | 0.97 (0.91-0.99) | >0.99 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 33 | 81 | 4* | 8* | 126              | 0.8 (0.64-0.9)   | 0.95 (0.87-0.98) | 0.89 (0.73-0.96) | 0.91 (0.82-0.95) | >0.99 |

TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo, Kappa = valor Kappa.

\*La cantidad de DNA en estas muestras respiratorias está por debajo del límite de detección del método utilizado.

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar estos patógenos utilizando Vitassay qPCR HSM.

### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción para *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis*.

### Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

| Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada |     |   |     |   |   |
|---|-----|---|-----|---|---|
| <i>Bordetella pertussis</i>                           | -   | <i>Moraxella catarrhalis</i>                            | -/+ | Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i>                       | -   | <i>Haemophilus influenzae</i>                           | -/+ | Virus Influenza B/Florida/04/06         | - |
| <i>Bordetella holmesii</i>                            | -   | <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>                        | -   | Virus Influenza B/Phuket/3073/2013      | - |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i>                      | -   | Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)             | -   | Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4  | - |
| <i>Legionella bozemanii</i>                           | -   | Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)               | -   | Metapneumovirus A y B humano            | - |
| <i>Legionella micdadei</i>                            | -   | Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09          | -   | Coronavirus 229E humano                 | - |
| <i>Legionella dumoffii</i>                            | -   | Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)                   | -   | MERS Coronavirus                        | - |
| <i>Legionella pneumophila</i>                         | -   | Virus Influenza A/Thüringen/5/17 A(H3N2)                | -   | Adenovirus humano                       | - |
| Bocavirus humano                                      | -   | Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)       | -   | Rinovirus humano                        | - |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                       | -/+ | Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/ 2014 (H5N8)  | -   | Virus respiratorio sincitial (RSV)      | - |
| <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>            | -   | Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)* | -   | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>            | - |
| <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>    | -   | Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)                   | -   |   |   |

### Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR HSM para *H. influenzae* se evaluó frente a la cepa *Haemophilus influenzae*, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR HSM para *S. pneumoniae* se evaluó frente a la cepa *Streptococcus pneumoniae*, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR HSM para *M. catarrhalis* se evaluó frente a la cepa *Moraxella catarrhalis*, mostrando resultados positivos.

## Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR HSM ha sido validado en los siguientes equipos:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>1</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche)

<sup>1</sup>: 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 validado con DNA extraído de frotis óticos, nasales y faríngeos, muestras de esputo y lavado broncoalveolar y broncoaspirado. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el HSM positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

| Termocicladores con bloque de bajo perfil                   |
|---|
| <b>Agilent Technologies</b>                                 |
| AriaMx Real-Time PCR System                                 |
| AriaDx Real-Time PCR System                                 |
| <b>Applied Biosystems</b>                                   |
| 7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>           |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>        |
| 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™ 5 Fast Real-Time PCR System                    |
| QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>     |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>           |
| StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>                |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System                           |
| <b>Azure Biosystems</b>                                     |
| Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>                                |
| Azure Cielo 6   |
| <b>BIONEER</b>  |
| Exicycler™ 96   |
| <b>Bio-Rad</b>  |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System                       |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup> |
| <b>Roche</b>  |
| LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>    |
| LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>         |
| Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>                      |

| Formatos especiales <sup>(7)</sup>        |
|---|
| <b>Bio Molecular Systems</b>              |
| Mic Real Time PCR Cycler                  |
| <b>Cepheid</b>                            |
| SmartCycler®                              |
| <b>Precision System Science Co., Ltd.</b> |
| geneLEAD VIII System                      |
| <b>Qiagen</b>                             |
| Rotor-Gene® Q                             |

| Termocicladores con bloque de alto perfil                 |
|---|
| <b>Abbott</b>   |
| Abbott m2000 <sup>(1)</sup>                               |
| <b>Applied Biosystems</b>                                 |
| 7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>              |
| 7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>                  |
| 7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>                  |
| ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>                             |
| ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>                             |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well                             |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well                               |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well                               |
| QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System                  |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System                       |
| QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>        |
| ViiA™ 7 Real-Time PCR System                              |
| <b>Agilent Technologies</b>                               |
| Mx3000P™ Real Time PCR System                             |
| Mx3005P™ Real Time PCR System                             |
| <b>Analytik Jena</b>                                      |
| qTOWER  |
| <b>BIONEER</b>  |
| Exicycler™ 96   |
| <b>BIOER</b>  |
| QuantGene 9600  |
| <b>Bio-Rad</b>  |
| CFX96™ Deep Well Real-Time PCR                            |
| iCycler iQ™ Real-Time PCR                                 |
| iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR                               |
| My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>      |
| My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>    |
| <b>DNA-Technology</b>                                     |
| DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>                |
| DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(8)</sup> |
| <b>Eppendorf</b>  |
| Mastercycler™ ep <i>realplex</i>                          |
| <b>Qiagen</b>   |
| QIAquant 96   |

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

## Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

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>Applied Biosystems ABI 7500</b>                    | FAM            | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada   |
|   | HEX            | VIC                |   |
|   | ROX            | ROX                |   |
|   | Cy5            | Cy5                |   |
| <b>Roche Lightcycler®4 80II</b>                       | FAM            | 465/510            | Se requiere compensación de color   |
|   | HEX            | 533/580            |   |
|   | ROX            | 533/610            |   |
|   | Cy5            | 618/660            |   |
| <b>Roche Cobas z 480</b>                              | FAM            | 465/510            | Se requiere compensación de color   |
|   | HEX            | 540/580            |   |
|   | ROX            | 540/610            |   |
|   | Cy5            | 610/670            |   |
| <b>Cepheid Smartcycler®</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>Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™</b>        | FAM            | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada   |
|   | HEX            | HEX                |   |
|   | ROX            | ROX                |   |
|   | Cy5            | Cy5                |   |
| <b>Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler</b> | 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 para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10) |
|   | HEX            | Yellow             |   |
|   | ROX            | Orange             |   |
|   | Cy5            | Red                |   |
| <b>Agilent Technologies AriaMx</b>                    | FAM            | FAM                |   |
|   | HEX            | HEX                |   |
|   | ROX            | ROX                |   |
|   | Cy5            | Cy5                |   |
| <b>Qiagen Rotor-Gene® Q</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>BIONEER<br/>Exicycler™ 96</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>DTIite Real-Time PCR<br/>System (DNA-Technology)</b>                    | FAM            | 500                 |
|  | HEX            | 500                 |
|  | ROX            | 500                 |
|  | Cy5            | 500                 |
| <b>DTprime Real-time<br/>Detection Thermal Cycler<br/>(DNA-Technology)</b> | 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 HSM allows the specific identification and differentiation of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* in respiratory samples. This product is intended to aid in the diagnosis of respiratory infections caused by these pathogens, alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

## References

|  |         |
|--|---------|
| Vitassay qPCR HSM 4x8-well strip, low profile  | 7041065 |
| Vitassay qPCR HSM 4x8-well strip, high profile | 7042065 |

## Materials/reagents provided

| Reference             | Reagent/Material            | Colour | Amount           |
|-----------------------|-----------------------------|--------|------------------|
| 7041S065/<br>7042S065 | HSM strips low/high profile | -      | 4 x 8-well strip |
| 7C065                 | HSM Positive Control        | red    | 1 vial           |
| 7001A                 | PCR grade water             | white  | 1 vial x 1 mL    |
| 7002B                 | Resuspension Buffer         | green  | 1 vial x 1,8 mL  |
| 7003N                 | Negative control            | yellow | 1 vial x 1 mL    |
| 7004O                 | Optical caps                | -      | 4 x 8-cap strip  |

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

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

## Summary

The human nasopharynx provides a niche for different bacteria including some potentially pathogenic species. Asymptomatic carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* can precede the development of severe respiratory tract infections as well as invasive diseases. It occurs mostly in children, which later could transmit the infection to susceptible individuals, such as their grandparents. The infections caused by these bacteria include pneumonia, otitis media, sepsis, and meningitis. Some vaccines against these pathogens have been developed, with which infections and deaths have been prevented and decreased.

*Haemophilus influenzae* is a pleomorphic Gram-negative extracellular coccobacillus that commonly colonizes the upper respiratory tract of healthy humans, who are the bacterium's only known natural reservoir, and which is responsible for a wide variety of airway mucosal infections and invasive diseases such as bacterial meningitis. The *H. influenzae* species are subdivided into 7 groups, including 6 that express distinct serotypes of polysaccharide capsule (serotypes A to F) and 1 unencapsulated group termed non-typeable *H. influenzae* (NTHi). NTHi is most frequently associated with mild inflammatory diseases of the human mucosa, including otitis media (OM), sinusitis, and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), but it can also cause invasive disease. Encapsulated *H. influenzae* type b (Hib) was used to be one of the most common causes of lower respiratory infection until the introduction of the *H. influenzae* serotype b vaccination in the early 1990s and of the *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide conjugate vaccine (PCV) in the early 2000s. However, these vaccines fail to protect against non-typeable *H. influenzae* strains, which incidence has increased substantially especially among children and the elderly, worldwide.

*Streptococcus pneumoniae* is a Gram-positive, extracellular, opportunistic pathogen that colonizes the mucosal surfaces of the human upper respiratory tract. The classification based in its polysaccharide capsule, classifies *S.pneumoniae* in at least 97 antigenically distinct serotypes. Up to 27-65% of children and <10% of adults are carriers of *S. pneumoniae*, having a commensal relationship with the bacteria. It could develop an invasive inflammatory disease by local spread, aspiration or seeding to the bloodstream. *S. pneumoniae* is a leading bacterial cause of a wide range of infections, including otitis media, community-acquired pneumonia, sepsis, and meningitis. The infection usually occurs in conjunction with viral infections of the upper respiratory tract.

*Moraxella catarrhalis* is a Gram-negative, aerobic, nonmotile, and non-encapsulated diplococcus, within *Moraxellaceae* family. It is an exclusively human pathogen with an ecological niche in the human respiratory tract. *M. catarrhalis* causes mucosal infections in immunocompetent children (mainly otitis media) and adults (acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease). Invasive disease is extremely rare and almost exclusively occurs in immunocompromised individuals. The widespread use of

pneumococcal conjugate vaccines has altered nasopharyngeal colonization patterns and caused an increased prevalence of colonization and infection by *M. catarrhalis*.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR HSM is based on the real-time amplification of a conserved region of *hdp* gene for *Haemophilus influenzae*, *lytA* and *piaA* genes for *Streptococcus pneumoniae* and *copB* gene for *Moraxella catarrhalis*. After DNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR HSM 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 inhibition reaction. After the amplification reaction, *H. influenzae* is detected in FAM channel, *S. pneumoniae* is detected in ROX channel, *M. catarrhalis* is detected in Cy5 channel and the Internal Control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

### **Precautions**

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.

- 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, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

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

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized HSM 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 for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into 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 |
|---|-------------|--------|--------|
| Initial denaturation                      | 95°C        | 2 min  | 1      |
| Denaturation                              | 95°C        | 10 sec | 45     |
| Annealing/Extension<br>(Data collection*) | 60°C        | 50 sec |        |

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (*H. influenzae*), ROX (*S. pneumoniae*), HEX, JOE, or VIC (Internal Control), and Cy5 (*M. catarrhalis*) channels. If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, or Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none (See 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 (Ct ≤40) in FAM, ROX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

## Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct >40 or no signal) in FAM, ROX, and Cy5, 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 for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in positive control and negative control wells.

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

| HSM                        |                            |                             |                        | Interpretation  |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| <i>H. influenzae</i> (FAM) | <i>S. pneumoniae</i> (ROX) | <i>M. catarrhalis</i> (Cy5) | Internal Control (HEX) |   |
| +                          | +                          | +                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> and <i>M. catarrhalis</i> Positives             |
| +                          | -                          | -                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>H. influenzae</i> Positive, <i>S. pneumoniae</i> and <i>M. catarrhalis</i> Negatives     |
| +                          | +                          | -                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i> Positives, and <i>M. catarrhalis</i> Negative |
| +                          | -                          | +                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>H. influenzae</i> and <i>M. catarrhalis</i> Positives, and <i>S. pneumoniae</i> Negative |
| -                          | +                          | -                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>S. pneumoniae</i> Positive, <i>H. influenzae</i> and <i>M. catarrhalis</i> Negatives     |
| -                          | +                          | +                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>S. pneumoniae</i> and <i>M. catarrhalis</i> Positives, and <i>H. influenzae</i> Negative |
| -                          | -                          | +                           | +/- <sup>1</sup>       | <i>M. catarrhalis</i> Positive, <i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i> Negatives     |
| -                          | -                          | -                           | + <sup>2</sup>         | Targets not detected <sup>2</sup>   |
| -                          | -                          | -                           | - <sup>2</sup>         | Test failure <sup>2</sup>   |

**(+) Positive:** Amplification signal (Ct ≤40)

**(-) Negative:** No amplification signal (Ct >40 or no signal)

<sup>1</sup> 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. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

<sup>2</sup> In the case of negative pathogens target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is a signal' absence or Ct value >35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps, to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, 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. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

### **Performance evaluation**

#### **Clinical sensitivity and specificity**

In one study, 126 respiratory samples (sputum, bronchoalveolar lavages, bronchial aspirate, and otic, nasal and throat swabs) from symptomatic patients were analyzed with Vitassay qPCR HSM kit. The extraction was performed with the Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular) and CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) was used as Real Time PCR platform.

The Vitassay qPCR HSM kit's results were compared with those of the FTD Bacterial pneumoniae CAP (Fast Track Diagnostics), and the obtained results are shown in the following table:



| Target                | TP | TN | FP | FN | Total samples | SE               | SP               | PPV              | NPV              | Kappa |
|-----------------------|----|----|----|----|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| <i>H. influenzae</i>  | 82 | 39 | 0  | 5* | 126           | 0.94 (0.86-0.97) | 1 (0.88-1)       | 1 (0.94-1)       | 0.88 (0.74-0.95) | >0.99 |
| <i>S. pneumoniae</i>  | 33 | 91 | 0  | 2* | 126           | 0.94 (0.79-0.99) | 1 (0.94-1)       | 1 (0.87-1)       | 0.97 (0.91-0.99) | >0.99 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 33 | 81 | 4* | 8* | 126           | 0.8 (0.64-0.9)   | 0.95 (0.87-0.98) | 0.89 (0.73-0.96) | 0.91 (0.82-0.95) | >0.99 |

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value, Kappa = Kappa value. \*The DNA amount in these respiratory samples is below the detection limit of the method used.

In conclusion, the results show a high sensibility and specificity to detect those pathogens using Vitassay qPCR HSM.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/reaction. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*.

### Analytical specificity

The analytical specificity for *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species, except for the targeted pathogens of each assay:

### Cross-reactivity testing

|  |     |   |     |   |   |
|--|-----|---|-----|---|---|
| <i>Bordetella pertussis</i>                        | -   | <i>Moraxella catarrhalis</i>                            | -/+ | Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i>                    | -   | <i>Haemophilus influenzae</i>                           | -/+ | Virus Influenza B/Florida/04/06         | - |
| <i>Bordetella holmesii</i>                         | -   | <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>                        | -   | Virus Influenza B/Phuket/3073/2013      | - |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i>                   | -   | Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)             | -   | Human parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4 | - |
| <i>Legionella bozemanii</i>                        | -   | Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)               | -   | Human Metapneumovirus A and B           | - |
| <i>Legionella micdadei</i>                         | -   | Virus Influenza A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09         | -   | Human Coronavirus 229E                  | - |
| <i>Legionella dumoffii</i>                         | -   | Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)                   | -   | MERS Coronavirus                        | - |
| <i>Legionella pneumophila</i>                      | -   | Virus Influenza A/Thüringen/5/17 A(H3N2)                | -   | Human Adenovirus                        | - |
| Human Bocavirus                                    | -   | Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)       | -   | Human Rinovirus                         | - |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                    | -/+ | Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/ 2014 (H5N8)  | -   | Respiratory Syncytial virus (RSV)       | - |
| <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>         | -   | Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)* | -   | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>            | - |
| <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> | -   | Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)                   | -   |   |   |

### Analytical reactivity

The Vitassay qPCR HSM kit's reactivity for *H. influenzae* was evaluated against *Haemophilus influenzae* strain, showing positive results.

The Vitassay qPCR HSM kit's reactivity for *S. pneumoniae* was evaluated against *Streptococcus pneumoniae* strain, showing positive results.

The Vitassay qPCR HSM kit's reactivity for *M. catarrhalis* was evaluated against *Moraxella catarrhalis* strain, showing positive results.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR HSM has been validated on the following equipment:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)<sup>1</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)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche)

<sup>1</sup>: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

## Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay has been validated with DNA extracted from respiratory samples (otic, nasal and throat swabs, sputum, bronchoalveolar lavages and bronchial aspirate). The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by HSM Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

| Low profile Block Thermocyclers                             | High profile Block Thermocyclers                           |
|---|--|
| <b>Agilent Technologies</b>                                 | <b>Abbott</b>  |
| AriaMx Real-Time PCR System                                 | Abbott m2000 <sup>(1)</sup>                                |
| AriaDx Real-Time PCR System                                 | <b>Applied Biosystems</b>                                  |
| <b>Applied Biosystems</b>                                   | 7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>               |
| 7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>           | 7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>                   |
| 7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>        | 7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>                   |
| QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast                          | ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>                              |
| QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast                            | ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>                              |
| QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast                            | QuantStudio™ 12K Flex 96-well                              |
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System                         | QuantStudio™ 6 Flex 96-well                                |
| QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System                    | QuantStudio™ 7 Flex 96-well                                |
| QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>     | QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System                   |
| StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>           | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System                        |
| StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>                | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>         |
| ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System                           | ViiA™ 7 Real-Time PCR System                               |
| <b>Azure Biosystems</b>                                     | <b>Agilent Technologies</b>                                |
| Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>                                | Mx3000P™ Real Time PCR System                              |
| Azure Cielo 6   | Mx3005P™ Real Time PCR System                              |
| <b>BIONEER</b>  | <b>Analytik Jena</b>                                       |
| Exicycler™ 96   | qTOWER   |
| <b>Bio-Rad</b>  | <b>BIONEER</b>   |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System                       | Exicycler™ 96  |
| Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup> | <b>BIOER</b>   |
| <b>Roche</b>  | QuantGene 9600   |
| LightCycler®480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>     | <b>Bio-Rad</b>   |
| LightCycler®96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>          | CFX96™ Deep Well Real-Time PCR                             |
| Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>                      | iCycler iQ™ Real-Time PCR                                  |
|   | iCycler iQ™5 Real-Time PCR                                 |
|   | My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>       |
|   | My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>     |
| <b>Special Formats <sup>(7)</sup></b>                       | <b>DNA-Technology</b>                                      |
| <b>Bio Molecular Systems</b>                                | DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>                 |
| Mic Real Time PCR Cyclers                                   | DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers <sup>(8)</sup> |
| <b>Cepheid</b>  | <b>Eppendorf</b>   |
| SmartCycler®  | Mastercycler™ ep <i>realplex</i>                           |
| <b>Precision System Science Co., Ltd.</b>                   | <b>Qiagen</b>  |
| geneLEAD VIII System  | QIAquant 96  |
| <b>Qiagen</b>   |  |
| Rotor-Gene® Q   |  |

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) 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   |
|---|------------------|-------------------|--|
| <b>Bio-Rad CFX96™</b>                                 | FAM              | FAM               |  |
|   | HEX              | HEX               |  |
|   | ROX              | ROX               |  |
|   | Cy5              | Cy5               |  |
| <b>Applied Biosystems ABI 7500</b>                    | FAM              | FAM               | Passive reference option ROX is none   |
|   | HEX              | VIC               |  |
|   | ROX              | ROX               |  |
|   | Cy5              | Cy5               |  |
| <b>Roche Lightcycler®48 0II</b>                       | FAM              | 465/510           | Colour Compensation required   |
|   | HEX              | 533/580           |  |
|   | ROX              | 533/610           |  |
|   | Cy5              | 618/660           |  |
| <b>Roche Cobas z 480</b>                              | FAM              | 465/510           | Colour Compensation required   |
|   | HEX              | 540/580           |  |
|   | ROX              | 540/610           |  |
|   | Cy5              | 610/670           |  |
| <b>Cepheid Smartcycler®</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>Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™</b>        | FAM              | FAM               | Passive reference option ROX is none   |
|   | HEX              | HEX               |  |
|   | ROX              | ROX               |  |
|   | Cy5              | Cy5               |  |
| <b>Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler</b> | 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               |  |
| <b>Agilent Technologies AriaMx</b>                    | FAM              | FAM               |  |
|   | HEX              | HEX               |  |
|   | ROX              | ROX               |  |
|   | Cy5              | Cy5               |  |
| <b>Qiagen Rotor-Gene® Q</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>BIONEER<br/>Exicycler™ 96</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:

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










- Aebi C. (2011). *Moraxella catarrhalis* – pathogen or commensal? *Advances in experimental medicine and biology*, 697:107-116.
- Keller LE, Robinson DA and McDaniel LS. (2016). Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *mBio*, 7(2):e01792.
- Kovács E, Sahin Tóth J, Tóthpál A, van der Linden M, Tirczka T and Dobay O. (2020). Co-carriage of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* among three different age categories of children in Hungary. *PLoS one*. 15(2):e0229021.
- Langereis JD and de Jonge MI. (2015). Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerging infectious diseases*. 21(10):1711-1718.
- Murphy TF and Parameswaran GI. (2009). *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clinical infectious diseases: and official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(19):124-131.
- Weiser JN, Ferreira DM and Paton JC. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature reviews. Microbiology*. 16(6):355-367.
- Wen S, Feng D, Chen D, Yang L and Xu Z. (2020). Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 80:1042056.



## Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
|   | Producto para diagnóstico <i>in vitro</i><br>For in vitro diagnostic use only |    | Almacenar en lugar seco<br>Keep dry                   |
|   | Consultar las instrucciones de uso<br>Consult instructions for use            |    | Limitación de temperatura<br>Temperature limitation   |
|   | Fecha de caducidad<br>Use by  |    | Fabricante<br>Manufacturer                            |
|  | Número de lote<br>Lot number  |   | Contiene <n> test<br>Contains sufficient for <n> test |
|  |   |  | Número de referencia<br>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)