

Vitassay qPCR

Type I/Flu

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Type I/Flu permite la detección y diferenciación de los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 mediante RT-PCR a tiempo real en muestras respiratorias. El objetivo de este producto es facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los subtipos de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2.

Referencias

Vitassay qPCR Type I/Flu 4x8 -well strip, low profile	7041031
Vitassay qPCR Type I/Flu 4x8-well strip, high profile	7042031

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S031/ 7042S031	Type I/Flu strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C031	Type I/Flu Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1 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 RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los virus influenza 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. Se consideran especialmente vulnerables los individuos mayores de 65 años y aquéllos menores de esa edad con alguna condición clínica especial que los predisponga a padecer una gripe complicada. Estos virus son una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

Las epidemias estacionales de gripe provocan aproximadamente 3–5 millones de casos y 250–500000 muertes anualmente. El resultado de esto es un acentuado impacto económico que incluye tanto costes directos como indirectos. Además, las epidemias del virus influenza 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.

Estos 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. Aunque la mayoría de los pacientes presentan cuadros clínicos autolimitados de gravedad moderada y sin complicaciones significativas, algunos desarrollan cuadros clínicos muy severos, caracterizados en su mayoría por neumonías, exacerbaciones de enfermedad pulmonar crónica y que pueden tener un desenlace fatal.

El diagnóstico de influenza está basado en el cultivo celular, testeo rápido de antígenos y, más recientemente, en la PCR en Tiempo Real. Esta técnica permite la detección de los dos subtipos de influenza A (H1N1 y H3N2) de forma más sensible y específica.

Principio del test

Vitassay qPCR Type I/Flu se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *hemagglutinin* para el subtipaje de Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 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 del RNA viral se confirma mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Type I/Flu, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana se detecta en los canales FAM ((H1N1)pdm09) y ROX (H3N2) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

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

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento del RNA 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 Type I/Flu Positive Control (tubo rojo) en 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 demás componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

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

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM ((H1N1)pdm09), ROX (H3N2) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ 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 estudiadas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de los virus (H1N1)pdm09 (FAM) y H3N2 (ROX).

Control negativo

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

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. Se recomienda repetir el ensayo.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

(H1N1)pdm09	H3N2	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 y H3N2 Positivos
-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 y H3N2 Negativos
+	-	+/-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 Positivo, H3N2 Negativo
-	+	+/-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 Negativo, H3N2 Positivo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

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

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 92 muestras de muestras respiratorias fueron analizadas mediante dos métodos de detección molecular: Vitassay qPCR Type I/Flu y CLART® PneumoVir DNA array (Genómica).

Vitassay qPCR Type I/Flu detectó la presencia de (H1N1)pdm09 en 55 muestras. El ensayo CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para (H1N1)pdm09 en 60 muestras clínicas. Estas 5 muestras negativas para Vitassay qPCR Type I/Flu, eran muestras con una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Vitassay qPCR Type I/Flu detectó H3N2 en 29 muestras. EL ensayo CLART® PneumoVir DNA array fue positivo para H3N2 en 30 muestras clínicas. Esta muestra negativa para Vitassay qPCR Type I/Flu, era muestra con una concentración de RNA por debajo del límite de detección.

Además, Vitassay qPCR Type I/Flu fue evaluado con el programa QCMD 2017 influenza Haemagglutinin typing EQA programme (INFHT17). Este programa consistió en 8 muestras positivas o negativas para el patógeno de estudio. Vitassay qPCR Type I/Flu detectó correctamente todas las muestras del panel.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los Virus influenza A (H1N1)pdm09 e influenza A (H3N2) utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Type I/Flu.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de los diferentes virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Type I/Flu fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes virus, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

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

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Type I/Flu para el virus Influenza A(H1N1)pdm09 fue evaluada con las siguientes cepas: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus y A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

La reactividad de Vitassay qPCR Type I/Flu para el virus Influenza A(H3N2) fue evaluada con las siguientes cepas: A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Switzerland/9715293/2013(H3N2) virus y A/Thüringen/5/17(H3N2) virus obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Type I/Flu ha sido probado en los siguientes equipos:

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

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 equipos Applied Biosystems con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por los subtipos de virus de Influenza A(H1N1)pdm09 y H3N2. 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 humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes virus, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

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

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

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

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

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

Intended use

Vitassay qPCR Type I/Flu allows the detection and differentiation of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes by real-time RT-PCR in respiratory samples. The product is intended for use in the diagnosis of Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 subtypes infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Type I / Flu 4x8 -well strip, low profile	7041031
Vitassay qPCR Type I / Flu 4x8-well strip, high profile	7042031

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S031/ 7042S031	Type I/Flu strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C031	Type I/Flu Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x1 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, 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
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Influenza A and B viruses, belonging to the Orthomyxoviridae family, are the cause of most infections related to the lower respiratory tract. Individuals older than 65 years of age and those under that age with special clinical condition that predisposes them to suffer complicated flu are considered especially vulnerable. Influenza viruses are an important 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.

These viruses can be transmitted through direct contact with affected individuals, contaminated objects or through the inhalation of contaminated aerosols. After an incubation period of one to two days, the disease presents its acute phase. Although most patients have clinical symptoms of moderate severity and no significant complications, some develop very severe clinical symptoms, characterized mostly by pneumonia, exacerbations of chronic lung disease and may have a fatal outcome.

The diagnosis of influenza is based on cell culture, rapid antigen testing and, more recently, on Real Time PCR. This technique allows the detection of the two subtypes of influenza A (H1N1 and H3N2) in a more sensitive and specific way.

Principle of the test

Vitassay qPCR Type I/Flu test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *hemagglutinin* gene. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately 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 Type I/Flu test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the Influenza A (H1N1)pdm09 RNA target sequence is detected through the FAM channel, H3N2 RNA target in ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex II).

Precautions

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

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

For pre-treatment and RNA 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 Type I/Flu Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

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

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative 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 (*) through the FAM (Influenza A (H1N1)pdm09), ROX (H3N2) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

Analysis and interpretation of results

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

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Influenza A (H1N1)pdm09) and ROX (H3N2), which validates the reaction.

Negative control

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

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

The result interpretation is summarized in the following table:

(H1N1)pdm09	H3N2	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Influenza A(H1N1)pdm09 and H3N2 Positive
-	-	+	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 and H3N2 Negative
+	-	+/-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 Positive, H3N2 Negative
-	+	+/-	-	+	Influenza A (H1N1)pdm09 Negative, H3N2 Positive
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

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

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

Quality Control

An Internal Control (IC) is included in each reaction for confirming the appropriate performance of the molecular diagnostic technique. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 92 throat swabs from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Type I/Flu and CLART® PneumoVir DNA array (Genomica).

Influenza A(H1N1)pdm09 was detected in 55 samples by Vitassay qPCR Type I/Flu and in 60 samples by CLART® PneumoVir DNA array. For these discordant samples, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

Influenza A (H3N2) was detected in 29 samples by Vitassay qPCR Type I/Flu and in 30 samples by CLART® PneumoVir DNA array. For this discordant sample, the low amount of template RNA is below the detection limit of the method used.

In addition, Vitassay qPCR Type I/Flu was evaluated with the QCMD 2017 influenza Haemagglutinin typing EQA programme (INFHT17). This programme consisted of 8 positive or negative samples for the studied pathogen. Vitassay qPCR Type I/Flu detected correctly all samples.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Influenza A (H1N1) pdm09 and Influenza A (H3N2) viruses using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Type I/Flu.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Influenza A (H1N1)pdm09 and Influenza (H3N2) templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Type I/Flu was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

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

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Type I/Flu for Influenza A(H1N1)pdm09 was evaluated against the strains: A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus and A/Michigian/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR Type I/Flu for H3N2 was evaluated against the strains: A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus and A/Thüringen/5/17(H3N2) virus, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Type I / Flu has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)

- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)¹
- SmartCycler® (Cepheid)¹

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 Applied Biosystems with strips it is recommend to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Type I/Flu infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with throat 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. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different viruses, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

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

* See Attached III to configure exposure settings.

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

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	100
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	150
	HEX	3000
	ROX	2000
	Cy5	1500

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/. 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™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

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

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



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

www.vitassay.com