

SIMPLE/STICK Flu A+B

USO EXCLUSIVO PROFESIONAL

ESTAS INSTRUCCIONES DEBEN DE SER LEÍDAS CON ATENCIÓN ANTES DE PROCEDER A UTILIZAR EL TEST.

INTRODUCCIÓN

• Intención de uso

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección cualitativa simultánea, en bandas independientes, de antígenos de Influenza A e Influenza B en muestras respiratorias humanas (frotis nasofaríngeo y orofaríngeo, aspirados y lavados nasofaríngeos).

• Información general

El virus tiende a aparecer en los meses de invierno y concentra su mayor incidencia en unos 5 meses, desapareciendo por completo con la llegada de la primavera¹.

El test Flu A+B permite detectar en la misma muestra la nucleoproteína de los virus de Influenza A y B.

Esta prueba se usa exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Los resultados de esta prueba se usarán para apoyar los datos disponibles a partir de la evaluación clínica del paciente; el test no constituye en sí mismo un diagnóstico definitivo. En el caso de obtener un resultado negativo para un paciente que presenta la sintomatología típica de este tipo de infecciones, se recomienda confirmar el resultado por RT-PCR.

Es un test para uso por profesionales. No es un test de autodiagnóstico.

Población a la que está destinada la prueba

El test está dirigido a toda la población en general, pues cualquier individuo es susceptible de ser contagiado por este virus.

Incidencia en la población de la enfermedad o infección a la que responde la prueba

A nivel mundial, entre principios de noviembre de 2019 y finales de diciembre 2020, 614.907 muestras respiratorias recopiladas durante la vigilancia hospitalaria y ambulatoria fueron positivas en Influenza (el 19% de todas las muestras analizadas). De estas muestras positivas, el 63% fueron tipificadas como influenza A y 37% como influenza B.² La WHO estima que las epidemias anuales de gripe provocan aproximadamente entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves y entre 300.000 y 500.000 muertes.

• Características del virus y su infección

Los virus de influenza A se dividen en subtipos según dos proteínas de la superficie del virus: la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Actualmente, los subtipos de virus de

influenza A que circulan con mayor frecuencia entre las personas son: A (H1N1) y A (H3N2). En cambio, los virus de influenza B se clasifican en dos linajes: B/Yamagata y B/Victoria.

El virus de Influenza es un virus de ARN que presenta en su envoltura las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La proteína HA es responsable de la interacción con las células del huésped y, por lo tanto, de la entrada del virus, mientras que la proteína NA participa tanto en la replicación del virus como en su salida de la célula. Las proteínas virales HA y NA son las más variables antigénicamente, mientras que la nucleoproteína del virus, detectada por los anticuerpos empleados tanto para Influenza A como para Influenza B, se encuentra mucho más conservada.

Los síntomas asociados con la infección por el virus de la gripe varían desde una enfermedad respiratoria leve, limitada al tracto respiratorio superior y caracterizada por fiebre, dolor de garganta, secreción nasal, tos, dolor de cabeza, dolor muscular y fatiga, hasta una neumonía severa y en algunos casos letal debida al virus de Influenza en sí o a una infección bacteriana secundaria del tracto respiratorio inferior. La infección por el virus de Influenza también puede provocar, en algunos casos, una amplia gama de complicaciones no respiratorias que afectan el corazón, al sistema nervioso central y otros sistemas de órganos.³

FUNDAMENTO O PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TEST

El test Flu A+B es un test inmunocromatográfico que tiene una tira colocada en el interior de una carcasa. La tira emplea una combinación de:

a. Partículas de látex moradas conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test (posición C de la carcasa).

b. Partículas de látex azules conjugadas a un anticuerpo específico frente a la nucleoproteína del virus de la Influenza tipo B que coopera con otro anticuerpo específico para dicha proteína situado en la membrana, debajo de la banda de control (posición T2 de la carcasa).

c. Partículas de látex rojas conjugadas a un anticuerpo específico frente a la nucleoproteína del virus de la Influenza tipo A que coopera con otro anticuerpo específico para dicha proteína situado en la membrana, debajo de la banda que detecta Influenza tipo B (posición T1 de la carcasa).

En este test la muestra se trata, en primer lugar, con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción del virus Influenza. Tras la extracción, sólo se necesita añadir un volumen determinado del extracto a las tiras reactivas y esperar 15 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la tira, las partículas coloreadas migran. En el caso de una

muestra positiva, los anticuerpos presentes en las partículas reaccionarán con los antígenos del virus, formando un complejo partícula-antígeno que, a su vez, será retenido en la membrana por otros anticuerpos específicos para dicho antígeno

Dependiendo del tipo de virus contenido en la muestra, serán visibles diferentes líneas de color. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Fig.1).


Estas instrucciones de uso aplican a cualquier referencia comercial del producto: 9.080.XXX.YY.ZZZ.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

Formato Simple:

- 20 dispositivos de reacción.
- 1 vial con gotero que contiene el tampón de dilución de la muestra.
- Instrucciones de uso.

Según la referencia, el kit podrá incluir:

- 20 hisopos estériles
FLOQ Swabs Copan ref. 502CS01  0123
- 20 pipetas de plástico desechables.
- 20 microtubos de plástico de cierre de 1,5 mL graduados.
- Control positivo y correspondientes instrucciones de uso.
- Datamatrix

Formato Stick:

- 20 dispositivos de reacción.
- 1 vial que contiene el tampón de dilución de la muestra.
- 20 tubos de ensayo
- 3 soportes de tubo de ensayo
- Instrucciones de uso.

La información sobre la composición de los reactivos se indica en la ficha de seguridad del producto. Puede solicitar una copia de la misma a través de la dirección de correo electrónico msds@operon.es

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Cronometro

Según referencia, el kit podría no incluir:

- Micropipeta

- Microtubo de plástico

Existen controles a disposición del usuario para validar los resultados obtenidos, que se pueden también adquirir como una referencia comercial independiente.

EQUIPOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El test puede interpretarse visualmente o mediante el uso del lector de test de inmunocromatografía de OPERON.

Para este diagnóstico, se ha evidenciado una concordancia entre la interpretación visual y con el lector de tiras IC

OPERON de un 99%.

OPERON Lateral Flow Reader

 IUL, S.A.

Carrer de la Ciutat d'Asunción, 4
08030 Barcelona, ESPAÑA

PRECAUCIONES

Comprobar las precauciones que aplican de esta lista ejemplo:

1. Las muestras de los pacientes deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar guantes desechables y otros medios de protección eventualmente requeridos.

2. El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio como agente anti-microbiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.

3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.

4. Una vez finalizada la tarea, limpiar las superficies de trabajo con agua y jabón y terminar desinfectando con una solución adecuada. Por último, eliminar los guantes y lavar las manos con agua y jabón frotándolas bien.

5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.

6. En el caso de almacenar el test refrigerado, dejar que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomienda esperar de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.

7. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.

8. Las tiras inmunocromatográficas son de un sólo uso. Se utiliza una tira por cada muestra a analizar.

9. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.

10. En caso de rotura de la caja externa, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.

11. En caso de rotura o alteración del envasado primario desechar el test.

12. Sacar la tira o el dispositivo de la bolsa de aluminio cuando vaya a realizarse el ensayo, para evitar exponer el producto innecesariamente en exceso a factores ambientales que puedan perjudicarlo.

13. Es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída a la zona de adición de muestra señalada en la carcasa. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a la zona de reacción; si es superior, puede que la cromatografía no se desarrolle correctamente debido a que el volumen de muestra sobrepasa la capacidad de absorción de la tira.

14. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.

15. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.

16. Todas las muestras respiratorias deben mezclarse minuciosamente antes de realizar la prueba con el objeto de asegurar la toma de una muestra representativa.

17. Cuando se analicen muestras tipo lavado/aspirado, si después de homogeneizar la muestra quedaran zonas viscosas, evitar tomar la muestra de esa zona. Si la pipeta se obstruye, devuelva la muestra al recipiente y vuelva a tomar la muestra.

18. No emplear muestras de esputo o saliva ya que los resultados podrían no ser válidos.

19. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

20. Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

ALMACENAMIENTO

El producto Simple FluA+B se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre +2 y +30 °C.

Su fecha de caducidad de cada componente está impresa en los envoltorios de aluminio.

Se deben utilizar las tiras reactivas una vez atemperadas (si se almacenan refrigeradas) y abierto su envoltorio protector.

El producto mantiene la estabilidad reclamada una vez abierto.

MUESTRAS

▪ El test está diseñado para analizar muestras respiratorias humanas del tipo frotis nasofaríngeos y orofaríngeos, lavados y aspirados nasofaríngeos.

▪ Las muestras tienen que ser analizadas inmediatamente después de la toma, no se recomienda almacenarlas para su uso posterior. En el caso de muestras recogidas en un medio de transporte para virus, diferente al tampón de dilución de muestra del producto, se remite a las especificaciones de cada medio con respecto a la estabilidad de las muestras resuspendidas y condiciones de almacenamiento.

▪ Limitar los ciclos de congelación/descongelación de las muestras, ya que podrían afectar negativamente a los resultados.

▪ No centrifugar las muestras antes de su uso con el test Simple Flu A+B, ya que la eliminación de material celular podría afectar negativamente a la sensibilidad de la prueba.

▪ Se ha demostrado que las muestras de lavados y aspirados nasofaríngeos son más efectivas para la detección de los virus que las muestras de hisopos nasofaríngeos/orofaríngeos.⁴

▪ Las muestras tipo lavado/aspirado nasofaríngeo se deben

homogeneizar muy bien antes de tomar la alícuota a analizar. En el caso de los hisopos secos, resuspenderlos bien en el tampón de dilución como se indica más adelante.

▪ Se han evaluado varios tipos de hisopos para la toma de muestra. Si la muestra es orofaríngeo, se recomienda utilizar el hisopo orofaríngeo Flocked Swab de Copan Flock Technologies incluido en el kit. En el caso de muestras nasofaríngeas, se recomienda utilizar los hisopos nasales/nasofaríngeos de la marca Goodwood (ref. GW-1237NP) o el hisopo FLOQSwabs de Copan Flock Technologies (ref. 503CS01).

▪ Se han analizado muestras en diferentes medios de transporte. El test es compatible, al menos, con los siguientes: solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio de transporte para virus de marca Vircell y CPM Científica.

En el caso de utilizar medios de transporte diferentes al tampón de dilución del producto, es posible que las prestaciones del test varíen en función del tipo y volumen empleado.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS y PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST

Nota General: a lo largo del desarrollo del test, deben usarse guantes desechables debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

En el caso de los lavados y aspirados nasofaríngeos, es muy importante homogeneizar bien las muestras antes de tomar la alícuota a analizar (se puede emplear un vórtex o, en su defecto, agitación manual enérgica).

En el caso de frotis orofaríngeos/nasofaríngeos, mezcle bien para asegurar la extracción de la muestra del hisopo (si lo contiene) y garantizar la homogeneidad de la alícuota a analizar.

No centrifugar las muestras en ningún caso, pues la eliminación de material celular podría afectar negativamente a la sensibilidad de la prueba.

Si las muestras se han almacenado en frío o congeladas, dejar que alcancen la temperatura ambiente antes de proceder con su análisis.

EL PROCEDIMIENTO A SEGUIR DEPENDERÁ DEL TIPO DE MUESTRA A UTILIZAR Y DEL FORMATO DEL TEST (Simple o Stick).

▪ **Procedimiento para uso del test con muestras de frotis orofaríngeo/nasofaríngeo recién tomadas y sin medio de transporte.**

TEST FORMATO SIMPLE

1. Dispensar el tampón de dilución de la muestra en el microtubo de plástico suministrado con el kit hasta la tercera marca desde la parte inferior del tubo

(comprendida entre las marcas de 0,5 mL y 1,0 mL), correspondiente a 0,75 mL.

En el caso de utilizar una referencia comercial que no incluya este accesorio, dispensar 0,75 mL con micropipeta (no incluida en el kit) en un microtubo de plástico de 1,5 mL.

2. Si la muestra es orofaríngea, proceder a la toma de muestra utilizando el hisopo incluido en el kit. En el caso de muestras nasofaríngeas, se recomienda utilizar los hisopos indicados en el apartado "MUESTRAS" o unos de características similares si estos no estuvieran disponibles.

3. Introducir el hisopo impregnado con la muestra en el microtubo con el tampón de dilución.

4. Rotar vigorosamente el hisopo en el tampón durante 30 segundos para lograr una buena extracción de la muestra.

5. Sacar el hisopo presionándolo contra las paredes del microtubo para lograr que se desprenda la mayor cantidad de muestra posible.

6. Desechar el hisopo.

7. Sacar el dispositivo de reacción de su envoltorio y colocarlo en una superficie plana.

8. Con la pipeta de plástico suministrada con el kit, añadir 7 gotas de la muestra extraída en la zona de adición de la muestra de la tira (ventana rectangular señalada con una flecha). La adición debe realizarse lentamente, gota a gota, para asegurar la correcta absorción de la muestra.

En el caso de utilizar una referencia comercial que no incluya este accesorio, añadir 0,14 mL al test con micropipeta (no incluida en el kit). Igualmente será necesario añadir la muestra gota a gota para asegurar la correcta absorción de la muestra.

9. Esperar 15 minutos, leer e interpretar el resultado.

▪ Procedimiento para uso del test con muestras de:

→ frotis orofaríngeo/nasofaríngeo en medio de transporte para virus

→ lavados y aspirados nasofaríngeos.

TEST FORMATO SIMPLE

1. Dispensar 150 μ L de tampón de dilución de la muestra en un microtubo.

2. Añadir 150 μ L de muestra y mezclar suavemente mediante pipeteo, procurando no generar espuma (evitar vórtex).

3. Sacar el dispositivo de reacción de su envoltorio y colocarlo en una superficie plana.

4. Añadir 140 μ L de la mezcla (muestra+tampón de dilución) en la zona de adición de la muestra de la tira (ventana rectangular señalada con una flecha). La adición debe realizarse lentamente, gota a gota, para asegurar la correcta absorción de la muestra.

5. Esperar 15 minutos, leer e interpretar el resultado.

TEST FORMATO STICK

1. Dispensar 150 μ L de tampón de dilución de la muestra en un tubo de ensayo.

2. Añadir 150 μ L de muestra y mezclar suavemente

mediante pipeteo, procurando no generar espuma (evitar vórtex).

3. Sacar el dispositivo de reacción de su envoltorio y colocarlo en vertical el tubo de ensayo.

Esperar 15 minutos, leer e interpretar el resultado.

LECTURA DE RESULTADOS

Las tiras que se muestran en la Fig. 1 son un ejemplo de los distintos resultados que se pueden obtener con el test Flu A+B.

En la tira reactiva pueden aparecer diferentes bandas coloreadas que estarán delimitadas por unas líneas horizontales negras impresas en un lado de la carcasa:

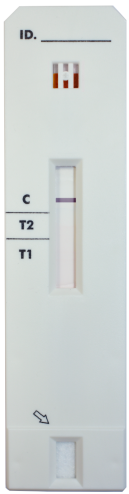
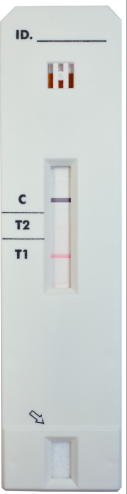
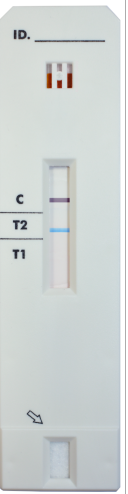


a. Banda morada: constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía ha transcurrido con normalidad.

b. Banda azul: indica la presencia del virus Influenza tipo B en la muestra.

c. Banda roja: indica la presencia del virus Influenza tipo A en la muestra.

La banda morada de control debe aparecer siempre.

La Figura 1 muestra ejemplos de posibles resultados.

Tira 1	Tira 2	Tira 3	Tira 4	Tira 5
				
Flu B - Flu A -	Flu B - Flu A +	Flu B + Flu A -	Flu B + Flu A +	Test inválido
Fig. 1: Modelos de posibles resultados. La lectura se indica debajo de las tiras.				

▪ Tira 1: resultado NEGATIVO

Sólo aparece una línea transversal **MORADA** alineada con la letra "C" marcada en la carcasa. Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.

▪ Tiras 2-4: resultados POSITIVOS

▪ Tira 2: Influenza A Positivo + Influenza B Negativo

Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la letra "C" y una línea **ROJA** alineada con la letra "T1".

▪ Tira 3: Influenza A Negativo + Influenza B Positivo

Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la

letra "C" y una línea AZUL alineada con la letra "T2".

■ **Tira 4: Influenza A Positivo + Influenza B Positivo**

Aparece una línea MORADA (control) alineada con la letra "C", una línea ROJA alineada con la letra "T1" y una línea AZUL alineada con la letra "T2".

■ **Tira 5: resultado INVÁLIDO**

No aparecen las bandas de control o el color morado de las bandas de control aparece claramente alterado. Esto indica un funcionamiento anómalo del test. Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con un nuevo dispositivo de reacción, siguiendo estrictamente las instrucciones de uso descritas en este manual.

Toda línea que aparezca pasados los 15 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: el diagnóstico final y definitivo lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta el virus respiratorio Influenza en una muestra, pero no constituye un argumento definitivo para afirmar que la persona padece de una infección por dichos virus.

El test puede interpretarse visualmente o mediante el uso del lector de test de inmunocromatografía de OPERON. La guía rápida para la interpretación del test con dicho lector se encuentra disponible en la siguiente dirección web: <https://operon.es/es/operon-lateral-flow-reader/>
Importante: antes de introducir el test en el lector revisar que no hay partículas de polvo, fibras etc. en la ventana de resultados puesto que pueden interferir con la lectura.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea (color) el test es inválido, ya sea porque se realizó incorrectamente o porque los reactivos se han deteriorado. En este caso, repetir el análisis ciñéndose estrictamente al protocolo de trabajo detallado en estas hojas de instrucciones.

ADVERTENCIA: Se recomienda la inclusión de nuestros controles de resultado conocido para asegurar que los datos obtenidos son correctos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test Flu A+B sirve para la identificación (diferencial) de Influenza A y B detectando su presencia en muestras respiratorias humanas de tipo frotis nasofaríngeo/orofaríngeo y lavados/aspirados nasofaríngeos siempre y cuando la carga viral sea igual o superior al límite de detección del ensayo.
2. Este test es cualitativo, no cuantitativo, aunque la intensidad de las bandas positivas está relacionada con la cantidad de analito detectable en la muestra.
3. Se han evaluado un alto número de muestras respiratorias para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas de referencia (como RT-PCR Real Time) fue buena. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras respiratorias.
4. Es importante controlar el tiempo de reacción. Si el

tiempo de reacción es menor al indicado, las muestras que tienen una cantidad de analito superior al límite de sensibilidad podrán observarse claramente pero las que están en el límite no aparecerán. Si el tiempo de reacción es mayor al indicado, la sensibilidad del test podría verse alterada y dar lugar a interpretaciones erróneas.

5. Los resultados del test deben ser interpretados junto con la información disponible de los estudios epidemiológicos, valoración clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

6. Es muy importante añadir la cantidad adecuada de muestra a la tira reactiva (7 gotas con la pipeta de plástico suministrada en el kit ó 140 µL) pues con un volumen inferior podrían aparecer resultados falsos negativos, mientras que un volumen mayor podría impedir el correcto desarrollo de la cromatografía.

7. La recogida, transporte y/o manipulación inadecuados de la muestra pueden afectar a los resultados.

8. En el caso de muestras con una carga viral de Influenza B muy alta, además de una línea azul muy intensa en correspondencia de Flu B, podría aparecer una señal inespecífica más tenue y de color azul en correspondencia de la línea de Flu A. Esto no significa que haya infección por el virus de Influenza A.

9. Los anticuerpos presentes en el test pueden no detectar todas las variantes antigénicas del Influenza así como nuevas cepas que puedan aparecer con el tiempo. Se detalla en el apartado de Sensibilidad Analítica las cepas analizadas con el test Flu A+B.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

■ Tipo A

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo A (H1N1), cepa A/New Caledonia/20/99 IVR116 inactivada químicamente: 8 ng/mL.

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo A (H1N1), cepa A/New Caledonia/20/99 inactivada por calor: 19,5 TCID₅₀/mL.

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo A (H1N1), cepa A/Wisconsin/67/2005 (virus viable): 3,6 x 10⁵ CEID₅₀/mL.

■ Tipo B

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo B, linaje Yamagata, cepa B/Florida/07/04 inactivada químicamente: 16 ng/mL.

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo B, linaje Yamagata, cepa B/Florida/07/04 inactivada por calor: 2,5 x 10³ TCID₅₀/mL.

- Sensibilidad analítica con Influenza tipo B, linaje Yamagata, cepa B/Florida/07/04 (virus viable): 3,6 x 10⁵ CEID₅₀/mL.

En el caso de la tira Influenza, se ha analizado la sensibilidad analítica con otras variantes del virus (A y B):

Cepa	Subtipo/linaje	Sensibilidad analítica
A/New Caledonia/20/99	H1N1	8 ng/mL
A/Solomon Island/03/06	H1N1	31 ng/mL
A/Beijing/262/95	H1N1	31 ng/mL
A/Taiwan/1/86	H1N1	16 ng/mL
A/Brisbane/10/07	H3N2	8 ng/mL
A/Kiev/301/94	H3N2	16 ng/mL
A/Panamá/2007/99	H3N2	16 ng/mL
A/Shangdong/9/93	H3N2	16 ng/mL
A/Wisconsin/67/05	H3N2	31 ng/mL
A/Florida/04/06	Yamagata	8 ng/mL
B/Hong Kong/5/72	Victoria	31 ng/mL
B/Tokio/53/99	Victoria	16 ng/mL
B/Victoria/504/00	Victoria	31 ng/mL

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la detección de Influenza A y B detectan específicamente un epítipo altamente conservado de la nucleoproteína de cada uno de los virus.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

El test Flu A+B se evaluó analizando diferentes especímenes de muestras respiratorias retrospectivas.

Las técnicas de referencia fueron las siguientes:

- RT-PCR CLART® PneumoVir 2(Genómica).
- PCR Cobas Liat Influenza A/B (Roche).
- Aries® Real Time PCR Flu A/B&RSV (Luminex).
- Real SARS-CoV-2/Flu/RSV (Operon).

Los resultados obtenidos se indican a continuación divididos según analito, espécimen y técnica de referencia. Se han analizado para Influenza A 190 muestras respiratorias de las cuales 77 diagnosticadas como positivas. Para Influenza B se han analizado 145 muestras, de las cuales 14 diagnosticadas como positivas.

Muestras de frotis orofaríngeo en medio de transporte para virus caracterizadas por RT-PCR CLART® PneumoVir 2 (Genómica)

Se analizaron 36 muestras negativas para Influenza A/B, 34 positivas de Influenza A y 4 positivas de Influenza B.

Influenza A	RT-PCR CLART® PneumoVir 2

		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo	20	0
	Negativo	14	36
Concordancia Sensibilidad = 58,8% Concordancia Especificidad ≥ 99,9% VPP: 100 % VPN: 72,0%			

Influenza B		RT-PCR CLART® PneumoVir 2	
		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo	2	0
	Negativo	2	36
Concordancia Sensibilidad = 50,0% Concordancia Especificidad ≥ 99,9% VPP: 100% VPN: 94,7%			

Muestras de frotis orofaríngeo en medio de transporte para virus caracterizadas por RT-PCR Real Time Cobas Liat Influenza A/B (Roche)

Se analizaron 26 muestras negativas para Influenza A/B y 22 positivas de Influenza A.

Influenza A		RT-PCR Cobas Liat Influenza A/B	
		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo	14	1
	Negativo	8	25
Concordancia Sensibilidad = 63,6% Concordancia Especificidad = 96,1% VPP: 93,6% VPN: 75,8 %			

Influenza B		RT-PCR Cobas Liat Influenza A/B	
		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo		0
	Negativo		48
Concordancia Especificidad ≥ 99,9%			

Muestras de frotis orofaríngeo caracterizadas por Real SARS-CoV-2/Flu/RSV (Operon)

Se analizaron 47 muestras negativas para Influenza A/B.

Influenza A		RT-PCR	
		Positivo	Negativo
Test RSV-Flu A+B	Positivo		1
	Negativo		46
Concordancia Especificidad = 97,9% VPP: N/A VPN: 100%			

Influenza B		RT-PCR	
		Positivo	Negativo
Test RSV-Flu A+B	Positivo		0
	Negativo		47
Concordancia Especificidad $\geq 99,9\%$ VPP: N/A VPN: 100%			

Muestras de aspirados nasofaríngeos caracterizadas por Luminex Aries® Real Time PCR Flu A/B&RSV

Influenza A: fueron analizadas un total de 73 muestras, de las cuales 21 fueron caracterizadas como positivas.

Influenza B: fueron analizadas un total de 71 muestras, de las cuales 10 fueron caracterizadas como positivas.

Influenza A		RT-PCR	
		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo	18	1
	Negativo	3	51
Concordancia Sensibilidad = 85,7% Concordancia Especificidad = 98,1% VPP: 94,7% VPN: 94,4%			

Influenza B		RT-PCR	
		Positivo	Negativo
Test Flu A+B	Positivo	9	0
	Negativo	1	61
Concordancia Sensibilidad = 90,0% Concordancia Especificidad $\geq 99,9\%$ VPP: 100% VPN: 98,4%			

REPETIBILIDAD

Se analizaron cinco réplicas de diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de estándares internos caracterizados (curva de sensibilidad), así como de muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada analito detectado por el test, se midieron el mismo día por la misma persona. Se obtuvo una alta repetitividad con diferencias entre las réplicas del estándar para cada analito iguales o inferiores a una dilución $\frac{1}{2}$ y los mismos resultados con las muestras reales.

REPRODUCIBILIDAD

• PRECISIÓN INTER-DÍA

Con un mismo lote del test Simple Flu A+B y a lo largo de cinco días consecutivos se midieron, por duplicado, una curva de sensibilidad y un grupo de muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada uno de los analitos detectados con el test. Se obtuvieron diferencias de sensibilidad iguales o inferiores a una dilución $\frac{1}{2}$ y los mismos resultados con las muestras reales.

• PRECISION INTER-OPERADOR

Tres personas midieron por triplicado una curva de sensibilidad y un grupo de muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada uno de los analitos detectados con el test. Se obtuvieron diferencias de sensibilidad iguales o inferiores a una dilución $\frac{1}{2}$ y los mismos resultados con las muestras reales.

• PRECISION INTER-LOTE

Con tres lotes distintos del test se evaluaron, en paralelo y por duplicado, una curva de sensibilidad y un grupo de muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada uno de los analitos detectados con el test. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Se obtuvieron diferencias de sensibilidad iguales o inferiores a una dilución $\frac{1}{2}$ y los mismos resultados con las muestras reales.

EFFECTO HOOK O PROZONA

Se ha comprobado que el test Flu A+B:

1. No presenta efecto Hook hasta una carga viral infecciosa de $3,2 \times 10^5$ TCID₅₀/mL del virus Influenza A/Virginia/ATCC1/2009 (Ref. VR-1736 de ATCC)
2. No presenta efecto Hook en Influenza B hasta la concentración de $2,2 \times 10^7$ CEID₅₀/mL del virus e Influenza B/Florida/04/06 (ref. VR-1804 de ATCC).

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto sobre los resultados del test cuando fueron añadidas a las concentraciones indicadas:

Principio activo	Concentración
Sangre	0,5 %
Mucina	0,5 mg/mL
Benzocaina	1 mg/mL
Acido hialuronico y alantoína	1 % v/v
Fenilefrina	15 % v/v
Oximetazolina	15 % v/v
Momentasona	0,01 mg/mL
Propionato de fluticasona	2,5 % v/v
Alcohol 2,4-diclorobencílico y amilmetacresol	5% p/v (50 mg/mL)
Cromoglicato sodico	15 % v/v
Oseltamivir	5 mg/mL
Mupirocina	10 µg/mL
Tobramicina	4 µg/mL
Amoxicilina	1 mg/mL
Biotina	1 µg/mL
Alkalol	1:10
Compuestos fenolicos	5 % v/v

Ibuprofeno	2,2 mg/mL
Paracetamol	1 mg/mL
Zanamivir	5 mg/mL
Ribavirin	1 mg/mL
Ac acetilsalicílico	0,3 mg/mL
Budesonida	1 % v/v

REACTIVIDAD CRUZADA

Se ha demostrado ausencia de reacción entrecruzada con los siguientes microorganismos:

Microorganismo	Concentración analizada
Bordetella Pertussis	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Haemophilus influenzae	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Legionella pneumophila	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Mycobacterium tuberculosis inactivado	Dilución 1:10 (0.27 g/mL)
Streptococcus pneumoniae	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Streptococcus salivarius	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Streptococcus pyogenes	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Staphylococcus aureus	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Staphylococcus epidermis	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Candida albicans	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Pseudomonas aeruginosa	1 x 10 ⁶ CFU/mL
Chlamydia pneumoniae	7,5 x 10 ⁶ IFU/mL
Mycoplasma pneumoniae	1,43 x 10 ⁶ CFU/mL
Lavado nasal	N/A
Coronavirus 229E inactivado	0,94 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Coronavirus OC43 inactivado	5 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Coronavirus OC43 viable	0,89 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Coronavirus NL63 inactivado	1,7 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
MERS inactivado	1,7 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Adenovirus 7A inactivado	1,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Metapneumovirus TN/91-316	2,8 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 1 HPIV1/FRA/27344044/2007	0,89 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 2 (Greer)	0,89 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 3 (NIH 47885)	1,6 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 4B (19503)	5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Rhinovirus 48 (1505)	5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Enterovirus D 68 (USA/2018-23089)	2,8 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
SARS-CoV-2 inactivado	6,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
RSV B1	8,9 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL



SIMPLE/STICK Flu A+B

FOR PROFESSIONAL USE ONLY

PLEASE READ THESE INSTRUCTIONS CAREFULLY BEFORE USING THE TEST.

INTRODUCTION

• Intended use

A one-step immunochromatographic test to simultaneously qualitatively detect Influenza A, and Influenza B antigens in human respiratory samples (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs, nasopharyngeal washes and aspirates) on separate strips.

• General information

Influenza virus tends to appear during the winter months, with incidence highest for around a 5 month period, before it completely disappears when spring arrives¹.

The Flu A+B test can detect Influenza A and B virus nucleoproteins in the same sample.

This product is exclusively for *in vitro* diagnostic use.

The results of this test are intended to support data derived from a clinical evaluation of the patient; the test does not constitute a definitive diagnosis in itself. In the event of obtaining a negative result for a patient presenting the typical symptomatology from these types of infections, confirming the result using RT-PCR is recommended.

This is a test for professional use. This is not a self-diagnostic test.

Intended test population

The test is intended for use on the general public, as any individual is susceptible to becoming infected with the virus.

Disease or infection incidence among the target population for this product

Worldwide, from the start of November 2019 to the end of December 2020, 614,907 respiratory samples collected during hospital and outpatient surveillance were positive for Influenza (19% of all analysed samples). Of these positive samples, 63% and 37% were typed as influenza A and influenza B respectively.² The WHO estimates that annual flu epidemics cause approximately 3 to 5 million cases of serious disease, and 300,000 to 500,000 deaths.

• Characteristics of the virus and its infection

Influenza A viruses are divided into subtypes based on two proteins on the virus' surface: hemagglutinin (H) and neuraminidase (N). The influenza A virus subtypes

currently circulating more commonly among people are: A (H1N1) and A (H3N2). Influenza B viruses, on the other hand, are classified into two lineages: B/Yamagata and B/Victoria.

The Influenza virus is an RNA virus that presents the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins in its envelope. The HA protein is responsible for the interaction with host cells, and therefore, the virus' entry, while the NA protein participates in both virus replication and its exit from the cell. The HA and NA viral proteins show most variation in terms of antigens, while the virus' nucleoprotein, detected by the antibodies used for both Influenza A and Influenza B, is much more conserved.

Symptoms associated with flu virus infection vary from a mild respiratory disease, limited to the upper respiratory tract - characterised by fever, throat pain, nasal secretion, cough, headache, muscle pain and fatigue - to severe pneumonia, which in some cases can prove fatal due to the Influenza virus itself or a secondary bacterial infection in the lower respiratory tract. In some cases, infection by Influenza virus can also cause a wide range of non-respiratory complications that affect the heart, central nervous system, and other organ systems.³

THE BASIS OR BASIC PRINCIPLES OF THE TEST

The Flu A+B test is an immunochromatographic test with one strip inside a housing. The strip uses a combination of:

a. Purple latex particles conjugated to an antigen recognised by a specific antibody for said antigen bound to the membrane, comprising the so-called test control line (position C on the housing).

b. Blue latex particles conjugated to a specific antibody against the Influenza type B virus nucleoprotein that cooperates with another specific antibody for said protein located on the membrane, below the control line (position T2 on the housing).

c. Red latex particles conjugated to a specific antibody against the Influenza type A virus nucleoprotein that cooperates with another specific antibody for said protein located on the membrane, below the line that detects Influenza type B (position T1 on the housing).

This test first involves treating the sample with the sample dilution buffer to extract the Influenza virus (included in this kit). After extraction, only a certain volume of the extract needs to be added to the reactive strips, before waiting for 15 minutes.

When the extracted sample flows across the strip, the coloured particles migrate. In the event of a positive sample, the antibodies present in the particles will react with the virus antigens, forming a particle-antigen complex, which will also be retained on the membrane by other specific antibodies for that antigen

Different coloured lines will appear depending on the virus content in the sample. These lines are used to interpret the result after 15 minutes of incubation at room temperature (see Fig. 1).


These instructions for use apply for all commercial product references: 9.080.XXX.YY.ZZZ.

MATERIAL INCLUDED IN THE KIT

Simple Format

- 20 reaction devices.
- 1 vial with a dropper containing the sample dilution buffer.
- Instructions for use.

Depending on the reference, the kit could include also:

- 20 sterile swabs
FLOQ Swabs Copan ref. 502CS01  0123
- 20 disposable plastic pipettes.
- 20 x 1.5 mL graduated plastic microtubes with a lid.
- 1 vial with a dropper containing the sample dilution buffer.
- Positive control and corresponding instructions for use.
- Datamatrix

Stick Format

- 20 reaction devices.
- 1 vial containing the sample dilution buffer.
- 20 test tubes.
- 3 stands for test tubes.
- Instructions for use.

The product's safety sheet contains information about the composition of the reagents. An electronic copy of the sheet can be requested via email to msds@operon.es

MATERIAL NOT INCLUDED IN THE KIT

- Chronometer

Depending on the reference the kit could not include:

- Micropipette
- Plastic microtube.

Controls are available for the user to validate the results, which can also be obtained as an independent commercial reference.

EQUIPMENT FOR INTERPRETING THE RESULTS

The test can be interpreted visually or using OPERON's immunochromatographic test reader.

For this diagnosis, there is evidence of a 99% agreement between visual interpretation and the OPERON IC strip reader.

OPERON Lateral Flow Reader

 IUL, S.A.

Carrer de la Ciutat d'Asunción, 4
08030 Barcelona, SPAIN

PRECAUTIONS

Check all the applicable precautions from this list example:

1. Patient samples must be handled with care as they may contain infectious agents. Disposable gloves and other protective measures that may eventually be required must be used throughout the process.
2. The sample dilution buffer contains sodium azide as an anti-microbial agent. Avoid direct contact with skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. Do not use the buffer if there are any signs of contamination or precipitation.
3. Do not store or prepare food, eat, drink, or smoke in the area where the reagents and samples are handled.
4. On completing the task, clean all work surfaces with soap and water and disinfect them with a suitable solution. Lastly, dispose of the protective gloves correctly and wash your hands with soap and water, rubbing them well.
5. Do not swap the components of kits with different batch numbers.
6. If the test is stored refrigerated, allow all the kit's components and the samples to reach room temperature, as cold reagents and/or samples can reduce the test's functionality. Waiting for 20 to 30 minutes to reach room temperature is recommended.
7. Only use the reagents *in vitro*.
8. The immunochromatographic strips are single use. A strip is used per sample to be evaluated.
9. Do not use any of the kit's components after the use-by-dates.
10. If the outer box is damaged, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
11. Throw the test away if the primary packaging is either broken or impaired.
12. Remove the strip or device from the aluminium bag when the test is going to be performed to avoid unnecessary excessive exposure of the product to any potentially damaging environmental factors.
13. Adding the correct extracted sample volume to sample addition zone indicated on the housing is very important. If lower than indicated, the chromatography may not process correctly because insufficient sample reaches the reaction zone. If higher than indicated, the chromatography may not process correctly due to the sample volume surpassing the strip's absorption capacity.
14. Please dispose of the used product in accordance with current legislation.
15. Do not use the test if there are any coloured lines in the results zone prior to use.
16. Mix all respiratory samples thoroughly before performing the test in order to ensure a representative sample is used.
17. When wash/aspirate type samples are analysed, avoid sampling from this zone if the sample still has viscous zones after mixing. If the pipette blocks, return the sample to the container and sample it again.
18. Do not use sputum or saliva samples as invalid results may be obtained.

19. Do not discard the kit's outer box until all the content has been used. The box contains essential information about the product's CE marking and the batch number.

20. Any serious incident involving the product must be reported to the manufacturer and the relevant authority in the member state where the user and/or patient are located.

STORAGE

The Simple FluA+B product can be stored at any temperature from +2 to +30 °C.

The use-by date of each component is printed on the aluminium wrappers.

The reactive strips must be used once at room temperature (if stored refrigerated) after the protective packaging has been opened.

The product maintains the claimed stability once open.

SAMPLES

- The test is designed to analyse human respiratory samples from nasopharyngeal and oropharyngeal swabs, nasopharyngeal washes and aspirates.
- Samples resuspended in the product's sample dilution buffer must be analysed immediately after collection, it is not recommended to store them for later use. For samples collected in a viral transport medium different to the product's sample dilution buffer, please see the specifications for each medium when it comes to the stability of resuspended samples and storage conditions.
- Limit sample freezing/thawing cycles, given they could negatively affect the results.
- Do not centrifuge the samples prior to their use with the Simple Flu A+B test, given that the elimination of cell material could negatively affect the test's sensitivity.
- There is evidence that the nasopharyngeal washes and aspirates are more effective for detecting viruses than nasopharyngeal/oropharyngeal swab samples.⁴
- Nasopharyngeal wash/aspirate type samples must be mixed very well prior to taking the aliquot for analysis. If using dry swabs, ensure that they resuspend correctly in the dilution buffer, as indicated later.
- Several swab types have been evaluated for sample collection. If it is a oropharyngeal sample, the use of oropharyngeal Flocked Swab from Copan Flock Technologies included in the kit is recommended. For nasopharyngeal samples, the use of Goodwood nasal/nasopharyngeal swabs (ref. GW-1237NP) or Copan Flock Technologies FLOQSwabs (ref. 503CS01) is recommended.
- Samples have been analysed in different transport mediums. The test is compatible with at least the following: phosphate-buffered saline (PBS), viral transport medium from Vircell and CPM Scientifica. If using different transport mediums to the product's dilution buffer, the test's characteristics may vary depending on the type and volume used.

PREPARING SAMPLES AND THE TEST PROCEDURE

General note: disposable gloves must be used throughout the test due to the handling of infectious samples. On completion, follow the hygiene procedures in point 4 of the "Precautions" section.

It is very important to mix nasopharyngeal washes and aspirate samples well before taking the aliquot for analysis (a vortex mixer can be used, or failing that, stir vigorously by hand).

Mix oropharyngeal/nasopharyngeal swabs well to ensure swab sample extraction (if present) and to ensure the aliquot for analysis is mixed.

Do not centrifuge under any circumstances, as eliminating cell material could adversely affect the test's sensitivity.

Allow any refrigerated or frozen samples to reach room temperature before analysing them.

THE PROCEDURE WILL VARY DEPENDING ON BOTH THE SPECIMEN TO BE ANALYSED AND THE FORMAT OF THE TEST (Simple or Stick).

▪ **Procedure for freshly collected oropharyngeal/nasopharyngeal swabs without a transport medium.**

SIMPLE FORMAT

1. Dispense the sample dilution buffer into the plastic microtube supplied with the kit up to the third mark from the bottom of the tube (between the 0.5 mL and 1.0 mL marks), corresponding to 0.75 mL.

In the case of using a commercial reference that does not include this accessory, dispense 0.75 mL with a micropipette (not included in the kit) in a 1.5 mL plastic microtube.

2. If it is a oropharyngeal sample, collect the sample using the swabs included in the kit. For nasopharyngeal samples, using swabs reported in "SAMPLE" section is recommended or swabs with similar characteristics, should none of these be available.

3. Introduce the swab soaked in sample into the microtube containing the dilution buffer.

4. Vigorously twist the swab in the buffer for 30 seconds to extract the sample correctly.

5. Remove the swab, pressing it against the microtube walls to ensure as much sample as possible is released.

6. Dispose of the swab.

7. Remove the reaction device from its packaging and place it on a flat surface.

8. Add **7 drops** of the extracted sample to the sample addition zone of the strip (rectangular window indicated with an arrow) using the plastic pipette supplied with the kit. Add slowly drop by drop to ensure the sample absorbs correctly.

In the case of using a commercial reference that does not include this accessory, add 0.14 mL to the test with a micropipette (not included in the kit). Pay attention in adding slowly drop by drop to ensure the sample absorbs correctly.

9. Wait **15 minutes**, then read and interpret the result.

▪ Procedure for:

→ **oropharyngeal/nasopharyngeal swab samples in viral transport medium**

→ **nasopharyngeal washes and aspirates.**

SIMPLE FORMAT

1. Dispense 150 μL of sample dilution buffer into a microtube.

2. Add 150 μL of sample using a pipette and gently mix, ensuring to avoid any foam being generated (avoid using a vortex mixer).

3. Remove the reaction device from its packaging and place it on a flat surface.

4. Add 140 μL of the mix (sample+dilution buffer) to the sample addition zone of the strip (rectangular window indicated with an arrow). Add slowly, drop by drop, to ensure the sample absorbs correctly.

5. Wait **15 minutes**, then read and interpret the result.

STICK FORMAT

1. Dispense 150 μL of sample dilution buffer into a test tube.

2. Add 150 μL of sample using a pipette and gently mix, ensuring to avoid any foam being generated (avoid using a vortex mixer).

3. Remove the reaction device from its packaging and place it inside the test tube in a vertical position.

4. Wait **15 minutes**, then read and interpret the result.

READING THE RESULTS

The strips shown in Fig. 1 are an example of the different results that can be obtained with the Flu A+B test.

Different coloured lines can appear on each reagent strip, bordered by black horizontal lines printed on one side of the housing:

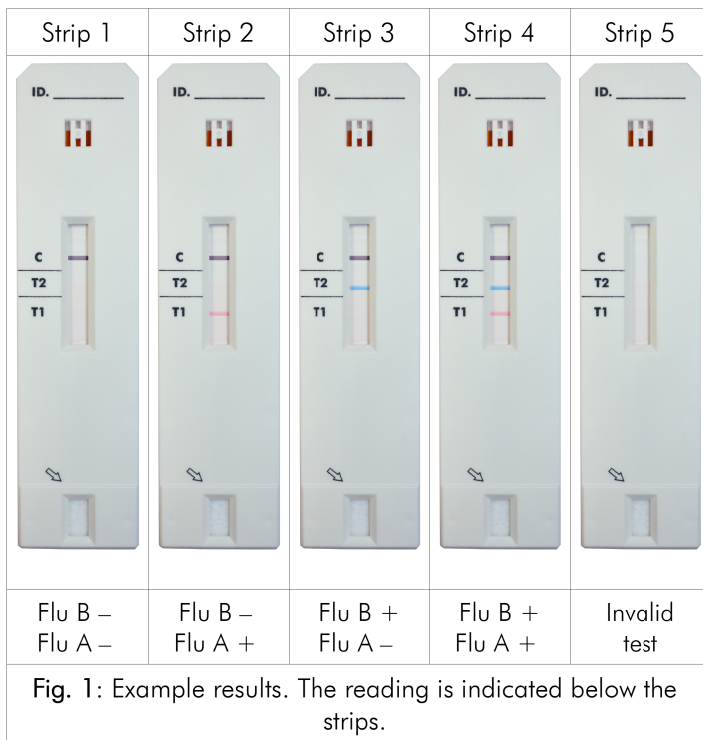
a. Purple line: this is the control line, which should always appear, as it indicates that the chromatography worked correctly.

b. Blue line: this indicates that the sample contains influenza type B virus.

c. Red line: this indicates that the sample contains influenza type A virus.

The purple control line must always appear.

Figure 1 shows examples of possible results.



Strip 1: **NEGATIVE** result

Only a **PURPLE** horizontal line appears on both strips aligned with the letter “C” on the housing. This is the control line, which should always appear, as it indicates that the chromatography worked correctly.

Strips 2-4: **POSITIVE** results

Strip 2: Influenza A Positive + Influenza B Negative

A **PURPLE** control line appears, aligned with the letter “C” and a **RED** line appears aligned with the letter “T1”.

Strip 3: Influenza A Negative + Influenza B Positive

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter “C” and a **BLUE** line appears aligned with the letter “T2”.

Strip 4: Influenza A Positive + Influenza B Positive

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter “C”, a **RED** line appears aligned with the letter “T1” and a **BLUE** line appears aligned with the letter “T2”.

Strip 5: **INVALID** results

The control lines do not appear or the purple colour of the control lines is clearly altered. This is an indication that the test has not worked correctly. In the event of an invalid result, repeating the test using a new reaction device is recommended, strictly adhering to the instructions for use described in this manual.

Any line that appears after 15 minutes of reaction time will have no diagnostic value.

NOTE: a doctor is responsible for the final and definitive diagnosis. This test only detects respiratory influenza viruses in a sample, it cannot be used to definitively conclude that the person is infected with those viruses.

The test can be interpreted visually or using OPERON’s immunochromatographic test reader. The quick guide for interpreting the test using that reader is available from the following website address: <https://operon.es/operon-lateral-flow-reader/>

Please note: check that no dust particles, fibres, etc. are present in the results window prior to introducing the test into the reader, as they can interfere with the reading.

QUALITY CONTROL

The test is invalid should no (coloured) lines appear, either because it was performed incorrectly or because the reagents have deteriorated. In this case, repeat the analysis, strictly following the operating protocol detailed in these instructions for use.

WARNING: Including our controls with a known result is recommended to ensure that correct data is obtained.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The Flu A+B test can (separately) identify Influenza A and B, detecting their presence in human respiratory samples such as nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and nasopharyngeal wash/aspirates, as long as the viral load is equal to or above the assay’s limit of detection.

2. This test is qualitative, not quantitative, although the intensity of the positive bands does relate to the amount of detectable analyte in the sample.

3. A large amount of respiratory samples were evaluated to ensure the test functions correctly. The results correlated well against other reference techniques (such as RT-PCR Real Time). However, this study does not rule out any potential interference to the test’s performance on analysing other respiratory samples.

4. Monitoring the reaction time is important. If the reaction time is shorter than indicated, samples containing a quantity of analyte above the sensitivity limit will be clear on observation, but those on the limit will not appear. If the reaction time is longer than indicated, the test’s sensitivity may be impaired and give rise to incorrect interpretations.

5. The test results should be interpreted alongside the available data from epidemiological studies, the patient’s clinical evaluation, and other diagnostic procedures.

6. Adding the correct amount of sample to the reactive strip (7 drops with the plastic pipette supplied in the kit or 140 μL) is very important, as a smaller amount may cause false negative results, whereas a larger amount could prevent the chromatogram from developing correctly.

7. Unsuitable collection, transportation, and/or handling of the sample could impair the results.

8. In the case of samples with a very high Influenza B viral load, a weaker, blue, non-specific signal could appear in correspondence with the Flu A line. This does not mean that there is infection by the Influenza A virus.

9. The antibodies present in the test may not detect all antigenic variants of the influenza viruses, or any new

strains that appear over time. The Analytical Sensitivity section lists all the strains analysed with the Flu A+B test.

ANALYTICAL SENSITIVITY

▪ Type A

- Analytical sensitivity with Influenza type A (H1N1), strain A/New Caledonia/20/99 IVR116 chemically inactivated: 8 ng/mL.

- Analytical sensitivity with Influenza type A (H1N1), strain A/New Caledonia/20/99 heat inactivated: 19.5 TCID₅₀/mL.

- Analytical sensitivity with Influenza type A (H1N1), strain A/Wisconsin/67/2005 (viable virus): 3,6 x 10⁵ CEID₅₀/mL.

▪ Type B

- Analytical sensitivity with Influenza type B, lineage Yamagata, strain B/Florida/07/04 chemically inactivated: 16 ng/mL.

- Analytical sensitivity with Influenza type B, lineage Yamagata, strain B/Florida/07/04 heat inactivated: 2.5 x 10³ TCID₅₀/mL.

- Analytical sensitivity with Influenza type B, lineage Yamagata, strain B/Florida/07/04 (viable virus): 3,6 x 10⁵ CEID₅₀/mL.

The Influenza strip analytical sensitivity was analysed with other variants of the virus (A and B):

Strain	Subtype/ lineage	Analytical sensitivity
A/New Caledonia/20/99	H1N1	8 ng/mL
A/Solomon Island/03/06	H1N1	31 ng/mL
A/Beijing/262/95	H1N1	31 ng/mL
A/Taiwan/1/86	H1N1	16 ng/mL
A/Brisbane/10/07	H3N2	8 ng/mL
A/Kiev/301/94	H3N2	16 ng/mL
A/Panama/2007/99	H3N2	16 ng/mL
A/Shangdong/9/93	H3N2	16 ng/mL
A/Wisconsin/67/05	H3N2	31 ng/mL
A/Florida/04/06	Yamagata	8 ng/mL
B/Hong Kong/5/72	Victoria	31 ng/mL
B/Tokyo/53/99	Victoria	16 ng/mL
B/Victoria/504/00	Victoria	31 ng/mL

ANALYTICAL SPECIFICITY

The monoclonal antibodies used to detect Influenza A and B specifically detect a highly conserved epitope from the nucleoprotein of each virus.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The Flu A+B test was evaluated by retrospectively analysing different respiratory sample specimens.

The reference techniques were:

- RT-PCR CLART® PneumoVir 2 (Genomica).
- PCR Cobas Liat Influenza A/B (Roche).
- Aries® Real Time PCR Flu A/B&RSV (Luminex).
- Real SARS-CoV-2/Flu/RSV (Operon).

The results are shown below and separated by analyte, specimen, and reference technique. 190 respiratory samples were analysed for Influenza A and 77 of these samples were clinically diagnosed as positive. 145 respiratory samples were analysed for Influenza B and 14 of these samples were clinically diagnosed as positive.

Oropharyngeal swab samples in viral transport medium characterised by RT-PCR CLART® PneumoVir 2 (Genomica)

36 samples negative for Influenza A/B were analysed, along with 34 positive for Influenza A and 6 positive for Influenza B.

Influenza A		RT-PCR CLART® PneumoVir 2	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive	20	0
	Negative	14	36
Sensitivity agreement = 58,8% Specificity agreement ≥ 99,9% PPV: 100 % NPV: 72,0%			

Influenza B		RT-PCR CLART® PneumoVir 2	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive	2	0
	Negative	2	36
Sensitivity agreement = 50,0% Specificity agreement ≥ 99,9% PPV: 100% NPV: 94.7%			

Oropharyngeal swab samples in viral transport medium characterised by RT-PCR Real Time Cobas Liat Influenza A/B (Roche)

26 samples negative for Influenza A/B and 22 positive for Influenza A were analysed.

Influenza A		RT-PCR Cobas Liat Influenza A/B	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive	14	1
	Negative	8	25
Sensitivity agreement = 63,6% Specificity agreement = 96,1% PPV: 93,6% NPV: 75,8%			

Influenza B		RT-PCR Cobas Liat Influenza A/B	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive		0
	Negative		48
Specificity agreement ≥ 99.9%			

Oropharyngeal swab samples characterised by Real SARS-CoV-2/Flu/RSV (Operon)

47 samples negative for Influenza A/B were analysed.

Influenza A		RT-PCR	
		Positive	Negative
RSV-Flu A+B test	Positive		1
	Negative		46
Specificity agreement = 97.9% PPV: N/A NPV: 100%			

Influenza B		RT-PCR	
		Positive	Negative
RSV-Flu A+B test	Positive		0
	Negative		47
Specificity agreement ≥ 99.9% PPV: N/A NPV: 100%			

Nasopharyngeal aspirate samples characterised by Luminex Aries® Real Time PCR Flu A/B&RSV

Influenza A: 73 samples were analysed, 21 of them originally characterized as positive.

Influenza B: 71 samples were analysed, 10 of them originally characterized as positive.

Influenza A		RT-PCR	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive	18	1
	Negative	3	51
Sensitivity agreement = 85,7% Specificity agreement = 98,1% PPV: 94,7% NPV: 94,4%			

Influenza B		RT-PCR	
		Positive	Negative
Flu A+B test	Positive	9	0
	Negative	1	61
Sensitivity agreement = 90,0% Specificity agreement ≥ 99.9% PPV: 100% NPV: 98,4%			

REPEATABILITY

Five replicates of 1/2 serial dilutions of characterised internal standards were analysed (sensitivity curve), along with real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each analyte detected by the test, measured on the same day by the same person. High repeatability was obtained with differences between the replicates of the standard for each analyte equal to or below one 1/2 dilution and the results with the real samples were the same.

REPRODUCIBILITY

• INTER-DAY PRECISION

Over five consecutive days and in duplicate, the same Simple Flu A+B test batch was measured for a sensitivity curve and a group of real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each of the analytes detected using the test. Sensitivity differences equal or less than one 1/2 dilution were obtained and the results with the real samples were the same.

• INTER-OPERATOR PRECISION

In triplicate, three persons measured a sensitivity curve a group of real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positiva sample") for each one of the analytes detected with the test. Sensitivity differences equal or less than one 1/2 dilution were obtained and the results with the real samples were the same.

• INTER-BATCH PRECISION

In parallel and in duplicate using three different test batches, a sensitivity curve was evaluated and a group of real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each of the analytes detected with the test. The analysis was performed by one person on the same day. Sensitivity differences equal or less than one 1/2 dilution were obtained and the results with the real samples were the same.

THE HOOK OR PROZONE EFFECT

It was confirmed that the Flu A+B test:

1. Does not present a Hook effect with Influenza A/Virginia/ATCC1/2009 (Ref. VR-1736 from ATCC) until a viral infection load of 3.2×10^5 TCID₅₀/mL.

2. Does not present a Hook effect with Influenza B/Florida/04/06 (ref. VR-1804 de ATCC) until a viral infection load of $2,2 \times 10^7$ CEID₅₀/mL.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances showed no effect on the test results when added at the indicated concentrations:

Active ingredient	Concentration
Blood	0.5 %
Mucin	0.5 mg/mL
Benzocaine	1 mg/mL
Hyaluronic acid and allantoin	1 % v/v
Phenylephrine	15 % v/v
Oxymetazoline	15 % v/v
Mometasone	0.01 mg/mL
Fluticasone propionate	2.5 % v/v
Dichlorobenzyl alcohol and amylmetacresol	5% w/v (50 mg/mL)
Sodium cromoglycate	15 % v/v
Oseltamivir	5 mg/mL
Mupirocin	10 µg/mL
Tobramycin	4 µg/mL
Amoxicillin	1 mg/mL
Biotin	1 µg/mL
Alkalol	1:10
Phenolic compounds	5 % v/v
Ibuprofen	2.2 mg/mL
Paracetamol	1 mg/mL
Zanamivir	5 mg/mL
Ribavirin	1 mg/mL
Acetylsalicylic acid	0.3 mg/mL
Budesonide	1 % v/v

CROSS-REACTIVITY

Evidence for no cross-reactivity with the following micro-organisms has been obtained:

Micro-organism	Analysed concentration
Bordetella pertussis	1×10^6 CFU/mL
Haemophilus influenzae	1×10^6 CFU/mL
Legionella pneumophila	1×10^6 CFU/mL
Inactivated mycobacterium tuberculosis	1:10 Dilution (0.27 g/mL)
Streptococcus pneumoniae	1×10^6 CFU/mL
Streptococcus salivarius	1×10^6 CFU/mL
Streptococcus pyogenes	1×10^6 CFU/mL
Staphylococcus aureus	1×10^6 CFU/mL
Staphylococcus epidermis	1×10^6 CFU/mL
Candida albicans	1×10^6 CFU/mL

Pseudomonas aeruginosa	1×10^6 CFU/mL
Chlamydia pneumoniae	7.5×10^6 IFU/mL
Mycoplasma pneumoniae	1.43×10^6 CFU/mL
Nasal wash	N/A
Inactivated coronavirus 229E	0.94×10^4 TCID ₅₀ /mL
Inactivated coronavirus OC43	5×10^4 TCID ₅₀ /mL
Viable coronavirus OC43	0.89×10^4 TCID ₅₀ /mL
Inactivated coronavirus NL63	1.7×10^4 TCID ₅₀ /mL
Inactivated MERS	1.7×10^4 TCID ₅₀ /mL
Inactivated adenovirus 7A	1.5×10^5 TCID ₅₀ /mL
Metapneumovirus TN/91-316	2.8×10^5 TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 1 HPIV1/FRA/27344044/2007	0.89×10^4 TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 2 (Greer)	0.89×10^5 TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 3 (NIH 47885)	1.6×10^6 TCID ₅₀ /mL
Parainfluenza 4B (19503)	5×10^5 TCID ₅₀ /mL
Rhinovirus 48 (1505)	5×10^5 TCID ₅₀ /mL
Enterovirus D 68 (USA/2018-23089)	2.8×10^5 TCID ₅₀ /mL
Inactivated SARS-CoV-2	6.5×10^5 TCID ₅₀ /mL
RSV B1	$8,9 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Bednarska K. *et al.*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015.
2. Karlsson E.A. *et al.*, Weekly Epidemiological Record, No 25, 2021.
3. Krammer F. *et al.*, Nature Review, 2018.
4. Rita Y. T. Sung *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, 2008.



Fecha de caducidad / Expiry date

LOT

Número de lote / Lot number

IVD

Uso diagnóstico in vitro /For in vitro diagnostic use



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices

REF

Número de catálogo / Catalogue number



Leer instrucciones de uso / Please read the instructions for use



Fabricado por / Manufactured by



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contains sufficient for <n> tests



Precaución / Caution



Conservar a / Store at



DO-0905165 Rev. 4 (23.05.2022)



OPERON, S.A.. - Camino del Plano, 19 -E-50410 Cuarte
de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA
+ 34 976 503597